

# **N-Terminale Glykierung von Proteinen in Lebensmitteln und unter physiologischen Bedingungen**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden

von

**Jürgen Löbner**

geboren am 21.09.1983 in Leisnig

Eingereicht am 28.09.2017

Verteidigt am 26.01.2018

Die Dissertation wurde in der Zeit von Februar 2009 bis Dezember 2014  
an der Professur für Lebensmittelchemie angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Thomas Henle

Prof. Dr. rer. nat. Lothar Kroh

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XVII</b>
<b>1 Einleitung und Zielstellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Hintergrund und Wissensstand</b> .....	<b>3</b>
2.1 <i>Die Maillard-Reaktion</i> .....	3
2.1.1 Das Amadori-Produkt.....	4
2.1.1.1 Reaktivität von Sacchariden .....	4
2.1.1.2 Bildung des Amadori-Produkts am Beispiel der Reaktion von Glucose mit primären Aminogruppen von Aminosäuren.....	4
2.1.1.3 Einfluss des pK <sub>S</sub> -Werts der Aminogruppe auf die Bildung der Schiff'schen Base und des Amadori-Produkts.....	6
2.1.1.4 Nachbargruppeneffekte.....	6
2.1.1.5 Einflussfaktoren auf die Bildung der Schiff'schen Base und des Amadori-Produkts an humanem Hämoglobin .....	7
2.1.1.6 Abbau des Amadori-Produkts.....	9
2.1.2 Bildung von Dicarbonylverbindungen in der Maillard-Reaktion.....	9
2.1.2.1 Aminkatalysierte Bildung von Dicarbonylverbindungen aus Glucose.....	10
2.1.2.2 Bildung von Dicarbonylverbindungen aus Maltooligosacchariden.....	13
2.1.3 Advanced Glycation Endproducts – AGEs .....	15
2.1.3.1 Allgemeiner Überblick .....	15
2.1.3.2 Carboxyalkylierung von Aminosäuren.....	18
2.1.3.3 2(1H)-Pyrazinone .....	24
2.1.4 Erkenntnisse zur N-terminalen Glykierung.....	28
2.2 <i>Maillard-Reaktionsprodukte in Lebensmitteln</i> .....	28
2.2.1 Amadori-Produkte in Lebensmitteln .....	29
2.2.1.1 N-ε-Amadori-Produkte des Lysins .....	29
2.2.1.2 N-α-Amadori-Produkte.....	32
2.2.2 Carboxyalkyl-AGEs in Lebensmitteln .....	36
2.2.2.1 Carboxyalkylderivate des Lysins in Lebensmitteln.....	36
2.2.2.2 N-terminale Carboxyalkyl-AGEs .....	38
2.2.3 2(1H)-Pyrazinone in Lebensmitteln .....	38
2.2.3.1 2(1H)-Pyrazinone als aromaaktive Moleküle.....	38
2.2.3.2 2(1H)-Pyrazinone in Modellbackwaren.....	39

2.2.4	N-terminale AGEs in Lebensmitteln .....	39
2.3	<i>Maillard-Reaktion in vivo</i> .....	40
2.3.1	Glucosestoffwechsel von Erythrozyten .....	41
2.3.1.1	Glucosetransport und Hyperglykämie.....	41
2.3.1.2	Hyperglykämie als Krankheitsbild.....	41
2.3.1.3	Glycolyse und anaerobe Fermentation.....	42
2.3.1.4	Glycolyse und Hyperglykämie.....	42
2.3.2	Dicarbonylverbindungen in Blutplasma und Erythrozyten .....	42
2.3.2.1	Direkte alimentäre Aufnahme von Dicarbonylverbindungen .....	42
2.3.2.2	Postprandialer Anstieg der Plasmagehalte von Dicarbonylverbindungen .....	43
2.3.2.3	Quellen für Glyoxal und Methylglyoxal in vivo.....	43
2.3.2.4	Die Bildung von Methylglyoxal aus Triosephosphaten in vivo.....	44
2.3.2.5	Enzymatischer Abbau von Dicarbonylverbindungen in Erythrozyten.....	44
2.3.2.6	Gehalte von Dicarbonylverbindungen in Erythrozyten und Plasma .....	45
2.3.2.7	Carbonylstress und oxidativer Stress .....	47
2.3.3	Hämoglobin und genetische Varianten des N-Terminus der $\beta$ -Kette .....	47
2.3.4	Kenntnisse zur Glykierung von humanem Hämoglobin durch Glucose.....	49
2.3.4.1	Entwicklung der HbA <sub>1c</sub> -Analytik zum Diagnoseinstrument bei Diabetes mellitus	49
2.3.4.2	Analytik HbA <sub>1c</sub> -Wert: Methoden, Unterschiede, Aussagekraft, Spezifität.....	50
2.3.4.3	Metabolische und methodische Grenzen in der Bewertung der Gesamtglykierung über den HbA <sub>1c</sub> -Wert.....	51
2.3.4.4	Bevorzugte Reaktionsorte der Glykierung zum Amadori-Produkt.....	55
2.3.4.5	Enzymatische Deglykierung .....	55
2.3.4.6	Auswirkung der Glykierung auf die Funktionalität – Sauerstoffbindung.....	56
2.3.5	MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin in humanem Blut .....	57
2.3.5.1	AGEs der Seitenketten von Lysin und Arginin in Blutplasma .....	57
2.3.5.2	AGEs und Fructosyllysine als Derivate der Seitenketten von Lysin und Arginin in Hämoglobin.....	58
2.3.6	N-Terminale AGEs des Hämoglobins .....	60
2.3.6.1	CM-Val bzw. N- $\alpha$ -CM-Val-Hämoglobin .....	61
2.3.6.2	2(1H)-Pyrazinone.....	63
2.3.7	2(1H)-Pyrazinone biologischer Herkunft und Ableitung synthetischer 2(1H)- Pyrazinonderivate mit pharmakologischer Wirkung .....	63
2.3.8	Offene Fragen zur N-terminalen Glykierung des Hämoglobins.....	66
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>67</b>
3.1	<i>Chemikalien, Materialien und Geräte</i> .....	67
3.1.1	Chemikalien.....	67
3.1.2	Materialien.....	69
3.1.3	Geräte.....	70
3.2	<i>Synthese der Vergleichssubstanzen</i> .....	72
3.2.1	Synthese von N- $\alpha$ -Fructosylderivaten (Amadori-Produkte).....	72
3.2.2	Synthese von Furoylmethylvalin (FM-Val).....	76

3.2.3	Synthese von 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinonen.....	77
3.2.4	Synthese von Carboxyalkylderivaten.....	82
3.3	<i>Analytische Methoden</i> .....	87
3.3.1	pH-Wert Bestimmung von Backwaren.....	87
3.3.2	Elementaranalyse.....	87
3.3.3	Direkte ESI-TOF-MS für Massengenauigkeit.....	88
3.3.4	NMR-Spektroskopie.....	88
3.3.5	Tüpfeltest.....	88
3.3.6	Dünnschichtchromatographie.....	88
3.3.7	LC-MS/MS zur Identifizierung der N- $\alpha$ -Fructosylderivate von Dipeptiden über charakteristische Fragmentierung.....	90
3.3.8	RP-HPLC-CLND zur Bestimmung der Gehalte von Amadori-Produkt-Präparaten.....	91
3.3.9	Quantifizierung von FM-Val nach saurer Hydrolyse in physiologischen Inkubationen und Modellbackwaren.....	92
3.3.10	Quantifizierung von 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinonen und Chinoxalin in physiologischen Modellinkubationen – RP-HPLC-UV-FLD.....	94
3.3.11	Quantifizierung von CM-Val-Xaa-Derivaten und GO-Val-Xaa-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinonen in Proben aus Inkubationsexperimenten mittels LC-MS/MS.....	95
3.3.12	Quantifizierung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Modellbackwaren nach Derivatisierung mit ortho-Phenylendiamin (OPD).....	97
3.3.13	Quantifizierung von 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinonen im Stärke-Peptid-Backmodell – RP-HPLC-UV-FLD.....	98
3.3.14	Quantifizierung N-terminaler MRPs in humanem Hämoglobin nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure.....	98
3.3.15	Quantifizierung der MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin nach enzymatischer Hydrolyse.....	102
3.3.16	Aminosäureanalyse.....	104
3.4	<i>Präparative Methoden</i> .....	106
3.4.1	Säulenchromatographie mit Kieselgel (Flash-Chromatographie).....	106
3.4.2	Semipräparative Ionenaustausch-Chromatographie (IEC).....	106
3.4.3	Semipräparative HPLC.....	107
3.5	<i>pH-potentiometrische Titration</i> .....	108
3.6	<i>Inkubationsexperimente physiologisches Modell</i> .....	109
3.6.1	Reaktivität von Valyldipeptiden gegenüber Glucose.....	109
3.6.2	Reaktivität von Valyldipeptiden gegenüber Glyoxal.....	109
3.7	<i>Aufarbeitung von humanem Hämoglobin</i> .....	110
3.7.1	Humane Hämoglobinproben.....	110
3.7.2	Isolierung von humanem Hämoglobin aus Blutproben.....	111
3.7.3	Anreicherung von AGEs in humanem Hämoglobin und dem Tripeptid Val-Leu-Ser... ..	111
3.7.4	Enzymatische Hydrolyse mit Pepsin und Carboxypeptidase Y zur Freisetzung N-terminaler AGEs bzw. AGE-Peptide aus humanem Hämoglobin.....	112
3.7.5	Enzymatische Totalhydrolyse von humanem Hämoglobin.....	112

3.7.6	Totalhydrolyse von isoliertem humanem Hämoglobin mit 6 M Salzsäure .....	114
3.7.7	Wiederfindung von 2(1H)-Pyrazinonen und Neubildung N-terminaler AGEs bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure.....	114
3.7.7.1	Stabilität von 2(1H)-Pyrazinonen – Wiederfindung .....	114
3.7.7.2	Nachbildung N-terminaler AGEs aus Fru-Val-His .....	115
3.7.8	Statistik .....	116
3.8	<i>Inkubationsexperimente mit Modellbackwaren</i> .....	116
3.8.1	Stärke-Peptid-Backmodell .....	116
3.8.2	Glucose-Peptid-Backmodell .....	117
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>119</b>
4.1	<i>Synthese und Charakterisierung N-terminaler Amadori-Produkte und AGEs</i> .....	119
4.1.1	Synthese und Charakterisierung von N- $\alpha$ -Fructosyl-Amadori-Produkten .....	119
4.1.1.1	Synthese von N- $\alpha$ -Fructosylderivaten.....	119
4.1.1.2	Charakterisierung der Fru-Val-Xaa-Derivate mittels Massenspektrometrie .....	120
4.1.2	Umsatzrate von Amadori-Produkten bei der Hydrolyse mit Salzsäure .....	122
4.1.3	N-terminale pK <sub>S</sub> -Werte von Valyl-Dipeptiden.....	124
4.1.4	Synthese von Furoylmethylvalin (FM-Val).....	125
4.1.5	Synthese von 2(1H)-Pyrazinonen .....	125
4.1.6	Synthese von Carboxyalkylderivaten .....	126
4.2	<i>Sequenzabhängige Bildung N-terminaler MRPs unter physiologischen Bedingungen</i> .....	126
4.2.1	Umsatz von Dipeptiden mit Glucose im physiologischen Modell .....	127
4.2.1.1	Quantifizierung von Amadori-Produkten .....	127
4.2.1.2	Initiale Phase der Amadori-Produkt-Bildung.....	128
4.2.1.3	Vergleich der Reaktivität der Dipeptide zu N-terminalen Amadori-Produkten....	130
4.2.1.4	Einfluss des Nachbargruppeneffekts auf die Bildung des Amadori-Produkts .....	131
4.2.2	Umsatz von Dipeptiden mit Glyoxal im physiologischen Modell.....	133
4.2.2.1	Quantifizierung N-terminaler AGEs .....	133
4.2.2.2	Entwicklung des pH-Werts .....	135
4.2.2.3	Gesamtumsatz der Dipeptide .....	137
4.2.2.4	Umsatz der Dipeptide zu N-terminalen AGEs.....	138
4.2.2.5	Einfluss der funktionellen Gruppe der Seitenkette der C-terminalen Aminosäure	140
4.2.2.6	Einfluss des pK <sub>S</sub> -Werts der N-terminalen Aminogruppe auf die Produktbildung	142
4.2.2.7	Peptidspezifische Produktverteilung.....	143
4.2.3	Zusammenfassung zu den Ergebnissen aus den Experimenten im physiologischen Modell	144
4.3	<i>N-terminale MRPs und MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin in humanem Hämoglobin</i> .....	145
4.3.1	Nachweis N-terminaler AGEs in humanem Hämoglobin nach enzymatischer Hydrolyse	145
4.3.1.1	Nachweis der Amadori-Produkte der N-Termini der $\alpha$ - und der $\beta$ -Kette des Hämoglobins .....	146

4.3.1.2	Abbau der N-terminalen Di- und Tripeptide der Hämoglobinketten und ihrer Derivate durch die Carboxypeptidase Y .....	146
4.3.1.3	Nachweis N-terminaler Carboxyalkylderivate .....	147
4.3.1.4	Nachweis von 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinonen der N-Termini der $\alpha$ - und der $\beta$ -Kette des Hämoglobins .....	149
4.3.1.5	Zusammenfassung zur enzymatischen Freisetzung N-terminaler AGEs.....	151
4.3.2	Stabilität und Nachbildung N-terminaler AGEs aus Hämoglobin bei der Hydrolyse mit Salzsäure.....	152
4.3.2.1	Stabilität von 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinonen bei der Hydrolyse mit Salzsäure .....	152
4.3.2.2	Nachbildung N-terminaler AGEs aus dem N- $\alpha$ -Fructosylvalin des Hämoglobins	154
4.3.2.3	Fazit zur Nachbildung und Stabilität N-terminaler AGEs bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure	158
4.3.3	Nachweis und Quantifizierung N-terminaler MRPs in humanem Hämoglobin nach Hydrolyse in 6 M Salzsäure.....	159
4.3.3.1	Fructosylvalin (Fru-Val).....	160
4.3.3.2	Carboxyalkylderivate (CM-Val, CE-Val).....	162
4.3.3.3	2(1 <i>H</i> )-Pyrazinone .....	163
4.3.3.4	Fazit zur Analytik N-terminaler MRPs in humanem Hämoglobin .....	168
4.3.4	Quantifizierung der MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin in Hämoglobin nach enzymatischer Hydrolyse .....	168
4.3.5	Fructosylderivate in humanem Hämoglobin .....	170
4.3.6	N-Terminale Glyoxal-AGEs in humanem Hämoglobin.....	173
4.3.7	N-Terminale Methylglyoxal-AGEs in humanem Hämoglobin.....	177
4.3.8	Gehalte der AGEs der Seitenketten von Lysin und Arginin in humanem Hämoglobin.	179
4.3.9	Relative Glykierung der Derivatisierungsstellen.....	182
4.3.10	Unterscheidung der N-terminalen Glykierung nach $\alpha$ - und $\beta$ -Kette des Hämoglobins	186
4.3.11	Korrelationen der Gehalte von MRPs in Hämoglobinproben.....	187
4.3.11.1	Korrelationen der Gehalte der Fructosylderivate in den Hämoglobinproben der Kontrollgruppe .....	189
4.3.11.2	Korrelationen der Gehalte der Glyoxal-AGEs in den Hämoglobinproben der Kontrollgruppe .....	189
4.3.11.3	Korrelationen der Gehalte der Methylglyoxal-AGEs in den Hämoglobinproben der Kontrollgruppe .....	193
4.3.11.4	Korrelationen der Gehalte der Glyoxal-AGEs mit denen der Methylglyoxal-AGEs in den Hämoglobinproben der Kontrollgruppe .....	196
4.3.11.5	Korrelationen der Gehalte der Fructosylderivate in den Hämoglobinproben der Dialysepatienten.....	197
4.3.11.6	Korrelationen der Gehalte der Glyoxal-AGEs in den Hämoglobinproben der Dialysepatienten.....	198
4.3.11.7	Korrelationen der Gehalte der Methylglyoxal-AGEs in den Hämoglobinproben der Dialysepatienten.....	200
4.3.12	Zusammenfassung zur N-terminalen Glykierung des Hämoglobins .....	202

4.4	<i>N</i> -terminale Glykierung in Backwaren .....	204
4.4.1	Bildung N-terminaler AGEs im Stärke-Peptid-Backmodell.....	205
4.4.1.1	Dicarbonylverbindungen im Stärke-Peptid-Backmodell .....	206
4.4.1.2	Quantifizierung N-terminaler AGEs in Stärkekrusten.....	209
4.4.1.3	Gehalte N-terminaler AGEs in Stärkekrusten.....	212
4.4.1.4	Abhängigkeit der Bildung der Glyoxal-AGEs vom pH-Wert.....	214
4.4.1.5	Abhängigkeit der Bildung der Methylglyoxal-AGEs vom pH-Wert .....	215
4.4.1.6	Einfluss der Verfügbarkeit von Wasser auf die Anteile der von Glyoxal bzw. Methylglyoxal abgeleiteten AGEs .....	217
4.4.1.7	Fazit aus dem Stärke-Peptid-Backmodell .....	218
4.4.2	Bildung N-terminaler MRPs im Glucose-Peptid-Backmodell.....	219
4.4.2.1	Quantifizierung von Amadori-Produkten im Glucose-Peptid-Backmodell .....	219
4.4.2.2	Gehalte der Amadori-Produkte im Glucose-Peptid-Backmodell.....	221
4.4.2.3	Vergleich der Umsatzraten der Dipeptide zu den Amadori-Produkten .....	222
4.4.2.4	Bildung N-terminaler AGEs im Glucose-Peptid-Backmodell .....	223
4.4.2.5	Quantifizierung N-terminaler AGEs im Glucose-Peptid-Backmodell.....	224
4.4.2.6	Gehalte von CM-Val-Xaa-Peptiden und GO-Val-Xaa-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinonen im Krumenmodell.....	225
4.4.2.7	Gehalte von CM-Val-Xaa-Peptiden und GO-Val-Xaa-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinonen im Krustenmodell .....	227
4.4.2.8	Mechanistischer Zusammenhang der Anteile der N-terminalen AGEs .....	229
4.4.3	Zusammenfassung zu den Modellexperimenten unter Backbedingungen.....	232
4.4.4	Fazit zum Nachweis N-terminaler AGEs in Lebensmitteln .....	234
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>235</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>239</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>256</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>257</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Bildung Amadori-Produkt .....	5
Abbildung 2-2: Bildungswege des Glyoxals: (A) <i>Hayashi &amp; Namiki (1980)</i> ; (B) <i>Thornalley et al. (1999)</i> ; (C) <i>Hofmann et al. (1999)</i> . .....	11
Abbildung 2-3: Bildungswege des Methylglyoxals: (A) abgeleitet von <i>Thornalley et al. (1999)</i> (Bildung Methylglyoxal aus 3-DG durch Retro-Aldol-Spaltung); (B) <i>Yaylayan &amp; Keyhani (2000)</i> ; (C) <i>Weenen (1998)</i> . .....	12
Abbildung 2-4: Bildung des 1,4-Didesoxyglucosons am Beispiel Maltose, „Peeling-off“-Mechanismus ( <i>Hollnagel and Kroh, 2000</i> ) .....	14
Abbildung 2-5: Bildungsmechanismen für das 3-Desoxypentosen: (A) <i>Hollnagel &amp; Kroh (2002)</i> ; (B) <i>Smuda &amp; Glomb (2011)</i> .....	15
Abbildung 2-6: Carboxyalkyl- und Amid-AGEs (R = N- $\epsilon$ -Lysin oder N- $\alpha$ -Aminosäure) .....	16
Abbildung 2-7: Von Arginin abgeleitete AGEs. ....	17
Abbildung 2-8: Lysin-Arginin-Quervernetzungsprodukte. ....	17
Abbildung 2-9: 2(1H)-Pyrazinone ( <i>Prey and Petershofer, 1968</i> ) und 1,3-Bispeptidylimidazoliumsalze ( <i>Davidek et al., 1991</i> ) .....	18
Abbildung 2-10: Mechanismen zur Bildung von CM-Derivaten der N- $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin bzw. der N- $\alpha$ -Aminogruppe einer Aminosäure; (a) Amin und Glycolaldehyd mit anschließender Oxidation ( <i>Glomb and Monnier, 1995</i> ); (b) Namiki-Weg ( <i>Hayashi and Namiki, 1980</i> ); (c) Amin und Glyoxal zu Iminoglyoxal; (d) Hydratisierung und Enolisierung ( <i>Al-Abed and Bucala, 1995; Van Chuyen et al., 1973b</i> ); (e) intra-molekulare Cannizzaro-Reaktion ( <i>Salomaa et al., 1956; Wells-Knecht et al., 1995b</i> ) .....	19
Abbildung 2-11: Mechanismen zur Bildung von CM-Derivaten der N- $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin bzw. der N- $\alpha$ -Aminogruppe einer Aminosäure; (f) $\beta$ -Dicarbonylspaltung des 1-Amino-1,3-desoxy-2,4-glucosons ( <i>Kasper &amp; Schieberle, 2005</i> ); (g) Oxidation des 1,2-Enaminols bzw. allgemein eines Endiols ( <i>Baker et al., 1994; Hofmann et al., 1999</i> ); (h) Keto-Enol-Tautomerie ( <i>Biemel et al., 2002; Reihl et al., 2004</i> ); (i und j) hydrolytische $\beta$ -Spaltung ( <i>Davidek et al., 2006a</i> ); (k) oxidative $\alpha$ -Spaltung ( <i>Davidek et al., 2006b</i> ) .....	21
Abbildung 2-12: Mechanismen zur Bildung von CE-Derivaten der N- $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin bzw. der N- $\alpha$ -Aminogruppe einer Aminosäure; (l) Bildung 2-Imino-2,3-didesoxyglucoson; (m) Bildung 2-Imino-1,2-didesoxyglucoson; (n) Retro-Aldol-Spaltung zu 2-Iminomethylglyoxal mit anschließender Hydratisierung und Enolisierung ( <i>Al-Abed and Bucala, 1995; Van Chuyen et al., 1973b</i> ) bzw. Cannizzaro-Reaktion ( <i>Wells-Knecht et al., 1995a</i> ) ( <i>Wells-Knecht et al., 1995b</i> ); (o) Methylglyoxal und Amin ( <i>Ahmed et al., 1997</i> ); (p) Keto-Enol-Tautomerie zum 2-Amino-1,2-didesoxy-3,5-glucoson ( <i>Biemel et al., 2002; Reihl et al., 2004</i> ) und hydrolytische $\beta$ -Spaltung ( <i>Davidek et al., 2006a; Kasper and Schieberle, 2005</i> ); (q) Keto-Enol-Tautomerie zum 2-Amino-1,2-didesoxy-3,4-glucoson und oxidative $\alpha$ -Spaltung ( <i>Davidek et al., 2006b</i> ). .....	23
Abbildung 2-13: Mechanismus der Bildung von 2(1H)-Pyrazinonen nach <i>Prey &amp; Petershofer (1968)</i> .....	24
Abbildung 2-14: Derivatisierung von Glyoxal durch Aminoguanidin zum Triazin .....	26

Abbildung 2-15: Abbau eines 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinonpeptids zum N1-Alkyl-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinon bei der Hydrolyse mit Salzsäure nach Krause (2005); <i>R</i> = beliebige Aminosäureseitenkette .....	27
Abbildung 2-16: Bildung der N- $\epsilon$ -Furoylmethylaminosäure des Lysins (Furosin) und einer N- $\alpha$ -Furoylmethylaminosäure am Beispiel von Valin (FM-Val) aus dem jeweiligen Amadori-Produkt bei der Umsetzung in Salzsäure .....	30
Abbildung 2-17: Nicht-enzymatische Bildung von Methylglyoxal aus Triosephosphaten.....	44
Abbildung 2-18: Aspergillussäure, Phevalin, Tyrvalin, Leuvalin, Butrepyrazinon .....	64
Abbildung 2-19: Dragmacidin D, E, F .....	65
Abbildung 3-1: Strukturen von Fru-Val und Fru-Val-Xaa.....	75
Abbildung 3-2: Struktur von FM-Val.....	77
Abbildung 3-3: Strukturen der 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinone abgeleitet von Glyoxal bzw. Methylglyoxal und Dipeptiden der Struktur Val-Xaa.....	80
Abbildung 3-4: Struktur der Carboxyalkyl-Val-Derivate bzw. Carboxyalkyl-Val-Xaa-Dipeptide abgeleitet von Glyoxal bzw. Methylglyoxal und Valin bzw. Dipeptiden der Struktur Val-Xaa.....	84
Abbildung 3-5: Aufbau pH-potentiometrische Titration (Schreppel, 2007). .....	108
Abbildung 4-1: Fragmentierungsmuster Fru-Val-Leu bei einer Kollisionsenergie von 20 eV.....	120
Abbildung 4-2: Fragmentierung von Fru-Val-Leu (offenkettige Form) bis zum Fragment $m/z = 309$ .....	121
Abbildung 4-3: Fragmentierung von Val-Xaa am Beispiel von Val-His .....	122
Abbildung 4-4: Dipeptide der Struktur Val-Xaa zur Verwendung für Inkubationsexperimente .....	127
Abbildung 4-5: Exemplarisches RP-HPLC-Chromatogramm der Inkubationsexperimente des Glucose-Peptid-Modells (Val-Ser) unter physiologischen Bedingungen (37°C, pH = 7,4); Detektion von FM-Val bei $\lambda = 280$ nm; (a) FM-Val-Standard; (b) Val-Ser + Glucose nach 14 Tagen Inkubationszeit; (c) Val-Ser + Glucose nach 0 Tagen Inkubationszeit. ....	128
Abbildung 4-6: Gehalt der Fru-Val-Xaa-Amadori-Produkte nach Inkubation (Abschnitt 3.6.1) der Val-Xaa-Dipeptide (5 mM) mit Glucose (5 mM) unter physiologischen Modellbedingungen (pH = 7,4, 37°C, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) für 14 Tage.....	129
Abbildung 4-7: Umsatz der Val-Xaa-Dipeptide (5 mM) zu den Fru-Val-Xaa-Amadori-Produkten nach 1 Tag Inkubation mit Glucose (5 mM) unter physiologischen Modellbedingungen (pH = 7,4, 37°C, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) .....	130
Abbildung 4-8: Hohe Nukleophilie der Aminofunktion als Triebkraft bei der Tautomerisierung der Schiff'schen Base zum 1,2-Enaminol.....	131
Abbildung 4-9: Vergleich der Strukturen von Glutaminsäure, Glutamin, $\gamma$ -Aminobuttersäure und Leucin .....	132
Abbildung 4-10: RP-HPLC-Chromatogramme von Inkubationsexperimenten des Glyoxal-Peptid-Modells unter physiologischen Bedingungen (37°C, pH = 7,4, 14d); Detektion der 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinone bei $\lambda = 320$ nm; Inkubationen ausgehend von Glyoxal und (a) Val-His (VH), (b) Val-Ser (VS), (c) Val-Glu (VE), (d) Val-Tyr (VY), (e) Val-Leu (VL); OPD = ortho-Phenylendiamin; Chinoxalin = Kondensationsprodukt aus Glyoxal und OPD. ....	134
Abbildung 4-11: LC-MS/MS-Chromatogramme von Inkubationsexperimenten des Glyoxal-Peptid-Modells unter physiologischen Bedingungen (37°C, pH = 7,4); Detektion der CM-Valyldipeptide (CM-Val-Xaa) über zwei charakteristische Massenübergänge; Inkubationen ausgehend von Glyoxal und (A) Val-His, (B) Val-Ser, (C) Val-Glu, (D) Val-Tyr, (E) Val-Leu;	

Darstellung der Chromatogramme der Referenzstandards, jeweils einer Probe nach 14 Tagen Inkubationszeit und eines Blindwerts nach 0 Tagen Inkubationszeit.....	135
Abbildung 4-12: Abbau des Glyoxals (5 mM) nach Inkubation mit dem jeweiligen Val-Xaa-Dipeptid (5 mM) unter physiologischen Modellbedingungen (pH = 7,4, 37°C, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) für 14 Tage.....	136
Abbildung 4-13: Disproportionierung von Glyoxal zu organischen Säuren gezeigt über den Mechanismus der Cannizzaro-Reaktion. Ein alternativer Mechanismus verläuft über Hydratisierung und Enolisierung.....	137
Abbildung 4-14: Umsatz der Val-Xaa-Dipeptide (5 mM) nach Inkubation mit Glyoxal (5 mM) unter physiologischen Modellbedingungen (pH = 7,4, 37°C, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) für 14 Tage. ....	137
Abbildung 4-15: Peptidumsatz zum CM-Val-Xaa-Dipeptid nach Inkubation von Val-Xaa-Dipeptiden (5 mM) mit Glyoxal (5 mM) unter physiologischen Modellbedingungen (pH = 7,4, 37°C, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) für 14 Tage.....	139
Abbildung 4-16: Peptidumsatz zum 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinon nach Inkubation von Val-Xaa-Dipeptiden (5 mM) mit Glyoxal (5 mM) unter physiologischen Modellbedingungen (pH = 7,4, 37 °C, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) für 14 Tage.....	140
Abbildung 4-17: Übersicht zur Bildung der CM-Derivate, der 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinone, der Summe dieser beiden AGEs und zum Gesamtumsatz der Dipeptide nach 14 Tagen Inkubationszeit unter physiologischen Bedingungen.....	140
Abbildung 4-18: Mögliche Mechanismen zur Katalyse durch die Seitenkette des Serins bei der Bildung des 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinons aus dem Iminoglyoxal.....	142
Abbildung 4-19: Bildung der Schiff'schen Base (Iminoglyoxal) .....	143
Abbildung 4-20: Nachweis von Fru-Val-Leu-Ser ( <b>A</b> ), Fru-Val-Leu ( <b>B</b> ) und Fru-Val-His ( <b>C</b> ) im Hydrolysat von isoliertem Hämoglobin nach Hydrolyse mit Pepsin und Carboxypeptidase Y; Detektion charakteristischer Massenübergänge von Fructosylpeptiden mittels LC-MS/MS (Abschnitt 4.1.1.2, Abbildung 4-1). ....	146
Abbildung 4-21: Identifizierung von CM-Val-His-Leu ( <b>A</b> ) und CE-Val-His-Leu ( <b>B</b> ) im Hydrolysat von isoliertem Hämoglobin nach Inkubation mit Pepsin und Carboxypeptidase Y mittels zwei charakteristischer Massenübergänge; Prinzip der Fragmentierung von N-terminalen Carboxyalkylderivaten zu den charakteristischen Fragmenten am Beispiel eines N- $\alpha$ -CM-Val-Xaa-Peptids (bei CE-Derivaten gilt $m/z + 14$ Da), $R_1$ = beliebige Aminosäureseitenkette, $R_2$ = OH für Dipeptidderivat, $R_2$ = Xaa <sub>n</sub> für beliebige Aminosäure oder Peptidkette. ....	147
Abbildung 4-22: Identifizierung von CM-Val-Leu ( <b>A1</b> ) und CE-Val-Leu ( <b>B1</b> ) im Hydrolysat von isoliertem Hämoglobin (schwarze Linie) im Vergleich zu synthetisiertem Referenzstandard (graue Linie); Detektion von CM-Val-Leu-Ser ( <b>A2</b> ) und von CM-Val-Leu ( <b>A3</b> ) nach Umsetzung von Hämoglobin mit Glyoxal (Abschnitt 3.7.3) bzw. CE-Val-Leu ( <b>B3</b> ) aber nicht CE-Val-Leu-Ser ( <b>B2</b> ) nach Umsetzung von Hämoglobin mit Methylglyoxal (Abschnitt 3.7.3), schwarze Linie entspricht Hydrolysaten der inkubierten Hämoglobine, graue Linie entspricht synthetisierten CM-/CE-Dipeptidstandards bzw. CM-/CE-Tripeptid (erzeugt durch Inkubation des Tripeptids mit Glyoxal bzw. Methylglyoxal; Abschnitt 3.7.3); Hydrolyse mit Pepsin und Carboxypeptidase Y. ....	148

Abbildung 4-23: Vergleich der Derivatisierungsstelle zwischen einem 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinon und einem Carboxyalkylderivat am Beispiel der Glyoxalderivate von Val-His-Leu (N-Terminus $\beta$ -Kette); <b>hervorgehoben</b> : AGE-Teil des Peptidderivats. ....	149
Abbildung 4-24: Identifizierung des GO-Val-Leu-Ser-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinons nach Inkubation des Hämoglobins mit Glyoxal und Hydrolyse mit Pepsin und Carboxypeptidase Y; Vergleich des Hydrolysats des originären Hämoglobins, des Glyoxal-AGE-angereicherten Hämoglobins und des Glyoxal-AGE-angereicherten Vergleichspeptids Val-Leu-Ser; Fragmentierungsschema zur Erklärung der zur Detektion verwendeten charakteristischen Massenübergänge. ....	150
Abbildung 4-25: Stabilität von 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinonen unter den Bedingungen der Hydrolyse in 6 M Salzsäure. ....	153
Abbildung 4-26: Mögliche Abbauwege von 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinonen bei der Umsetzung mit 6 M Salzsäure bei 110 °C für 23 h; R = Seitenkette der zweiten Aminosäure des Dipeptids; Xaa = beliebige Aminosäure. ....	154
Abbildung 4-27: Gehalte N-terminaler AGEs im Hydrolysat eines Hämoglobins, eines reduzierten Hämoglobins und eines Hämoglobins mit Zusatz von Fru-Val-His. ....	155
Abbildung 4-28: Umwandlung des 5-Methyl-Val-His-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinons in CE-Val durch partielle Reduzierung mit Natriumborhydrid, Hydrolyse und Oxidation bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure. ....	157
Abbildung 4-29: Massenspektrum der Fragmentierung von FM-Val (Referenzstandard) im positiven Modus bei einer Kollisionsenergie von 10 eV. ....	160
Abbildung 4-30: Fragmentierungsschema für FM-Val ( $[M+H]^+ = 226$ ) . ....	161
Abbildung 4-31: Massenspektren der Fragmentierung von (A) CM-Val (10 eV Kollisionsenergie) und von (B) CE-Val (5 eV Kollisionsenergie). ....	162
Abbildung 4-32: Fragmentierungsschema für CM-Val ( $[M+H]^+ = 176$ Da) und CE-Val ( $[M+H]^+ = 190$ Da) . ....	163
Abbildung 4-33: LC-MS/MS-Chromatogramme von je zwei charakteristischen Massenübergängen von CM-Val, CE-Val und FM-Val in einem Hämoglobinhydrolysat (Mischung aus Hämoglobinhydrolysaten für die Matrixkalibrierung) und einem Kalibrierstandard (Standardaddition, Matrixkalibrierung); <b>A</b> – CM-Val, <b>B</b> – CE-Val, <b>C</b> – FM-Val. ....	163
Abbildung 4-34: Massenspektren der Fragmentierung des (A) GO-Val-His-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinons (15 eV Kollisionsenergie) und des (B) MGO-Val-His-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinons (10 eV Kollisionsenergie). ....	164
Abbildung 4-35: Massenspektren der Fragmentierung des (A) GO-Val-Leu-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinons (15 eV Kollisionsenergie) und des (B) MGO-Val-Leu-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinons (10 eV Kollisionsenergie). ....	165
Abbildung 4-36: Charakteristische Fragmente des GO- ( $R_1 = H$ und $R_2 = H$ ) und des MGO-Val-His-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinons ( $R_1 = H$ und $R_2 = CH_3$ oder $R_1 = CH_3$ und $R_2 = H$ ) . ....	166
Abbildung 4-37: LC-MS/MS-Chromatogramme von je zwei charakteristischen Massenübergängen der 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinone in einem Hämoglobinhydrolysat (Mischung aus Hämoglobinhydrolysaten für die Matrixkalibrierung) und einem Kalibrierstandard (Standardaddition, Matrixkalibrierung); <b>A</b> – GO-Val-His-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinon, <b>B</b> – MGO-Val-His-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinon, <b>C</b> – GO-Val-Leu-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinon, <b>D</b> – MGO-Val-Leu-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinon. ....	167
Abbildung 4-38: Chromatogramme von je zwei charakteristischen Massenübergängen von Fru-Lys (A), $^{13}C_6$ , $^{15}N_2$ -Fru-Lys (A), CML (B), $D_2$ -CML (B), CEL (C), MG-H (D) und $^{13}C_6$ -MG-H in	

- einem Matrixmix aus enzymatisch hydrolysiertem humanem Hämoglobin und einer Standardadditionsprobe dieses Matrixmixes.....169
- Abbildung 4-39: Gehalte von Fructosylvalin (A), des HbA<sub>1c</sub>-Werts (B) sowie Fructosyllysin (C) des Hämoglobins von Dialysepatienten (diabetisch und nicht-diabetisch) und einer Kontrollgruppe (normoglykämisch); Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Methoden: Abschnitt 3.7.8) mit dem Signifikanzniveau: \* ( $\alpha < 0,05$ ); \*\* ( $\alpha < 0,01$ ); \*\*\* ( $\alpha < 0,001$ ); n.s. (nicht signifikant,  $\alpha > 0,05$ ).....171
- Abbildung 4-40: Korrelationen von Fru-Val mit dem HbA<sub>1c</sub>-Wert (A:  $y = 0,99 x + 6,81$ ;  $R = 0,81^{***}$ ), von N- $\epsilon$ -Fru-Lys mit dem HbA<sub>1c</sub>-Wert (B:  $y = 1,53 x - 0,64$ ;  $R = 0,74^{***}$ ) und N- $\epsilon$ -Fru-Lys von mit Fru-Val (C : $y = 1,14 x + 6,26$ ;  $R = 0,72^{***}$ ), Ausgleichsgeraden bezogen auf alle Proben (Dialyse + Kontrolle). .....172
- Abbildung 4-41: Gehalte N-terminaler Glyoxal-AGEs im Hämoglobin von Dialysepatienten (diabetisch und nicht-diabetisch) und einer Kontrollgruppe (normoglykämisch); (A) CM-Val, (B) GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon (ohne Korrektur um Wiederfindung), (C) GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon (ohne Korrektur um Wiederfindung), (D) Summe N-terminaler Glyoxal-AGEs (Korrektur der Gehalte der 2(1H)-Pyrazinone um die Wiederfindung); — Mittelwert; Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Methoden: Abschnitt 3.7.8) mit dem Signifikanzniveau: \* ( $\alpha < 0,05$ ); \*\* ( $\alpha < 0,01$ ); \*\*\* ( $\alpha < 0,001$ ); n.s. (nicht signifikant,  $\alpha > 0,05$ ).....177
- Abbildung 4-42: Gehalte N-terminaler Methylglyoxal-AGEs des Hämoglobins von Dialysepatienten (diabetisch und nicht-diabetisch) und einer Kontrollgruppe (normoglykämisch); (A) CE-Val, (B) MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, (C) MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon, (D) Summe N-terminaler Methylglyoxal-AGEs; — Mittelwert; Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Methoden: Abschnitt 3.7.8) mit dem Signifikanzniveau: \* ( $\alpha < 0,05$ ); \*\* ( $\alpha < 0,01$ ); \*\*\* ( $\alpha < 0,001$ ); n.s. (nicht signifikant,  $\alpha > 0,05$ ). .....179
- Abbildung 4-43: Gehalte von CML (A), CEL (B) und MG-H (C) des Hämoglobins von Dialysepatienten (diabetisch und nicht-diabetisch) und einer Kontrollgruppe (normoglykämisch);— Mittelwert; Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Methoden: Abschnitt 3.7.8) mit dem Signifikanzniveau: \* ( $\alpha < 0,05$ ); \*\* ( $\alpha < 0,01$ ); \*\*\* ( $\alpha < 0,001$ ); n.s. (nicht signifikant,  $\alpha > 0,05$ ). .....181
- Abbildung 4-44: Bildung von MGO-2(1H)-Pyrazinonen und N- $\alpha$ -CE-Peptiden am Beispiel der Reaktion von Methylglyoxal mit Val-Leu .....185
- Abbildung 4-45: Darstellung der Korrelationen der Summe N-terminaler Glyoxal-AGEs (Summe CM-Val, GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit Fru-Val (A:  $y = 0,116 x - 2,351$ ;  $R = 0,89^{**}$ ), von CM-Val mit Fru-Val (B:  $y = 0,148 x - 3,725$ ;  $R = 0,79^*$ ) und von CML mit Fru-Lys (C:  $y = 0,136 x - 1,860$ ;  $R = 0,73^*$ ).....190
- Abbildung 4-46: Darstellung der Korrelation der Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs (Summe CM-Val, GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit CML (A:  $y = 0,368 x + 0,280$ ;  $R = 0,56^{n.s.}$ ), der negativen Korrelationen des GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons mit CM-Val (B:  $y = -0,038 x + 0,119$ ;  $R = -0,72^*$ ) und des GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinons mit CM-Val (C:  $y = -0,286 x + 0,737$ ;  $R = -0,77^*$ ); Gehalte der GO-2(1H)-Pyrazinone unter Berücksichtigung der Wiederfindung.....191
- Abbildung 4-47: Darstellung der Auftragung (Gehalte in Hämoglobinproben der Kontrollgruppe) des GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons gegen das GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon (A:  $y = 0,116 x +$

0,027; R = 0,80*), des GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinons gegen Fru-Val (B: $y = -0,027 x + 1,253$ ; R = 0,42 <sup>n.s.</sup> ), von CM-Val gegen CML (C: $y = 0,410 x - 0,236$ ; R = 0,43 <sup>n.s.</sup> ); Gehalte der GO-2(1H)-Pyrazinone unter Berücksichtigung der Wiederfindung. ....	192
Abbildung 4-48: Korrelationen der Summe N-terminaler Methylglyoxal-AGEs (Summe CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit Fru-Val (A: $y = 0,0080 x - 0,1405$ ; R = 0,71*), von CE-Val mit Fru-Val (B: $y = 0,0057 x - 0,1428$ ; R = 0,82**) und von CEL mit Fru-Lys (C: $y = 0,088 x - 2,55$ ; R = 0,57 <sup>n.s.</sup> ). ....	194
Abbildung 4-49: Korrelation des MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons mit Fru-Val (A: $y = 0,0017 x - 0,0328$ ; R = 0,74 <sup>n.s.</sup> ), des MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinons mit Fru-Val (B: $y = -0,0004 x + 0,805$ ; R = 0,13 <sup>n.s.</sup> ) und von MG-H mit Fru-Lys (C: $y = -0,037 x + 3,712$ ; R = 0,12 <sup>n.s.</sup> ). ....	195
Abbildung 4-50: Korrelationen der Summe N-terminaler Methylglyoxal-AGEs (Summe CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit CEL (A: $y = 0,038 x + 0,087$ ; R = 0,57 <sup>n.s.</sup> ) bzw. mit MG-H (B: $y = 0,020 x + 0,107$ ; R = 0,57 <sup>n.s.</sup> ), von CEL mit MG-H (C: $y = 0,221 x + 1,121$ ; R = 0,44 <sup>n.s.</sup> ). ....	196
Abbildung 4-51: Korrelationen der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs (Summe CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit CM-Val (A: $y = 0,057 x + 0,0376$ ; R = 0,66 <sup>n.s.</sup> ), von CEL mit CML (B: $0,689 x - 1,505$ ; R = 0,83**) und der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs (Summe CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit CML (C: $y = 0,044 x - 0,049$ ; R = 0,78*). ....	197
Abbildung 4-52: Korrelationen der Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs (Summe CM-Val, GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit CML (A: $y = 0,119 x + 1,638$ ; R = 0,19 <sup>n.s.</sup> ), der N-terminalen Glyoxal-AGEs (Summe CM-Val, GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit Fru-Val (B: $y = -0,0007 x + 2,4398$ ; R = 0,02 <sup>n.s.</sup> ) und von CML mit Fru-Lys (C: $y = 0,018 x + 5,335$ <sup>n.s.</sup> ). ....	198
Abbildung 4-53: Korrelationen der Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs (Summe CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit Fru-Val (A: $y = -0,0033 x + 0,4003$ ; R = 0,58 <sup>n.s.</sup> ), der Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs (Summe CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit dem HbA <sub>1c</sub> -Wert (B: $y = -0,0049 x + 0,4454$ ; R = -0,63*) sowie der Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs (Summe CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit Fru-Lys (C: $y = -0,0026 x + 0,4023$ ; R = -0,71*). ....	201
Abbildung 4-54: Korrelationen von CEL mit Fru-Lys (A: $y = 0,022 x + 1,819$ ; R = 0,27 <sup>n.s.</sup> ) und von MG-H mit Fru-Lys (B: $y = 0,041 x + 0,561$ ; R = 0,33 <sup>n.s.</sup> ). ....	202
Abbildung 4-55: RP-HPLC-Chromatogramme des Stärke-Peptid-Backmodells (220°C, pH = 7,4, 20 min) detektiert bei 320 nm von (a) Chinoxalinstandards, (b) Stärkekruste mit Zusatz von Val-Leu, (c) Stärkekruste ohne Zusatz von Val-Leu; 3-DG, 3-DPs, GO und MGO entsprechen den Peaks der abgeleiteten Chinoxaline. ....	207
Abbildung 4-56: Bildung von 3-DPs aus dem 1-Amino-1,4-dideoxyglucoson im Sauren; (A) hydrolytische beta-Dicarbonylspaltung; (B) Retro-Aldol-Spaltung. ....	208
Abbildung 4-57: Gehalte von 3-DPs (A), Glyoxal (B) und Methylglyoxal (C) in Stärkekrusten in Abhängigkeit vom pH-Wert. ....	209
Abbildung 4-58: RP-HPLC-Chromatogramme des Stärke-Peptid-Backmodells (220°C, pH = 7,4, 20 min) detektiert bei $\lambda = 320$ nm von (a) GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon-Standard, (b) Stärkekruste mit Zusatz von Val-Leu, (c) Stärkekruste ohne Zusatz von Val-Leu. ....	210

Abbildung 4-59: LC-MS/MS-Chromatogramme zur Identifizierung N-terminaler AGEs im Stärke-Peptid-Backmodell (220°C, pH = 7,4); zwei charakteristische Massenübergänge jedes Analyten in einer Stärkekruste mit Val-Leu, einer Stärkekruste ohne Val-Leu und einer Standardadditionsprobe nach Zusatz des jeweiligen authentischen Referenzstandards zu der Probe mit Val-Leu (außer D); A – CM-Val-Leu, B – CE-Val-Leu, C – GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, D – MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon.....	211
Abbildung 4-60: Interpretation der charakteristischen Massenübergänge von N-terminalen Dipeptid-AGEs (oben: Carboxyalkyldipeptid, unten: 2(1H)-Pyrazinon) in der ESI-MS/MS-Detektion am Beispiel von Val-Leu.....	212
Abbildung 4-61: Gehalte der Glyoxal- und Methylglyoxal-AGEs (A: GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinone und MGO- Val-Leu-2(1H)-Pyrazinone; B: CM-Val-Leu und CE-Val-Leu) im Stärke-Peptid-Backmodell in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	212
Abbildung 4-62: Bildung von Iminoglyoxal durch Retro-Aldol-Spaltung der 1-Imino-2-Oxo-3-Hydroxy-Form des 1-Amino-1,4-dideoxyglucosons in Anlehnung an <i>Hofmann et al. (1999)</i> . .....	215
Abbildung 4-63: Bildung des 6-Methyl- bzw. 5-Methyl-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons sowie von CE-Val-Leu aus der Reaktion von Val-Leu mit 3-DPs .....	217
Abbildung 4-64: Bildung von CM-Val-Leu, GO-Val-Leu-Pyrazinon und freien Glyoxals aus dem Iminoglyoxal .....	218
Abbildung 4-65: RP-HPLC-Chromatogramme des Glucose-Peptid-Backmodells (Kruste, 120 °C, pH = 5,6, 40 min) detektiert bei 280 nm von (a) FM-Val-Standard, (b) Probe mit Zusatz von Val-Leu und Glucose, (c) Probe mit Zusatz von Val-Leu, aber ohne Zusatz von Glucose, (d) Probe ohne Zusatz von Val-Leu, aber mit Zusatz von Glucose. ....	221
Abbildung 4-66: Quantitative Daten zur Bildung der Fru-Val-Xaa-Dipeptide in Inkubationen des Glucose-Peptide-Modells nach 40 min (Kruste (A): 100 °C, geschlossen, mit Wasser; Kruste (B): 120 °C, offen, nach Gefriertrocknung); Fehlerindikatoren geben die Spannweite aus einer Zweifachbestimmung an. ....	222
Abbildung 4-67: LC-MS/MS-Chromatogramme zur Identifizierung N-terminaler AGEs im Glucose-Peptid-Backmodell unter Krustenbedingungen (trocken, offen, 120°C, pH = 5,6); zwei charakteristische Massenübergänge jedes Analyten in Inkubationsproben (40 min) mit Val-His bzw. Val-Leu, sowie eines nicht erhitzten Blindwerts und einer Standardadditionsprobe nach Zusatz des jeweiligen authentischen Referenzstandards; A – CM-Val-His, B – GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon, C – CM-Val-Leu, D – GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon. ....	225
Abbildung 4-68: Quantitative Daten zur Bildung von CM-Val-Xaa-Peptiden (A) und Glyoxal-2(1H)-Pyrazinonen (B) in Inkubationen des Glucose-Peptide-Modells unter Krustenbedingungen (100 °C, geschlossen, mit Wasser); Fehlerindikatoren geben die Spannweite aus einer Zweifachbestimmung an; n.d. – nicht detektierbar. ....	225
Abbildung 4-69: Abschirmung des Nukleophils durch Carboxylgruppen in Val-Glu.....	227
Abbildung 4-70: Quantitative Daten zur Bildung von CM-Val-Xaa-Peptiden (A) und Glyoxal-2(1H)-Pyrazinonen (B) in Inkubationen des Glucose-Peptide-Modells unter Krustenbedingungen (120 °C, offen, nach Gefriertrocknung); Fehlerindikatoren geben die Spannweite aus einer Zweifachbestimmung an. ....	227
Abbildung 4-71: Reaktionssystem – N-terminale AGEs und freies Glyoxal als Nebenprodukte der Bildung des Amadori-Produkts (Vgl. Abschnitte 2.1.1, 2.1.3.2 und 2.1.3.3): A ( <i>Glomb &amp;</i>	

---

*Monnier, 1995*); **B** (*Hayashi & Namiki, 1980; Glomb & Monnier, 1995*); **C** (*Hofmann et al., 1999*); **D** Oxidation (*Hofmann et al., 1999*), Umlagerung und hydrolytische  $\beta$ -Spaltung (*Davidek et al., 2006a*), weitere Oxidation; **E** (*Kasper & Schieberle, 2005*); **F** direkter oxidativer Abbau Amadori-Produkt (*Ahmed et al., 1986*) bzw. mechanistisch über Oxidation 2,3-Enaminol mit anschließender oxidativer  $\alpha$ -Spaltung (*Davidek et al., 2006b*); **G** Oxidation (*Hofmann et al., 1999*) und hydrolytische  $\beta$ -Spaltung (*Davidek et al., 2006a*)..... 231

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Anteile der Anomeren Formen von Fructose und Fructosylaminen ( <i>Mossine et al., 1999</i> )	5
Tabelle 2-2: Furosin/Fructosyllysin in Lebensmitteln .....	31
Tabelle 2-3: N- $\alpha$ -FM- bzw. Fru-Aminosäuren in Lebensmitteln.....	34
Tabelle 2-4: CML und CEL in ausgewählten Lebensmitteln.....	37
Tabelle 2-5: 1,2-Dicarbonylverbindungen in Erythrozyten .....	45
Tabelle 2-6: 1,2-Dicarbonylverbindungen in Plasma.....	46
Tabelle 2-7: Aminosäurezusammensetzung des Hämoglobins.....	59
Tabelle 2-8: MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin in humanem Hämoglobin .....	60
Tabelle 2-9: CM-Val bzw. CM-Val-Hämoglobin (CM-Val-Hb) und GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon in humanem Blutproben .....	62
Tabelle 3-1: Verwendete Chemikalien.....	67
Tabelle 3-2: Materialien.....	69
Tabelle 3-3: Verwendete Geräte .....	70
Tabelle 3-4: Fraktionierung der Syntheseansätze der Fructosylderivate mittels Flash-Chromatographie .....	74
Tabelle 3-5: Parameter semipräparative RP-HPLC zur Isolierung von FM-Val .....	76
Tabelle 3-6: Parameter semipräparative RP-HPLC zur Isolierung von 2(1H)-Pyrazinonen .....	79
Tabelle 3-7: Synthese von Carboxyalkylderivaten .....	83
Tabelle 3-8: Fraktionierung der Syntheseansätze der Carboxyalkylderivate mittels IEC.....	84
Tabelle 3-9: pH-Werte in Backwaren .....	87
Tabelle 3-10: Fließmittelsysteme der Dünnschichtchromatographie.....	89
Tabelle 3-11: Detektionsreagenzien für Dünnschichtchromatographie und Tüpfeltest.....	89
Tabelle 3-12: Elutionsbedingungen bei LC-MS/MS zur Identifizierung der Amadori-Produkte.....	90
Tabelle 3-13: Elutionsbedingungen bei RP-HPLC-CLND zur Gehaltsbestimmung für Amadori-Produkte .....	92
Tabelle 3-14: Elutionsbedingungen und Parameter der Massendetektion zur Quantifizierung von FM-Val .....	93
Tabelle 3-15: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung von FM-Val in Modellbackwaren .....	94
Tabelle 3-16: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung von 2(1H)-Pyrazinonen in Modellinkubationen.....	95
Tabelle 3-17: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung von CM-Val-Xaa-Dipeptiden in Modellinkubationen.....	96
Tabelle 3-18: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung von CM- und CE-Val-Leu in Proben des Stärke-Peptid-Backmodells .....	96
Tabelle 3-19: Parameter der Massendetektion zur Quantifizierung von CM-Val-Xaa-Dipeptiden in Modellinkubationen.....	96
Tabelle 3-20: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung von Chinoxalinen in Modellinkubationen .....	98
Tabelle 3-21: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung des GO- und des MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons in Inkubationsproben des Stärke-Peptid-Backmodells.....	98

Tabelle 3-22: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung N-terminaler MRPs in Hämoglobin nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure .....	100
Tabelle 3-23: Parameter der Massendetektion zur Quantifizierung N-terminaler MRPs in Hämoglobin nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure .....	100
Tabelle 3-24: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zur Quantifizierung N-terminaler MRPs in Hämoglobin nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure .....	101
Tabelle 3-25: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung von CM-Val-Xaa-Dipeptiden in Modellinkubationen .....	103
Tabelle 3-26: Parameter der Massendetektion zur Quantifizierung der MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin in Hämoglobin nach enzymatischer Hydrolyse .....	103
Tabelle 3-27: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zur Quantifizierung der MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin in humanem Hämoglobin nach enzymatischer Hydrolyse .....	104
Tabelle 3-28: Proben- und Elutionspuffer Aminosäureanalyse .....	105
Tabelle 3-29: Elutionssystem Aminosäureanalyse .....	105
Tabelle 3-30: Ablauf IEC: Entzuckerung und Fraktionierung mit Anionentauscher .....	107
Tabelle 4-1: Fragmentierung Fru-Val und Fructosyldipeptide .....	121
Tabelle 4-2: Umsatzraten von Fru-Val-Amadori-Produkten zu FM-Val nach Umsetzung in Salzsäure .....	123
Tabelle 4-3: pK <sub>S</sub> -Werte von Valin und Valyldipeptiden .....	124
Tabelle 4-4: Entwicklung des pH-Werts während der Inkubation der Peptide mit Glucose in PBS-Puffer .....	129
Tabelle 4-5: Gegenüberstellung des pK <sub>S</sub> -Werts bzw. der Nucleophilie der N-terminalen Aminogruppe mit der Reaktivität zum Amadori-Produkt .....	131
Tabelle 4-6: Entwicklung des pH-Werts während der Inkubation der Peptide mit Glyoxal in PBS-Puffer .....	136
Tabelle 4-7: Gegenüberstellung des pK <sub>S</sub> -Werts der N-terminalen Aminogruppe von Dipeptiden mit der Reaktivität gegenüber Glyoxal .....	138
Tabelle 4-8: Fragmente des Massenspektrums von FM-Val .....	161
Tabelle 4-9: Fragmente des Massenspektrums von CM-Val und CE-Val .....	162
Tabelle 4-10: Fragmente des Massenspektrums der 2(1H)-Pyrazinone .....	165
Tabelle 4-11: Fructosylderivate in humanem Hämoglobin .....	170
Tabelle 4-12: Gehalte N-terminaler Glyoxal-AGEs in humanem Hämoglobin .....	175
Tabelle 4-13: Gehalte N-terminaler AGEs des Methylglyoxals in humanem Hämoglobin .....	177
Tabelle 4-14: AGEs der Seitenketten von Lysin und Arginin in humanem Hämoglobin .....	180
Tabelle 4-15: MRPs in humanem Hämoglobin – Derivatisierungsgrad der reaktiven Aminogruppen .....	183
Tabelle 4-16: Korrelationen der MRPs im humanen Hämoglobin der Probanden der Kontrollgruppe (n = 9) .....	188
Tabelle 4-17: Korrelationen der MRPs in humanem Hämoglobin von Dialysepatienten (n = 11) .....	199
Tabelle 4-18: Gehalte N-terminaler AGEs in Stärkekrusten in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	213
Tabelle 4-19: Gegenüberstellung des pK <sub>S</sub> -Werts bzw. der Nucleophilie der N-terminalen Aminogruppe der Dipeptide mit der Reaktivität zu den Amadori-Produkten und N-terminalen AGEs in den Backmodellen (Krume, Kruste) .....	223

## Abkürzungsverzeichnis

Für Aminosäuren wurden die konventionellen Abkürzungen verwendet (*IUPAC-IUB, 1984*)

AGE	Advanced glycation endproduct
2,3-BPG	2,3-Bisphosphoglycerat
CEL	N- $\epsilon$ -Carboxyethyllysin
CLND	chemiluminescent nitrogen detector
CML	N- $\epsilon$ -Carboxymethyllysin
d	Durchmesser
3-DF	3-Desoxyfructose
3-DG	3-Desoxyglucoson
3-DPs	3-Desoxypentosen
Fru-	Fructosyl-
GO	Glyoxal
Hb	Hämoglobin
HbA <sub>0</sub>	adultes Hämoglobin, Fraktion 0 (Abschnitt 2.3.4)
HbA <sub>1c</sub>	adultes Hämoglobin, Fraktion 1c, Derivatisierung zum N-terminalen Fructosylderivat an einer oder beiden $\beta$ -Ketten (Abschnitt 2.3.4)
HD	Hämodialyse
HPAEC-PAD	<i>high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection</i> , Hochleistungsanionenaustauschromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion
IEC	<i>ion exchange chromatography</i> , Ionenaustauschchromatographie
MG-H	Methylglyoxal-Hydroimidazolone (MG-H1, MG-H2, MG-H3)
MGO	Methylglyoxal
MRP	Maillard-Reaktionsprodukte
n.s.	nicht signifikant
PBS	phosphatgepufferter Kochsalzlösung
PD	Peritonealdialyse
R	Korrelationskoeffizient
v	Volumenanteil
Val	Valin
Val-Leu	Valyl-Leucin
Val-His	Valyl-Histidin
Val-Ser	Valyl-Serin
Val-Tyr	Valyl-Tyrosin

Val-Glu	Valyl-Glutaminsäure
w	Gewichtsanteil
Xaa	Drei-Buchstaben-Code für eine beliebige Aminosäure

# 1 Einleitung und Zielstellung

Kohlenhydrate und Proteine gehören neben Wasser und Fetten zu den quantitativ bedeutendsten Grundbestandteilen biologischer Systeme und der Lebensmittel. Unter milden Bedingungen in lebenden Organismen oder unter thermischer Belastung bei der Lebensmittelverarbeitung können reduzierende Zucker und Aminosäuren interagieren. Die Zucker werden durch die Abspaltung von Wasser und Fragmentierungen des Kohlenstoffgerüsts abgebaut, wobei die noch reaktiveren 1,2-Dicarbonylverbindungen entstehen. Diese können erneut mit Aminosäuren reagieren. Die Aminofunktionen von Aminosäuren wirken beim Abbau der Zucker katalytisch. Die funktionellen Gruppen der Seitenketten und die N- $\alpha$ -Aminogruppe der Aminosäuren können in Folgereaktionen in stabile Endprodukte eingebaut werden.

Insbesondere bei der Verarbeitung von Lebensmitteln bei hohen Temperaturen resultieren aus diesen Reaktionen aromaaktive Verbindungen und Bräunungsprodukte. Die Entstehung dieser Stoffe kann beabsichtigt oder unerwünscht sein, weshalb frühe, sensorisch unauffällige Zwischenprodukte als Indikatoren zur Prozesskontrolle eingesetzt werden können (*Ames, 1990*). Die Bildung von Bräunungsprodukten aus Zuckern und Aminosäuren wurde erstmals von dem Mediziner und Naturwissenschaftler *L.-C. Maillard (1912)* dokumentiert, weshalb das vielfältige Reaktionssystem der nicht-enzymatischen Bräunung unter dem Begriff der „Maillard-Reaktion“ zusammengefasst wird. Weniger stabile Zwischenprodukte und die stabilen Endprodukte der verschiedenen Reaktionsstufen werden als „Maillard-Produkte“ (MRPs) bezeichnet.

Alimentär aufgenommene, modifizierte Aminosäuren können nicht in körpereigene Proteine eingebaut werden, aber aus der Reaktion mit Glucose oder 1,2-Dicarbonylverbindungen können proteingebundene Maillard-Produkte *in vivo* entstehen. Diese nicht-enzymatische, posttranslationale Modifizierung von Proteinen wird allgemein als Glykierung bezeichnet und kann die Funktionalität von Proteinen beeinträchtigen. Deshalb wird untersucht, ob beispielsweise die Trübung der Augenlinsen, die Versteifung von Blutgefäßen oder Schädigungen von Nervenzellen durch eine erhöhte Glykierung verursacht werden. Diese Veränderungen treten unter anderem im Zusammenhang mit Stoffwechselkrankheiten wie Diabetes mellitus und Urämie auf, die durch eine erhöhte Glucosekonzentration bzw. die Anreicherung von 1,2-Dicarbonylverbindungen im Blut gekennzeichnet sind.

Zur Bewertung des Glykierungsstatus *in vivo* wird in der medizinischen Diagnostik ermittelt, wie stark die N-terminalen Aminogruppen der  $\beta$ -Ketten des Hämoglobins mit Glucose derivatisiert sind (HbA<sub>1c</sub>-Wert). Eine Untersuchung der Glykierungsstellen des Hämoglobins ergab, dass der N-Terminus der  $\alpha$ -Ketten nur 10% der Glykierung der  $\beta$ -Ketten aufwies, obwohl beide Ketten mit einem Valin beginnen (*Shapiro et al., 1980*). Für diese stärkere Derivatisierung der  $\beta$ -Kette durch Glucose werden verschiedene Ursachen wie die Zugäng-

lichkeit und katalysierende Nachbargruppen diskutiert. Darüber hinaus wurde für die Reaktion der N-terminalen Aminogruppen von Di- und Tripeptiden mit Glycerinaldehyd bzw. 1,2-Dicarbonylverbindungen festgestellt, dass der Umsatz der Peptide von der Aminosäuresequenz abhängig ist (*Krause et al., 2004; Mori et al., 1989*).

Als erste stabile Reaktionsprodukte aus der Reaktion von N-terminalen Aminogruppen von Peptiden mit Aldosen wie der Glucose entstehen Amadori-Produkte. Aus deren Abbau bzw. der Reaktion von Peptiden mit 1,2-Dicarbonylverbindungen wie Glyoxal oder Methylglyoxal können als N-terminale AGEs (Advanced Glycation Endproducts) Carboxyalkylderivate oder 2(1*H*)-Pyrazinone entstehen (*Prey and Petershofer, 1968; Van Chuyen et al., 1973b*).

Zwar gibt es Studien zur Bildung N-terminaler Amadori-Produkte an Hämoglobin (*Shapiro et al., 1980*) und in Lebensmitteln (*Reutter and Eichner, 1989*), aber die Bildung N-terminaler AGEs wurde bisher kaum untersucht. In Hämoglobin wurden bisher das N-terminale Carboxymethylvalin (CM-Val, *Cai & Hurst, 1999*) und das Glyoxal-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon (*Kunert, 2009*) nachgewiesen. Im  $\beta$ -Lactoglobulin der Milch konnten die N-terminalen CM- und Carboxyethyl(CE)-Derivate nach Erhitzung mit Lactose detektiert werden (*Meltretter et al., 2013*). 2(1*H*)-Pyrazinone wurden erstmals in Zuckerfabrikationssäften identifiziert (*Prey and Petershofer, 1968*) und konnten in Backwaren nach gezieltem Zusatz eines Peptids nachgewiesen werden (*Kunert, 2009*).

In der vorliegenden Arbeit soll die sequenzabhängige Bildung N-terminaler Amadori-Produkte und N-terminaler AGEs unter physiologischen Bedingungen systematisch untersucht werden. Dabei soll geklärt werden, wie die Variation der C-terminalen Aminosäure (Leu, His, Ser, Tyr, Glu) in Valyldipeptiden die Produktbildung hinsichtlich Umsatz und Produktspektrum beeinflusst.

Hämoglobin ist ein langlebiges körpereigenes Protein, das für Untersuchungen leicht gewonnen werden kann. Deshalb ist es besonders geeignet um die Bildung N-terminaler AGEs *in vivo* zu untersuchen. Zum Nachweis N-terminaler AGEs der Hämoglobinketten in humanen Blutproben, soll eine geeignete Methode entwickelt werden. Anschließend soll untersucht werden, ob sich das Hämoglobin von Dialysepatienten hinsichtlich der N-terminalen Glykierung und den Gehalten ausgewählter MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin vom Hämoglobin der Probanden einer Kontrollgruppe unterscheidet.

Um einen Einblick in die Bildung N-terminaler AGEs in Lebensmitteln zu gewinnen, soll das Produktspektrum in einem Backmodell untersucht werden. Zur Bewertung der Abhängigkeit des Produktspektrums von den Reaktionsbedingungen sollen die von Glyoxal und Methylglyoxal abgeleiteten Carboxyalkylderivate und 2(1*H*)-Pyrazinone betrachtet werden. Dabei wird der typische pH-Bereich von Backwaren berücksichtigt. In Lebensmittelsystemen können viele unterschiedliche Peptide erwartet werden. Um den Einfluss der Peptidsequenz auf das Produktspektrum beurteilen zu können, sollen die fünf Valyldipeptide Val-Leu, Val-His, Val-Ser, Val-Tyr und Val-Glu im Backmodell eingesetzt werden.

## 2 Hintergrund und Wissensstand

### 2.1 Die Maillard-Reaktion

In diesem Abschnitt werden Kenntnisse zu grundlegenden Zusammenhängen in der Reaktionskaskade der Maillard-Reaktion zusammengefasst, die zum Verständnis der Experimente und Ergebnisse beitragen sollen.

Die Maillard-Reaktion (nicht-enzymatische Bräunung) umfasst allgemein die Reaktion von Zuckern und Aminen, die in letzter Konsequenz zu Aroma, Geschmack und Farbe von erhitzten Lebensmitteln beiträgt, aber auch unter milden physiologischen Bedingungen charakteristische Folgeprodukte hervorbringt. Benannt wurde die Reaktion nach dem französischen Mediziner und Biochemiker Louis-Camille Maillard, der erste systematische Experimente mit verschiedenen Mono- und Disacchariden sowie Aminosäuren durchführte und seine Erkenntnisse zu diesem Thema ab 1912 publizierte (*Maillard, 1912*). *Hodge (1953)* ordnete die verfügbaren wissenschaftlichen Erkenntnisse zur nicht-enzymatischen Bräunung und erstellte eine Systematik, die die Maillard-Reaktion in drei Phasen unterteilt. Dabei ist zu beachten, dass die den Phasen zugeordneten Teilreaktionen zeitlich parallel ablaufen können (*Hodge, 1953*).

In der frühen Phase reagieren Zucker mit Aminen zu Kondensationsprodukten und es findet die Amadori-Umlagerung statt. Diese beschreibt nach der Kondensation einer Aldose mit einem Amin die Umlagerung über Keto-Enol-Tautomerie vom 1-Imino-Zucker zur 1-Amino-1-desoxy-Ketose und ist benannt nach dem italienischen Chemiker Mario Amadori. Eine entsprechende Umlagerung des 2-Imino-Zuckers zur 2-Amino-2-desoxy-Aldose nach Reaktion einer Ketose mit einem Amin geht auf den deutschen Chemiker Kurt Heyns zurück.

Die fortgeschrittene Phase ist nach *Hodge (1953)* durch die Dehydratisierung und Fragmentierung von Zuckern sowie den Abbau von Aminosäuren charakterisiert. Dabei werden Amadori- und Heyns-Produkte abgebaut, Dicarbonylverbindungen freigesetzt und es kann eine Zunahme der Absorption im nahen UV, aber noch keine Farbbildung bzw. nur eine schwache Gelbfärbung, beobachtet werden.

Die eigentliche „Bräunung“ entsteht erst in der späten Phase, wobei durch Reaktionen wie Aldol-Kondensation, Aldehyd-Amin-Polymerisation und Bildung heterocyclischer Stickstoffverbindungen die sogenannten Melanoidine als sehr heterogene Produktgruppe entstehen (*Hellwig and Henle, 2014; Ledl and Schleicher, 1990*).

In der vorliegenden Arbeit werden einerseits ausgewählte Aspekte der Maillard-Reaktion in einem Lebensmittelsystem und andererseits mit physiologischem Hintergrund untersucht. In Lebensmitteln wirkt sich dabei die große Vielfalt an Mono-, Oligo- und Polysacchariden auf

der einen, die von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen auf der anderen Seite auf die Komplexität der Reaktionssysteme und Diversität der Reaktionsprodukte aus. *In vivo* steht als Kohlenhydrat hauptsächlich Glucose zur Verfügung und kann mit Aminosäuren, Peptiden und Proteinen reagieren.

### 2.1.1 Das Amadori-Produkt

#### 2.1.1.1 Reaktivität von Sacchariden

In Lebensmitteln und physiologischen Systemen können als Reaktionspartner für Aminofunktionen Saccharide unterschiedlicher Kettenlängen auftreten. Dabei kann allgemein festgestellt werden, dass Pentosen reaktiver sind als Hexosen, was über den höheren Anteil der offenkettigen Form begründet werden kann. Das gleiche Argument gilt für die Unterschiede in der Reaktivität im Vergleich verschiedener Pentosen bzw. verschiedener Hexosen (*Laroque et al., 2008*). Die Eigenschaft der Glucose, unter den Hexosen den geringsten Anteil der offenkettigen Carbonylform und damit die geringste spontane Reaktivität aufzuweisen, wurde von *Bunn & Higgins (1981)* als Begründung ihrer starken Verbreitung in biologischen Systemen interpretiert (*Bunn and Higgins, 1981*).

#### 2.1.1.2 Bildung des Amadori-Produkts am Beispiel der Reaktion von Glucose mit primären Aminogruppen von Aminosäuren

Die Ringöffnung der Glucose kann sowohl durch Säuren als auch Basen katalysiert werden. Nach der Öffnung des Rings zur Carbonylform kann sich erneut ein Halbacetal bilden, wobei sich eine für die Glucose charakteristische Gleichgewichtslage zwischen den Formen ausbildet. Dieser Vorgang wird als Mutarotation bezeichnet. Glucose liegt in wässriger Lösung (pH = 6,0, 37 °C) überwiegend als  $\beta$ -Pyranose (60,5%), in geringeren Anteilen als  $\alpha$ -Pyranose (39,1%),  $\beta$ -Furanose (0,22%) bzw.  $\alpha$ -Furanose (0,19%), aber nur zu einem Anteil kleiner als 0,01% offenkettig vor (*Maple and Allerhand, 1987*). *Lowry (1903)* konnte feststellen, dass die Mutarotation der Glucose im Basischen deutlich schneller abläuft als im Säuren und *Brönsted & Guggenheim (1927)* beobachteten einen direkten Zusammenhang zwischen der Stärke einer Säure bzw. Base und der katalytischen Aktivität auf die Mutarotation (*Brönsted and Guggenheim, 1927; Lowry, 1903*). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Geschwindigkeit der Mutarotation für Glucose ein Minimum im pH-Bereich zwischen 2 und 7 durchläuft (*Belitz et al., 2008*).

Erfolgt ein nukleophiler Angriff der N- $\alpha$ -Amino-Gruppe einer Aminosäure bzw. der N- $\epsilon$ -Amino-Gruppe des Lysins auf die Carbonylfunktion der Glucose unter Abspaltung eines Moleküls Wasser, entsteht ein Imin (Schiff'sche Base, Abbildung 2-1). Die Schiff'sche Base ist in der offenkettigen Form besonders instabil, weshalb über spektroskopische Methoden ausschließlich die  $\alpha$ - und  $\beta$ -pyranoiden Formen (Glucosylamin) nachgewiesen werden konnten (*Mossine et al., 1999; Neglia et al., 1983*).

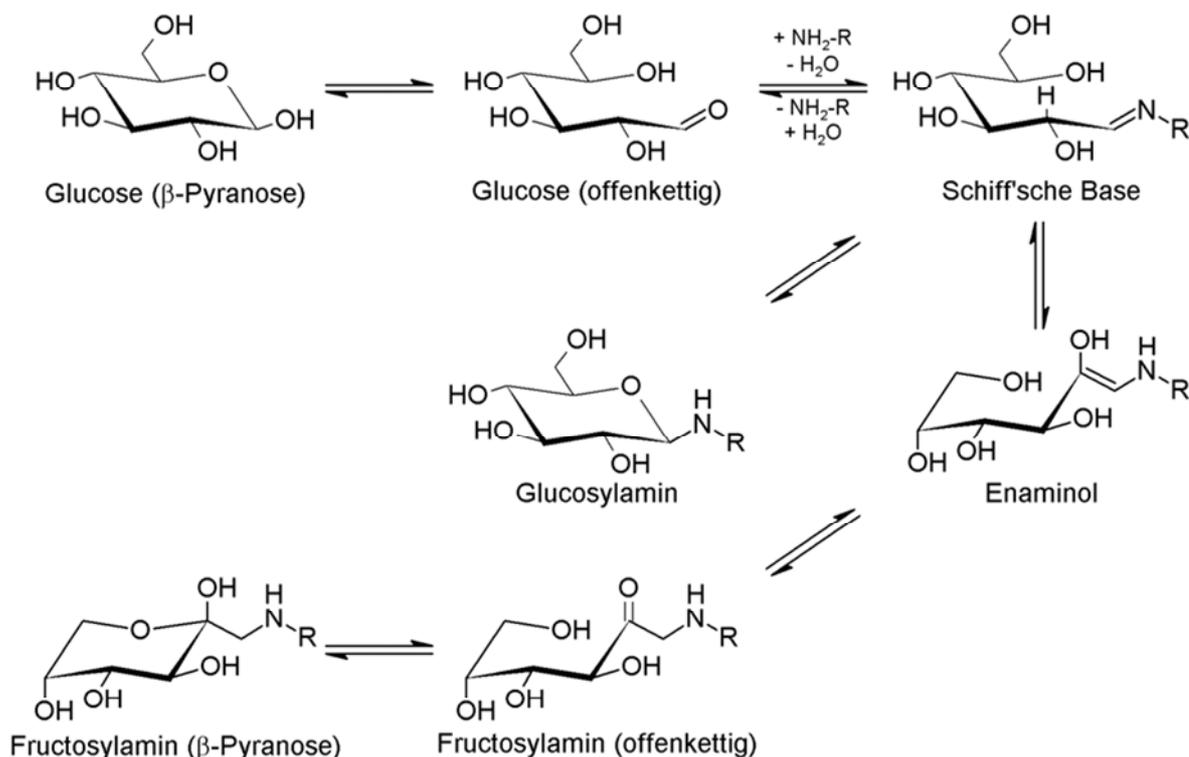


Abbildung 2-1: Bildung Amadori-Produkt

Glycosylamine sind instabile Zwischenprodukte, die zu den Edukten zerfallen oder durch die Amadori-Umlagerung in ein stabiles Produkt überführt werden können. Wie in Abbildung 2-1 gezeigt, kann durch Keto-Enol-Tautomerie über das 1-Amino-1-en-2-ol (1,2-Enaminol) als Zwischenverbindung der 1-Amino-1-desoxy-2-Keto-Zucker (Amadori-Produkt) gebildet werden. Bei der Bildung des Amadori-Produkts in neutraler Lösung gilt die Bildung des 1,2-Enaminols als geschwindigkeitsbestimmender Schritt. Nur dieser Teilschritt ist basisch katalysiert, alle anderen Reaktionsschritte sind protonenkatalysiert (*Yaylayan and Huyghues-Despointes, 1994*). Ist Glucose das Edukt, wird das Amadori-Produkt als Fructosylamin bezeichnet. Fructosylamine liegen in wässriger Lösung überwiegend als  $\beta$ -Pyranose (ca. 70%) vor. Die Verteilung der pyranoiden, furanoiden und offenkettigen Formen ähnelt dabei den Verhältnissen der Fructose (Tabelle 2-1, *Mossine et al., 1999*). Die Stabilität des Amadori-Produkts erlaubt dessen Quantifizierung in Lebensmitteln und biologischen Proben.

Tabelle 2-1: Anteile der Anomeren Formen von Fructose und Fructosylaminen (*Mossine et al., 1999*)

Verbindung	Anomere Formen [%]				
	$\alpha$ -pyranoid	$\beta$ -pyranoid	$\alpha$ -furanoid	$\beta$ -furanoid	offenkettig
Fructose	2	70	5	23	0,7
N- $\alpha$ -Fructosyllysin	5	74	10	11	< 1
N- $\epsilon$ -Fructosyllysin	4	70	13	13	< 1

### 2.1.1.3 Einfluss des $pK_S$ -Werts der Aminogruppe auf die Bildung der Schiff'schen Base und des Amadori-Produkts

Die Bildungsrate des Amadori-Produkts an einer  $\alpha$ - oder  $\epsilon$ -Aminogruppe einer Aminosäure ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dabei sind sowohl die Bildungsrate der Schiff'schen Base wie auch die Rate der Amadori-Umlagerung zu berücksichtigen (*Watkins et al., 1985*). Ein niedriger  $pK_S$ -Wert der Aminogruppe und damit ein höherer deprotonierter Anteil begünstigt den nukleophilen Angriff an der Carbonylfunktion des Zuckers und somit die Bildung der Schiff'schen Base. Der  $pK_S$ -Wert ist von der Molekülstruktur, also der Position der Aminogruppe im Molekül und bei N-terminalen Aminogruppen von der Seitenkette der Aminosäure, der Kettenlänge des Peptids sowie von räumlich benachbarten funktionellen Gruppen (Primärstruktur oder 3D-Struktur) abhängig.

Der  $pK_S$ -Wert der N- $\alpha$ -Aminogruppe von Aminosäuren liegt zwischen 8,4 für Cystein und 9,7 für Glutaminsäure und Isoleucin. Ausgehend von der freien Aminosäure Lysin mit einem  $pK_S$ -Wert der N- $\alpha$ -Aminogruppe von 8,9 sinkt dieser in den Peptiden Di-Lysin auf 7,5 und Tri-Lysin auf 7,3. Die Kettenverlängerung wirkt sich bei Lysin auch auf den  $pK_S$ -Wert der N- $\epsilon$ -Aminogruppe aus. Dieser hat in freiem Lysin den Wert 10,3, aber in dem Modellpeptid Tri-Lysin liegen die  $pK_S$ -Werte bei 9,8 (N-terminales Lysin), 10,5 (Position zwei) bzw. 11,3 (C-terminal) (*Belitz et al., 2008*). Im aktiven Zentrum boviner Pankreas-RNase (Lys-41) liegt der Wert bei nur 8,8 (*Watkins et al., 1985*).

*Mori et al. (1989)* beobachteten bei der Umsetzung von Dipeptiden und Tripeptiden mit Glycerinaldehyd, dass sich die Verlängerung der Peptidkette direkt auf die Reaktivität auswirkt. Tripeptide wurden 3- bis 5-fach schneller umgesetzt als Dipeptide. Sie ermittelten ebenfalls, dass das pH-Optimum der Umsetzungsgeschwindigkeit für die untersuchten Dipeptide bei pH = 6,5 bis 8 und für die Tripeptide bei pH = 8,5 bis 10 lag.

*Watkins et al. (1985)* fanden für das Lysin (Lys-1) am N-Terminus der RNase, dass die N- $\alpha$ -Aminogruppe [ $pK_S(N-\alpha) \approx 7,8$ ] im Vergleich zur N- $\epsilon$ -Aminogruppe [ $pK_S(N-\epsilon) \approx 10,5$ ] 6-fach höhere Gehalte der Schiff'schen Base, aber nur 1,5-fach höhere Gehalte des Amadori-Produkts ausbildet. Der niedrigere  $pK_S$ -Wert der  $\alpha$ -Aminogruppe begünstigt also die Bildung der Schiff'schen Base, aber die Umlagerung zum Amadori-Produkt ist an der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins effektiver. Als grundsätzliche Einflussfaktoren auf Unterschiede in der Umlagerungsrate zwischen primären Aminogruppen in RNase wurden die Nähe zu basischen Gruppen (Histidin, Arginin) und zu Phosphatbindungsstellen diskutiert. Ob diese Effekte auch für den Unterschied in der Umlagerungsrate zwischen der N- $\alpha$ - und der N- $\epsilon$ -Aminogruppe an Lys-1 verantwortlich sein können, wurde nicht besprochen.

### 2.1.1.4 Nachbargruppeneffekte

*Mori et al. (1989)* diskutieren den Einfluss von benachbarten funktionellen Gruppen auf die Reaktivität der N-terminalen Aminogruppe von Peptiden. Für die Reaktion der N-terminalen Aminogruppe von Dipeptiden mit Glycerinaldehyd fanden sie erhöhte Umsatzraten mit einer

basischen Aminosäure in zweiter Position im Vergleich zu einer weiteren neutralen Aminosäure. Besonders gering war der Umsatz mit einer sauren Aminosäure in Position zwei (*Mori et al., 1989*).

*Venkatraman et al. (2001)* untersuchten in  $\alpha$ -helikalen Modellpeptiden den Einfluss räumlich nahestehender funktioneller Seitenketten. Sie fanden geringere Bildungsraten der Schiff'schen Base an der N- $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysyl-Rests sowohl bei einem räumlich benachbarten Histidyl- als auch Aspartyl-Rest und vermuteten Effekte, die den  $pK_S$ -Wert der Aminogruppe erhöhen. Im Gegensatz dazu fanden Sie für die Bildung des Amadori-Produkts höhere Gehalte bei nahestehendem Histidyl- oder Aspartyl-Rest im Vergleich zum Blindwert mit neutraler Aminosäure. Besonders günstig wirkte sich Asparaginsäure auf die Amadori-Umlagerung aus. Aber auch Histidin zeigte einen deutlich positiven Effekt. Als Erklärung wurde die Möglichkeit zur Protonenabstraktion bei leicht basischem pH-Wert angeführt. Die Begünstigung der Umlagerung hat folglich einen größeren Einfluss auf die Produktbildung als die Benachteiligung der Ausbildung der Schiff'schen Base (*Venkatraman et al., 2001*).

*Iberg & Flückiger (1986)* untersuchten die Glykierungsstellen an Serumalbumin und fanden für den am stärksten glykierten Lysyl-Rest die direkte Nachbarschaft zu einem zweiten Lysin und für weitere günstige Glykierungsstellen die Sequenzen Lys-His bzw. Lys-His-Lys. Die Autoren schlossen auf einen positiven Einfluss benachbarter basischer Gruppen (*Iberg and Flückiger, 1986*).

*Johansen et al. (2006)* nutzten vorhandene experimentelle Daten aus der Literatur mit dem Ziel computergestützt Glykierungsstellen an humanen Proteinen vorherzusagen. Sie schlussfolgerten, dass in N-terminaler Richtung nahe gelegene basische und in C-terminaler Richtung nahegelegene saure Aminosäureseitenketten die Bildung von Amadori-Produkten an proteingebundenem Lysin begünstigen (*Johansen et al., 2006*).

#### 2.1.1.5 Einflussfaktoren auf die Bildung der Schiff'schen Base und des Amadori-Produkts an humanem Hämoglobin

*Shapiro et al. (1980)* zeigten, dass in *in vitro*-Experimenten, aber auch *in vivo*, der N-Terminus der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins 10-fach höhere Amadori-Produkt-Gehalte aufweist als der N-Terminus der  $\alpha$ -Kette (*Shapiro et al., 1980*). Für die Reaktion von Hämoglobin mit Glycerinaldehyd in Phosphat-Puffer konnte der gleiche Grad der Bildung der Schiff'schen Base an der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette beobachtet werden, aber die  $\beta$ -Kette wies 20-fach höhere Amadori-Produkt-Gehalte auf (*Acharya and Manning, 1980; Acharya et al., 1983*). Als Ursache für diese Diskrepanz wird die unterschiedliche Lage der N-Termini in der 3D-Struktur des Hämoglobins gesehen. Das N-terminale Valin der  $\beta$ -Kette befindet sich in einer basischen Mikroumgebung, die auch als Bindungsstelle für 2,3-Bisphosphoglycerat (2,3-BPG) fungiert (*Watkins et al., 1987*). Daraus ist zu schließen, dass auch unter physiologischen Bedingungen bei der Bildungsreaktion des Amadori-Produkts am Hämoglobin nicht der initiale nukleophile Angriff auf die Glucose und die Bildung der Schiff'schen Base entscheidend ist, sondern die

Bildung des Enaminols bei der Amadori-Umlagerung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.

Sowohl für basische Gruppen als auch für daran gebundenes Phosphat werden Protonenkatalysierende Effekte diskutiert. *Smith et al. (1982)* beobachteten eine 2-fach höhere Glykierung des Desoxy-Hämoglobins im Vergleich zum Oxy-Hämoglobin bei einer Inkubation von Erythrozyten *in vitro* (*Smith et al., 1982*). Da Hämoglobin bei der Bindung von Sauerstoff eine Änderung in seiner 3D-Struktur erfährt, liegt der N-Terminus der  $\beta$ -Kette im Oxy-Hämoglobin weiter von der basischen Bindungsstelle entfernt. *Lowrey et al. (1985)* fanden ebenfalls eine stärkere Glykierung des Desoxy-Hämoglobins und außerdem eine signifikant höhere Bildungsgeschwindigkeit (ca. 15%) der Schiff'schen Base in Anwesenheit von 2,3-BPG (*Lowrey et al., 1985*). Dieser Aspekt deutet auf eine mögliche Phosphat-Katalyse hin. *In vitro* Experimente zeigten weiterhin, dass sowohl anorganisches Phosphat als auch organisches Phosphat (2,3-BPG) die Reaktion der N-Termini des Hämoglobins mit Glucose begünstigen (*Watkins et al., 1987*). *Phillips und Thornalley (1993)* interpretieren den katalytischen Effekt von Phosphat-Ionen bei Zucker-Amin-Reaktionen indem Dehydratisierung und Enolisierung an Saccharidstrukturen erleichtert werden (*Phillips and Thornalley, 1993*).

Wie bereits für Modellpeptide beschrieben begünstigt ein niedriger  $pK_S$ -Wert einen höheren Anteil nicht-protonierter und damit reaktiver Aminogruppen. Die Bestimmung des  $pK_S$ -Werts der N-terminalen Aminogruppe der  $\beta$ -Kette zeigte für CO-Hämoglobin, das die gleiche Konformation wie Oxy-Hämoglobin aufweist, mit 7,05 einen höheren Wert als für Desoxy-Hämoglobin mit 6,85, was die Bildung der Schiff'schen Base im Desoxy-Hämoglobin begünstigen sollte. Für den N-Terminus der  $\alpha$ -Kette wurde der gegenteilige Effekt beobachtet. Im CO-Hämoglobin wurde der  $pK_S$ -Wert mit 6,95 und im Desoxy-Hämoglobin mit 7,79 ermittelt (*Garner et al., 1975*). Der  $pK_S$ -Wert der N-terminalen Aminogruppe der  $\beta$ -Kette liegt damit im Mittel geringfügig niedriger als der  $pK_S$ -Wert der  $\alpha$ -Kette, was zwar eine höhere Bildung der Schiff'schen Base, aber eine geringere Bildung des Amadori-Produkts erwarten ließe.

Die Summe der beschriebenen Einzeleffekte zeigt, dass die begünstigte Bildung des Amadori-Produkts am N-Terminus der  $\beta$ -Kette hauptsächlich von der protonenkatalytischen, basischen Umgebung bestimmt ist, die durch basische Funktionen räumlich benachbarter Aminosäureseitenketten und die Anwesenheit von Phosphat entsteht. Dieser Abfangeffekt für Protonen kann sich direkt auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Amadori-Umlagerung, die Bildung des Enaminols, auswirken. Der Unterschied im  $pK_S$ -Wert der N-Termini der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten scheint einen vergleichsweise geringen Effekt zu haben, da die  $\alpha$ -Kette den höheren  $pK_S$ -Wert, aber einen deutlich geringen Gehalt des Amadori-Produkts aufweist (*Watkins et al., 1985*).

### 2.1.1.6 Abbau des Amadori-Produkts

In Modell-Experimenten wurde gezeigt, dass die Amadori-Umlagerung zu einem geringen Grad reversibel ist. Denn es konnten Glucose und Mannose, die sich nur in der Orientierung der Hydroxylgruppe an C-2 unterscheiden (C-2-Epimere), als Reaktionsprodukte nach Inkubation eines Fructosylamins bestimmt werden (*Ahmed et al., 1986; Yaylayan and Huyghues-Despointes, 1996*). Die Relevanz der Retro-Amadori-Umlagerung ist stark vom Zuckerrest abhängig, weil für die Rückreaktion die offenkettige Form nötig ist. Da die Keto-Amine von Hexosen hauptsächlich zyklisch als Halbketal vorliegen, sind sie als verhältnismäßig stabil anzusehen (*Yaylayan and Huyghues-Despointes, 1994*). Bei Untersuchungen der pH-Abhängigkeit dieser Umkehrreaktion wurden im leicht Sauren deutlich weniger Monosaccharide als in leicht basischer Lösung detektiert, was die erhöhte Stabilität des Amadori-Produkts im Sauren belegt (*Davidek et al., 2002; Martins et al., 2003*).

Für die fortschreitende Maillard-Reaktion ist der Abbau des Amadori-Produkts zu den 1,2-Dicarbonylverbindungen 3-DG, 1-DG, Glyoxal und Methylglyoxal über eine partielle Retro-Amadori-Umlagerung von weitaus größerer Bedeutung. Die Stabilität des Amadori-Produkts ist dabei die Ursache, warum die Umsetzung zu Dicarbonylverbindungen im Vergleich zu Systemen mit Glucose und freien Aminogruppen geringer ist (*Thornalley et al., 1999*). Diese Stabilität ist allerdings pH-abhängig, was an der erhöhten Bildung von kurzkettigen Dicarbonylverbindungen und organischen Säuren bei steigendem pH-Wert gezeigt werden konnte (*Davidek et al., 2002; Martins et al., 2003*). Die Ursache für die geringere Stabilität könnte an einer basisch katalysiert erleichterten Tautomerie liegen (*de Bruyn and van Ekenstein, 1895*). Dabei könnten die Bildung von 1,2- oder 2,3-Enolen sowie die Retro-Amadori-Umlagerung begünstigt sein. Außerdem sind Fragmentierungsreaktionen wie die Retro-Aldol-Spaltung und die Retro-Claisen-Reaktion (hydrolytische  $\beta$ -Dicarbonyl-Spaltung) basisch katalysiert.

### 2.1.2 Bildung von Dicarbonylverbindungen in der Maillard-Reaktion

Der Abbau von Zuckern, wie Glucose oder Maltooligosacchariden (Maltose, Maltotriose, Amylose), zu Dicarbonylverbindungen ist direkt aus den Zuckern möglich (Karamellisierung), kann aber durch Aminoverbindungen katalysiert werden (Maillard-Reaktion). Dabei entsteht im ersten Schritt an der reduzierenden Aldehydfunktion der Glucose ein Imin. Dieses Imin kann direkt zur Fragmentierung des Grundgerüsts der Glucose beitragen oder über Keto-Enol-Tautomerie zum Amadori-Umlagerungs-Produkt weiter reagieren. Die Möglichkeit der Glucose über Keto-Enol-Tautomerie entlang der Kohlenstoffkette die Doppelbindung wandern zu lassen (Lobry-de-Bruyn-Alberda-van-Ekenstein-Umlagerung), ist die Grundlage für die Bildung einer Vielzahl von Dicarbonylverbindungen (*Biemel et al., 2002; de Bruyn and van Ekenstein, 1895; Reihl et al., 2004*).

Die Endiol- bzw. Aminoenol-Form kann zur  $\beta$ -Eliminierung von Wasser und damit zur Bildung von Desoxyzuckern führen. Diese Reaktion wird für Zucker unter Karamellisierungsbedingungen erst bei pH-Werten unter 3 und über 8 beobachtet. Katalysiert durch ein

Amin werden Keto-Enol-Tautomerie und Wasserabspaltung auch im pH-Bereich 4 bis 7 in Lebensmitteln und physiologischen Systemen möglich (*Ledl and Schleicher, 1990*). Die Retro-Aldol-Reaktion und die  $\beta$ -Dicarbonyl-Spaltung ermöglichen die Fragmentierung der Kohlenstoffkette. Die Fragmentierungsreaktionen verlaufen nach dem gleichen Prinzip, unabhängig davon, ob vom Zucker oder dem Amino-Zucker und ob von Glucose oder einem 1,4-verknüpften Maltooligosaccharid ausgegangen wird. Dicarbonylstrukturen können neben der  $\beta$ -Eliminierung von Wasser auch durch Oxidation von Hydroxylgruppen zu Ketofunktionen wie bei der Bildung des Glucosons und Glyoxals eingeführt werden (*Smuda and Glomb, 2011; Thornalley et al., 1999*).

Bei der aminkatalysierten Bildung von Dicarbonylverbindungen aus Glucose sind das Spektrum der Produkte und die quantitative Bilanz von den Reaktionsbedingungen abhängig. Das wird an den Ergebnissen der unterschiedlichen Modelle deutlich, an denen die Bildung von Dicarbonylverbindungen untersucht wurde. *Gobert & Glomb (2009)* unterschieden für ein Reaktionssystem in Lösung das Spektrum an Dicarbonylverbindungen unter Einfluss oder Ausschluss von Luftsauerstoff (*Gobert and Glomb, 2009*). *Hollnagel & Kroh (2000, 2002)* verglichen die Bildung von Dicarbonylverbindungen unter trockenen Bedingungen und in Lösung (*Hollnagel and Kroh, 2002, 2000*). Unter Bedingungen der Pyrolyse einer trockenen Mischung von Glucose und Alanin, studierten *Yalayan und Keyhani (2000)* die Fragmentierung der Glucose zu Dicarbonylverbindungen (*Yalayan and Keyhani, 2000*). Ebenfalls unter drastischen Bedingungen, Sieden unter Rückfluss, untersuchte *Hofmann (1999)* die Bildung von Dicarbonylverbindungen in einer Glucose-Alanin-Lösung (*Hofmann, 1999*). Die Vielfalt der Dicarbonylverbindungen erstreckt sich über Bruchstücke mit Kettenlängen von zwei bis fünf Kohlenstoffatomen bzw. mit intaktem Glucosegrundgerüst.

#### 2.1.2.1 Aminkatalysierte Bildung von Dicarbonylverbindungen aus Glucose

Da für die Bildung der in dieser Arbeit untersuchten AGEs Glyoxal und Methylglyoxal als Reaktionspartner entscheidend sind, liegt der Fokus auf deren Bildungswegen. Aus Glucose bzw. katalysiert durch ein primäres Amin entstehen als initiale Dicarbonylverbindungen Didesoxyosone mit intaktem C-6-Kohlenstoffgerüst. Nach 1,2-Enolisierung und Eliminierung von Wasser an C-3 können das 3-Desoxyglucoson (3-DG) bzw. aminkatalysiert das 1-Imino-1,3-didesoxyglucoson gebildet werden. Durch hydrolytische Spaltung können aus dem 1-Imino-1,3-didesoxyglucoson die Aminosäure und 3-DG freigesetzt werden. *Thornalley et al. (1999)* konnten zeigen, dass die Bildung von 3-DG aus einem Reaktionsansatz mit Glucose und Lysin deutlich schneller verläuft als aus dem Amadori-Produkt, da dieses ein stabiles Zwischenprodukt darstellt. Aus dem 2,3-Enol bzw. dem 2,3-Enaminol können zwei Produkte entstehen. Findet die Eliminierung an C-1 statt entsteht das 1-Desoxyglucoson (1-DG). Wird Wasser an C-4 eliminiert, entsteht aus dem 2,3-Enol das 4-Desoxyglucoson (4-DG) bzw. aus dem 2,3-Enaminol das 1-Amino-1,4-Didesoxyglucoson.

Zur Bildung von Glyoxal ist ein oxidativer Teilschritt notwendig. Als aminkatalysierter Bildungsweg ist der „Namiki-Weg“ bekannt. Dabei wird die 1-Iminoglucose durch Retro-Aldol-Spaltung zwischen C-2 und C-3 zu Iminoglycol und Erythrose gespalten. Wird das Iminoglycol oder das hydrolytisch freigesetzte Glycolaldehyd oxidiert, entstehen Iminoglyoxal bzw. Glyoxal (Abbildung 2-2, A) (Hayashi and Namiki, 1980). Glyoxal kann auch durch Retro-Aldol-Spaltung aus Glucoson oder 1-Iminoglucoson freigesetzt werden. Glucoson wird durch die Oxidation von Glucose (Abbildung 2-2, B) (Thornalley et al., 1999) bzw. das aminegebundene Glucoson durch Oxidation des 1,2-Enaminols mit anschließender hydrolytischer Freisetzung gebildet (Abbildung 2-2, C) (Hofmann et al., 1999).

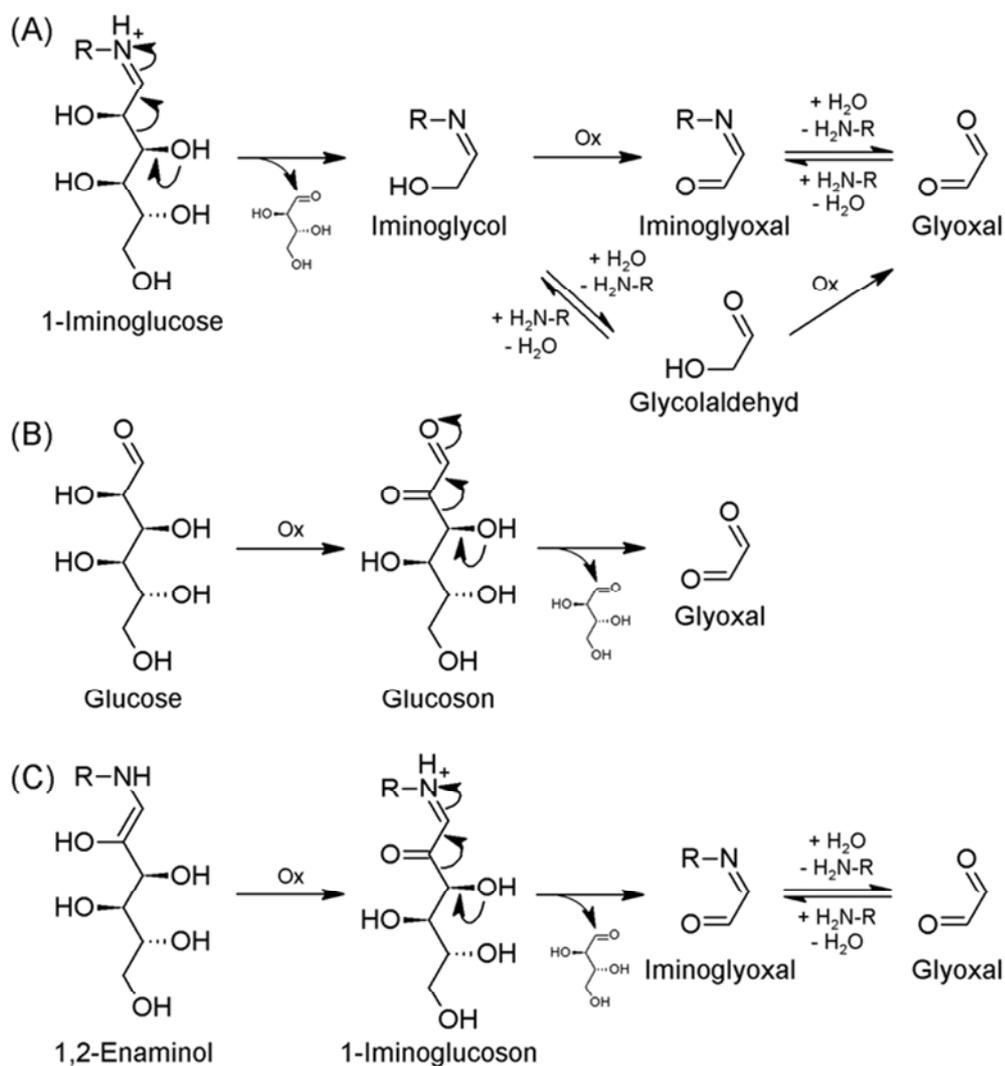


Abbildung 2-2: Bildungswege des Glyoxals: (A) Hayashi & Namiki (1980); (B) Thornalley et al. (1999); (C) Hofmann et al. (1999).

Die Bildung von Methylglyoxal durch Retro-Aldol-Spaltung zwischen C-3 und C-4 kann direkt aus dem Amadori-Produkt formuliert werden. Dabei entstehen ausgehend von Glucose 1-Amino-3-hydroxyaceton und Glycerinaldehyd. Aus 1-Amino-3-hydroxyaceton kann, nach Bildung des 2,3-Endiols durch  $\beta$ -Eliminierung des Amins oder aus dem 1,2-Enaminol nach  $\beta$ -

Eliminierung von Wasser mit anschließender hydrolytischer Abspaltung des Amins, Methylglyoxal gebildet werden. Aus dem Glycerinaldehyd kann nach Ausbildung des 1,2-Endiols und  $\beta$ -Eliminierung von Wasser ein weiteres Molekül Methylglyoxal entstehen (Abbildung 2-3, B) (Yaylayan and Keyhani, 2000).

Wird aus dem Amadori-Produkt oder der Schiff'schen Base das 1,2-Enaminol gebildet, kann im ersten Schritt eine Eliminierung von Wasser an C-3 erfolgen. Das dabei entstandene 1-Imino-1,3-dideoxyglucoson kann durch Retro-Aldol-Spaltung zwischen C-3 und C-4 zu 1-Iminomethylglyoxal und Glycerinaldehyd fragmentieren. Das 1-Iminomethylglyoxal kann dann hydrolytisch zum Amin und Methylglyoxal gepalten werden und aus Glycerinaldehyd durch Eliminierung eines weiteren Moleküls Wasser Methylglyoxal entstehen (Abbildung 2-3, A) (Thornalley et al., 1999).

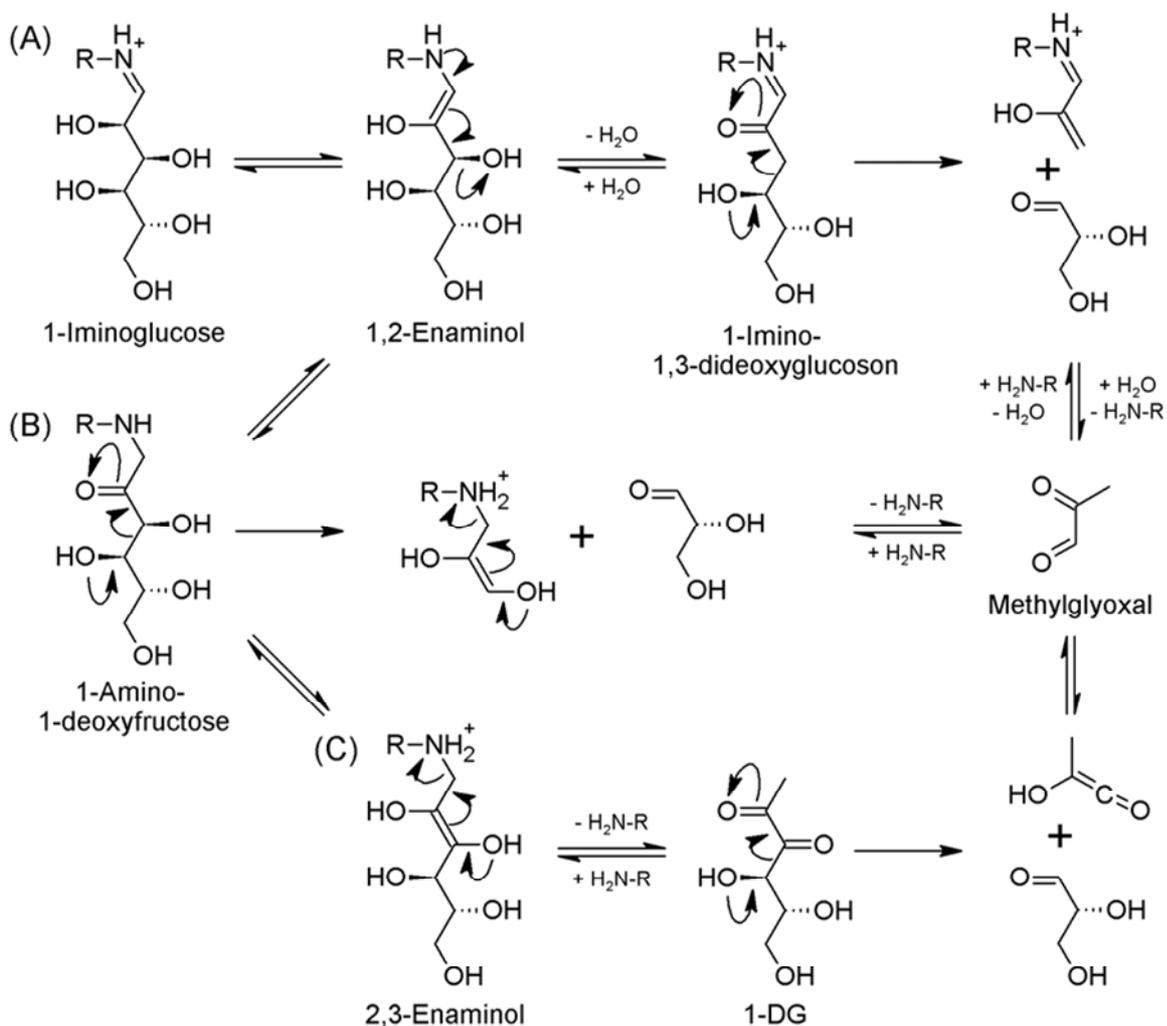


Abbildung 2-3: Bildungswege des Methylglyoxals: (A) abgeleitet von Thornalley et al. (1999) (Bildung Methylglyoxal aus 3-DG durch Retro-Aldol-Spaltung); (B) Yaylayan & Keyhani (2000); (C) Weenen (1998)

Nach der Bildung des 2,3-Endiols kann ausgehend von Glucose durch  $\beta$ -Eliminierung von Wasser bzw. ausgehend von einem Amadori-Produkt durch  $\beta$ -Eliminierung des Amins das 1-Desoxyglucoson (1-DG) gebildet werden. 1-DG verfügt im Vergleich zu 3-DG über eine

deutlich geringere Stabilität (*Glomb and Tschirnich, 2001*) und ist als Quelle für kurzkettige Dicarbonylverbindungen wie Methylglyoxal und Glyoxal von untergeordneter Bedeutung. Zu erwarten wäre beispielsweise die Bildung von Methylglyoxal durch eine Retro-Aldol-Spaltung zwischen C-3 und C-4 (Abbildung 2-3, C) (*Weenen, 1998*), was aber als quantitativ vernachlässigbar bewertet wurde (*Voigt and Glomb, 2009*). Als quantitativ bedeutende Fragmentierungsprodukte wurden Carbonsäuren wie Milchsäure, Glycerinsäure und Essigsäure bestimmt (*Voigt et al., 2010*). Insbesondere für den Abbau des Amadori-Produkts Fructosylglycin wurde Essigsäure als Abbauprodukt mit zum Teil mehr als 50 mol-% quantifiziert. Mechanistisch wird die Bildung aus 1-DG mit einer Dicarboxylspaltung zwischen C-2 und C-3 erklärt (*Martins et al., 2003; Smuda and Glomb, 2013*).

#### 2.1.2.2 Bildung von Dicarbonylverbindungen aus Maltooligosacchariden

Die Bildung von Dicarbonylverbindungen aus Maltose bzw. Maltooligosacchariden verläuft weitestgehend analog zur Bildung aus Glucose. Die Besonderheit ist die Verknüpfung der terminalen Glucose am reduzierenden Ende der Saccharidkette mit einem Zuckerrest an C-4, der eine gute Abgangsgruppe darstellt und so bestimmte Abbauege und die Bildung bestimmter Dicarbonylverbindungen begünstigt. Als quantitativ bedeutendste Dicarbonylverbindungen wurden bei trockener Erhitzung von Maltose das 1,4-Didesoxyglucoson (1,4-DG) und bei Erhitzung in Lösung das 3-Desoxypentosen (3-DPs) identifiziert.

Die Bildung von 1,4-DG aus Maltooligosacchariden wird über einen „Peeling-off“-Mechanismus erklärt, wobei nach Bildung der 2,3-Enol-Form eine  $\beta$ -Eliminierung des an C-4 kovalent gebundenen Zuckerrests und nach Reduzierung sowie nochmaliger Bildung des 2,3-Enols die Eliminierung der an C-1 gebundenen Aminosäure erfolgen kann (Abbildung 2-4). In Reaktionsansätzen mit Glycin wurden deutlich höhere Gehalte aller Dicarbonylverbindungen gefunden als in Ansätzen ohne Aminosäure und insbesondere der Gehalt des 1,4-DGs war um das 10- bis 20-fache erhöht. Über die Quantifizierung von Furosin in Reaktionsansätzen nach Zusatz von Boc-Lysin, konnte das 1-Amino-1,4-didesoxyglucoson als Vorstufe des 1,4-DGs nachgewiesen werden (*Hollnagel and Kroh, 2000*).

Für die Bildung des 3-Desoxypentosons wird von *Hollnagel & Kroh (2002)* ein Mechanismus vorgeschlagen (Abbildung 2-5), bei dem im ersten Schritt eine Eliminierung des Zuckerrests an C-4 erfolgt und im zweiten Schritt aus dem 1-Amino-1,4-Didesoxyglucoson nach Bildung der 1-Imino-3-keto-Form durch Angriff eines Hydroxidions an C-1 eine Retro-Claisen-Reaktion abläuft. Als Produkte entstehen Ameisensäure, die freie Aminosäure sowie nach einem Oxidationsschritt aus der 3-Desoxypentose das 3-Desoxypentosen (3-DPs) (Abbildung 2-5, A) (*Hollnagel and Kroh, 2002*).

*Smuda & Glomb (2011)* untersuchten die Bildung von 1,2-Dicarbonylverbindungen aus Maltose in Lösung mit und ohne Sauerstoffverfügbarkeit und konnten das 3-DPs als quantitativ dominierend unter den C-6 und C-5-Dicarbonylverbindungen nur bei Anwesenheit von Sauerstoff finden. Damit wird der von *Hollnagel & Kroh (2002)* beschriebene Mechanismus

zur Bildung des 3-Desoxypentosons unter Verwendung eines Oxidationsschritts unterstützt. *Smuda & Glomb (2011)* schlagen einen Mechanismus zur Bildung von 3-DPs nach initialer Oxidation von Maltose zu Maltoson mit anschließender hydrolytischer  $\beta$ -Dicarbonylspaltung und Eliminierung der Glucose an C-4 vor (Abbildung 2-5, B).

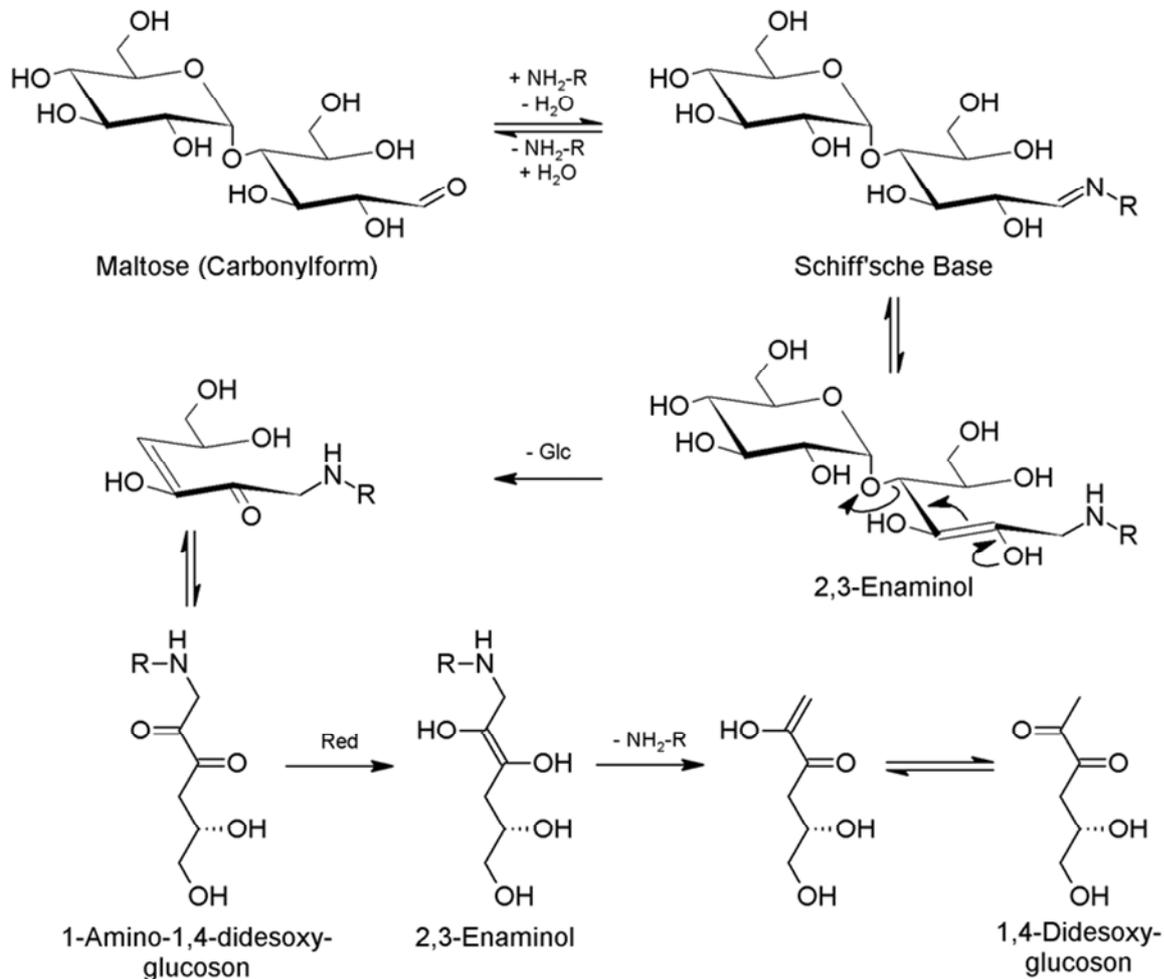


Abbildung 2-4: Bildung des 1,4-Dideoxyglucosons am Beispiel Maltose, „Peeling-off“-Mechanismus (*Hollnagel and Kroh, 2000*)

Für die Bildung von Glyoxal und Methylglyoxal aus Maltose bzw. Maltooligosacchariden gelten die gleichen Mechanismen wie bei der Bildung aus Glucose bzw. den daraus gebildeten Dicarbonylverbindungen mit sechs Kohlenstoffatomen (Abbildung 2-2 bzw. Abbildung 2-3). Im Vergleich wurden für Maltose im trockenen Modell bis zu 10-fach höhere Gehalte der kurzkettigen Dicarbonylverbindungen Glyoxal und Methylglyoxal als im wasserhaltigen Modell gefunden. Dabei fanden *Hollnagel & Kroh (2000)* unter trockenen Inkubationsbedingungen bis 3-fach höhere Gehalte für Methylglyoxal als für Glyoxal.

In Lösung konnten sowohl *Hollnagel & Kroh (2002)* als auch *Smuda & Glomb (2011)* Glyoxal als quantitativ wichtigste C-2/C-3-Dicarbonylverbindung bei der Erhitzung detektieren. Analog zur Bildung von Glucoson aus Glucose kann durch Oxidation aus Maltose das Maltoson gebildet werden, aus dem dann durch Retro-Aldol-Spaltung Glyoxal entstehen kann

(Abbildung 2-2). Die Gehalte von Methylglyoxal waren deutlich geringer. Die Bildung von Methylglyoxal aus 3-DPs durch Retro-Aldol-Spaltung zwischen C-3 und C-4 entspricht der Bildung aus 3-DG (Abbildung 2-3), wobei statt Glycerinaldehyd Glycolaldehyd als zweites Fragment frei wird, das weiter zu Glyoxal oxidiert werden kann.

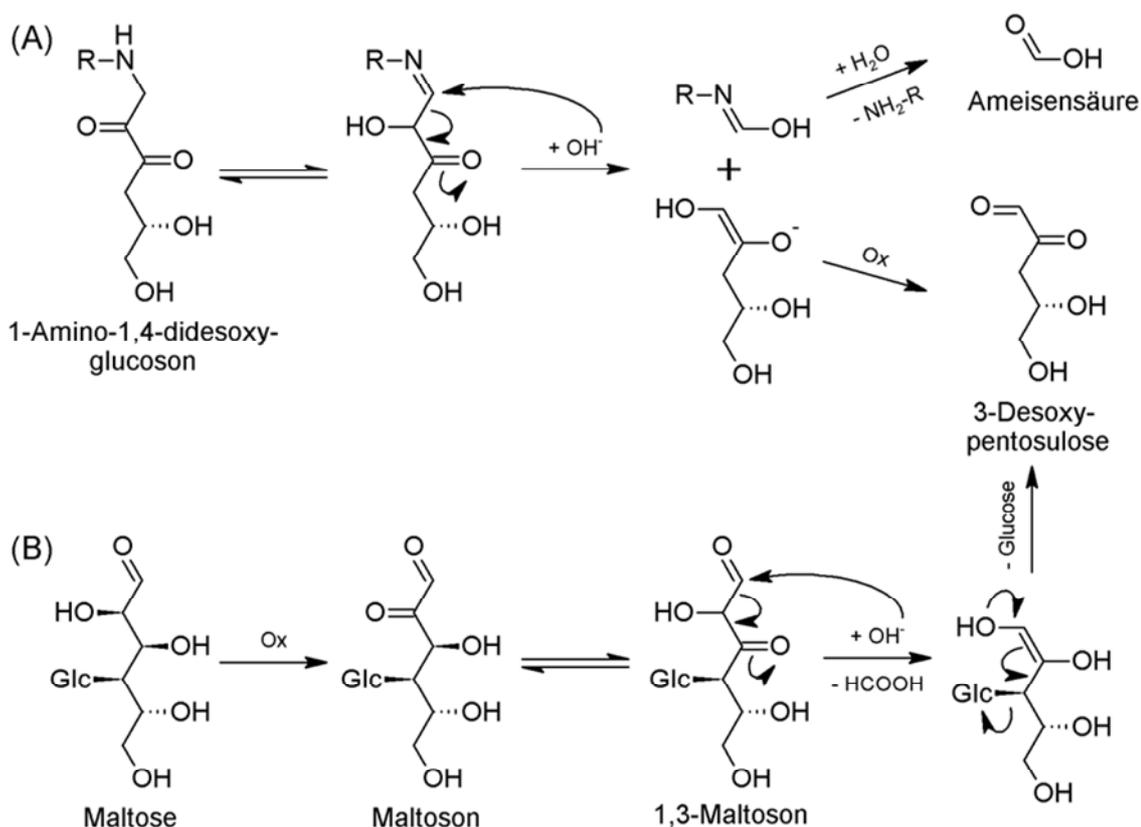


Abbildung 2-5: Bildungsmechanismen für das 3-Desoxypentose: (A) Hollnagel & Kroh (2002); (B) Smuda & Glomb (2011)

## 2.1.3 Advanced Glycation Endproducts – AGEs

### 2.1.3.1 Allgemeiner Überblick

In der Literatur zur Maillard-Reaktion wurde bereits eine Vielzahl von Reaktionsprodukten beschrieben. In einer groben Unterteilung lassen sich AGEs primärer Aminogruppen der N- $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins bzw. der N- $\alpha$ -Aminogruppe von Aminosäuren, der Guanidinogruppe des Arginins und Quervernetzungsprodukte unterscheiden. Im Folgenden wird eine Übersicht zu AGEs gegeben, die von Glyoxal bzw. Methylglyoxal abgeleitet werden können.

Die Carboxyalkylierungsprodukte des Lysins N- $\epsilon$ -Carboxymethyllysin (CML) und N- $\epsilon$ -Carboxyethyllysin (CEL) sind auf Grund ihrer hohen Stabilität und damit guten analytischen Erfassbarkeit wichtige Produkte zur Bewertung der Glykierung von Proteinen in Lebensmitteln und physiologischen Proben (Abbildung 2-6). Aber auch das N-terminale Carboxymethyl-Valin wurde in physiologischen Proben (Hämoglobin) quantifiziert (Cai and Hurst, 1999). N-Terminales Carboxymethyl- und Carboxyethylleucin wurde in einem Lactose/ $\beta$ -

Lactoglobulinmodell qualitativ nachgewiesen (*Meltretter et al., 2013*). Auf die Bildungsmechanismen der Carboxyalkylderivate wird in Abschnitt 2.1.3.2 genauer eingegangen.

Weniger gut untersucht sind Amide des Lysins, deren Bildung über die Reaktion von Lysin mit Dicarbonylverbindungen erklärt wird. N- $\epsilon$ -Glycoyllysin wurde in Modellinkubationen mit Glyoxal entdeckt (*Glomb and Pfahler, 2001*). N- $\epsilon$ -Lactoyllysin, das sich von Methylglyoxal ableitet, wurde im Plasma von Hämodialyse-Patienten quantifiziert (*Henning et al., 2011*).

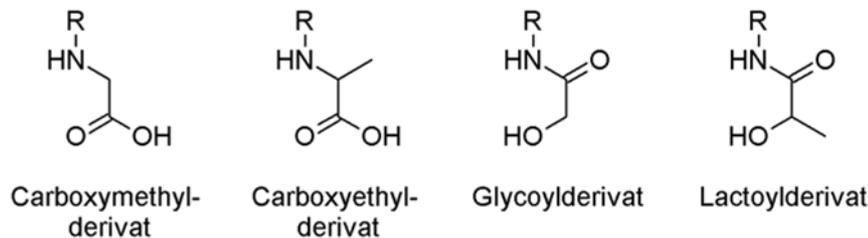


Abbildung 2-6: Carboxyalkyl- und Amid-AGEs (R = N- $\epsilon$ -Lysin oder N- $\alpha$ -Aminosäure)

Glyoxal und Methylglyoxal können besonders gut mit der Guanidino-Funktion des Arginins unter Bildung von Hydroimidazolonen reagieren (Abbildung 2-7). Die stabilsten und quantitativ wichtigsten Derivate in humanen Blutproben und Lebensmitteln sind das von Glyoxal abgeleitete Hydroimidazol-1 (G-H1) und das von Methylglyoxal abgeleitete Hydroimidazol-1 (MG-H1) (*Ahmed et al., 2005a, 2005c*). MG-H1 war das erste beschriebene Hydroimidazol und konnte aus Modellansätzen und Laugenbackwaren isoliert werden (*Henle et al., 1994*). Von den Glyoxal- bzw. Methylglyoxalhydroimidazolonen existieren jeweils weitere Formen, die zum Teil analytisch erfasst wurden, wie zum Beispiel Glarg (G-H3) in einem Modell aus Glyoxal und  $\beta$ -Casein (*Schwarzenbolz et al., 1997*) und MG-H2 in mit Methylglyoxal inkubiertem humanem Serumalbumin (*Ahmed et al., 2002*). MG-H3 war in Serumalbumin auf Grund seiner geringen Stabilität analytisch nicht erfassbar (*Ahmed et al., 2002*). Mit einer Pyrimidin-Struktur sind die Produkte Argpyrimidin (*Shipanova et al., 1997*) und Tetrahydropyrimidin (THP) (*Oya et al., 1999*) aus Arginin unter Beteiligung mehrerer Moleküle Methylglyoxal bekannt. THP (*Ahmed et al., 2002; Van Eupen et al., 2013*) und Argpyrimidin (*Wilker et al., 2001*) wurden in humanen Plasma- bzw. Gewebeproteinen und Argpyrimidin auch in Bier (*Glomb et al., 2001*) quantifiziert. In Modellexperimenten unter erhöhtem Druck wurden Carboxymethyl- und Carboxyethylarginin identifiziert (*Alt and Schieberle, 2005*). Carboxymethylarginin wurde außerdem in Collagen nach *in vitro*-Inkubation mit Glucose unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen (*Iijima et al., 2000*).

Für Lysin und Arginin sind verschiedene Quervernetzungsprodukte beschrieben. Aus Glyoxal und Lysin können das GOLD (glyoxal-derived lysine dimer) (*Wells-Knecht et al., 1995a*) und GOLA (glyoxal-derived lysine amide crosslink) (*Glomb and Pfahler, 2001*) entstehen, aus Methylglyoxal und Lysin MOLD (methylglyoxal-derived lysine dimer) (*Brinkmann et al., 1995*). GOLD und MOLD wurden von *Thornalley et al. (2003)* in humanem Serum und in

Erythrozyten quantifiziert. Sind Lysin und Arginin beteiligt, können aus der Reaktion mit Glyoxal GODIC (glyoxal-derived imidazoline dimer) und mit Methylglyoxal MODIC (methylglyoxal-derived imidazoline dimer) gebildet werden (*Lederer and Klaiber, 1999*).

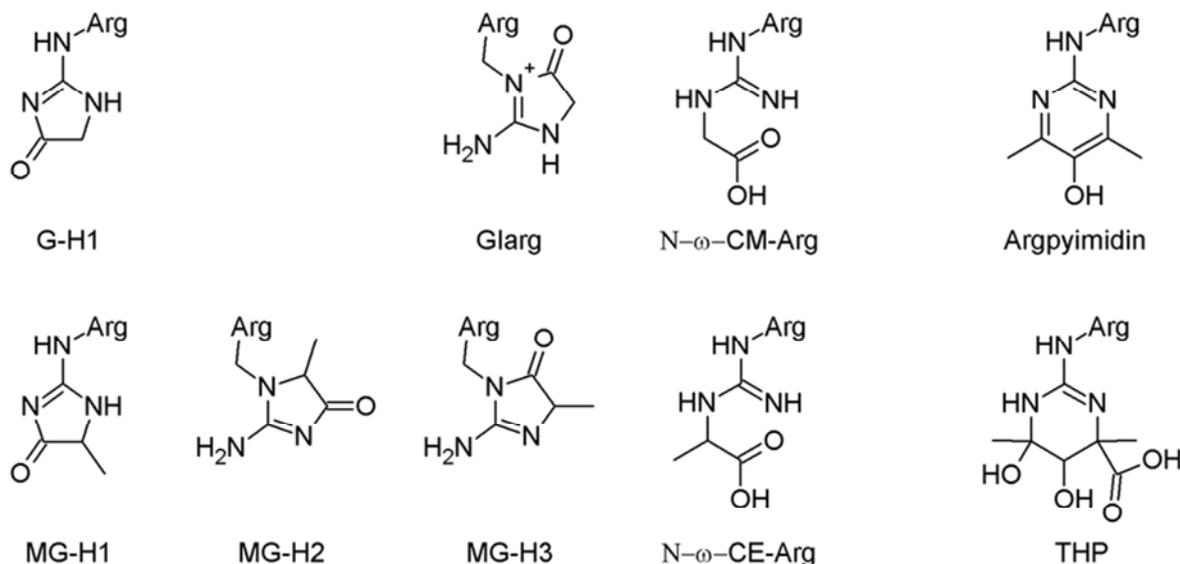


Abbildung 2-7: Von Arginin abgeleitete AGEs.

Als AGEs die ausschließlich am N-Terminus von Peptiden gebildet werden können, sind die Pyrazinone bekannt, die aus der Reaktion von Peptiden mit Glyoxal oder Methylglyoxal gebildet werden (Abbildung 2-9). Diese UV- (Absorptionsmaximum zwischen 320 und 340 nm) und fluoreszenzaktive Verbindungsklasse wurde erstmals von *Prey & Petershofer (1968)* postuliert. *Van Chuyen et al. (1973b, 1973c)* konnten Pyrazinone aus Modellansätzen mit Peptiden und Glyoxal isolieren und beschreiben (*Van Chuyen et al., 1973a, 1973c*). Weiterhin konnte die Bildung von Pyrazinonen aus Glyoxal und bovinem Insulin unter physiologischen Bedingungen *in vitro* nachgewiesen werden (*Krause et al., 2004*).

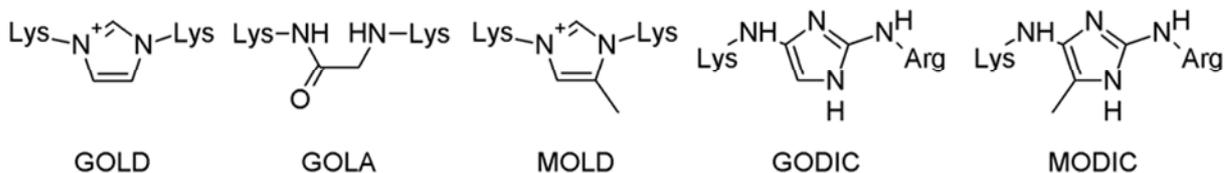


Abbildung 2-8: Lysin-Arginin-Quervernetzungsprodukte

Als weitere Produktgruppe aus der Umsetzung von Peptiden mit Glyoxal wurden, vergleichbar mit der Quervernetzung von Proteinen über die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins unter Bildung von GOLD, die 1,3-Bispeptidylimidazoliumsalze von *Davidek et al. (1991)* beschrieben (Abbildung 2-9). Dabei wurden Glycylglycin und Glyoxal gemeinsam mit Formaldehyd umgesetzt. Als Hauptprodukt in diesen Reaktionsansätzen bildete sich allerdings das entsprechende Pyrazinon. Die Bildung von 1,3-disubstituierten Imidazolen konnte außerdem in Reaktionsansätzen von Aminosäuren mit Zuckern beobachtet werden.

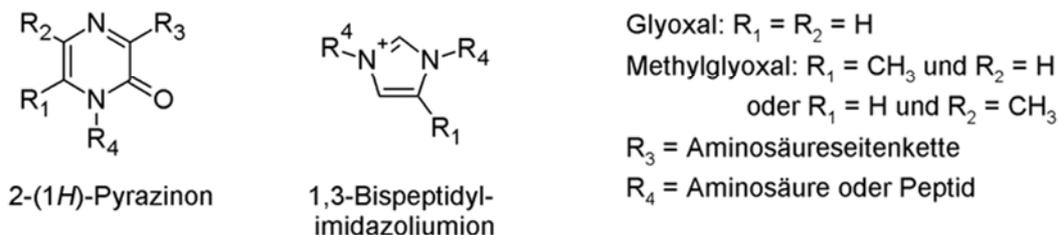


Abbildung 2-9: 2(1H)-Pyrazinone (Prey and Petershofer, 1968) und 1,3-Bispeptidylimidazoliumsalze (Davidek et al., 1991)

### 2.1.3.2 Carboxyalkylierung von Aminosäuren

Reaktionswege zur Bildung von Carboxyalkylierungsprodukten wurden vorrangig für die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins untersucht, da diese als Reaktionsort in von Proteinen geprägten Lebensmittelsystemen und *in vivo* quantitativ bedeutend ist. Abweichend verwendeten Hayashi & Namiki (1980) tert-Butylamin bzw. Cyclohexylamin. Van Chuyen et al. (1973a) untersuchten die Reaktion von Glyoxal mit der  $\alpha$ -Aminogruppe von Alanin zu N- $\alpha$ -Carboxymethylalanin und Hofmann et al. (1999) die Reaktion von Alanin mit Glucose. Die Mechanismen zur Bildung der CM- bzw. CE-Derivate an primären Aminogruppen sind unabhängig davon, ob die Reaktion an einer N- $\epsilon$ - oder N- $\alpha$ -Aminogruppe abläuft.

#### Carboxymethylderivate

Für die Bildung von Carboxymethyllysin (CML) werden verschiedene Reaktionswege diskutiert. Diese können nach den Edukten bzw. den Fragmentierungswegen unterschieden werden.

Glomb & Monnier (1995) schlagen einen Bildungsweg ausgehend von Glycol vor. Dabei reagiert das Glycol mit einer Aminogruppe zur Schiff'schen Base (Iminoglycol), wird zum Amadori-Produkt umgelagert (2-Amino-2-desoxyglycolaldehyd) und anschließend zum Carboxymethylderivat oxidiert (Abbildung 2-10, a) (Glomb and Monnier, 1995).

Das Iminoglycol kann alternativ über den „Namiki-Weg“ aus der Reaktion von Glucose mit einem Amin gebildet werden (Hayashi and Namiki, 1980). Die Schiff'sche Base kann über die Retro-Aldol-Reaktion zum Iminoglycol fragmentieren (Abbildung 2-10, b). Im Unterschied zum Reaktionsweg nach Glomb & Monnier (1999) wird von Hayashi & Namiki (1980) die Oxidation des Iminoglycols zum Iminoglyoxal vorgeschlagen.

Das Iminoglyoxal, das auch aus der Reaktion von freiem Glyoxal mit einem Amin entsteht (Abbildung 2-10, c), kann dann über die Mechanismen der Hydratisierung und Enolisierung (Abbildung 2-10, d) bzw. eine inter- oder intra-molekulare Cannizzaro-Reaktion (Abbildung 2-10, e) zum Carboxymethylderivat reagieren (Salomaa et al., 1956; Van Chuyen et al., 1973b; Wells-Knecht et al., 1995b).

Bei der Reaktion von Glucose mit einem Amin entsteht im ersten Teilschritt der Amadori-Umlagerung aus der Schiff'schen Base das 1,2-Enaminol. Aus dem 1,2-Enaminol kann nach

Dehydratisierung an C-3 der Glucose das 1-Amino-1,3-dideoxy-2,4-glucoson formuliert werden. Dieses kann nach dem Mechanismus der hydrolytischen  $\beta$ -Spaltung von Dicarbonylverbindungen direkt zum Carboxymethylderivat und 1-Desoxyerythrose fragmentieren (Abbildung 2-11, f) (Kasper and Schieberle, 2005). Als Besonderheit kommt dieser Reaktionsweg ohne expliziten Oxidationsschritt aus.

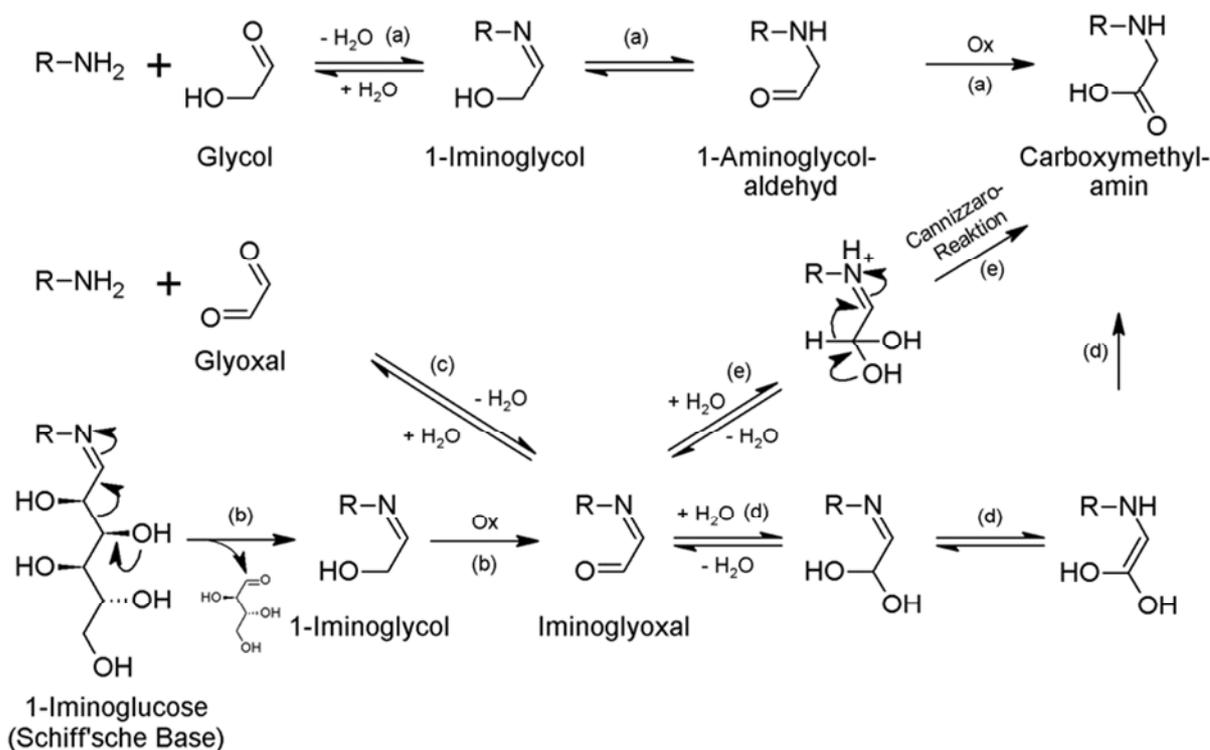


Abbildung 2-10: Mechanismen zur Bildung von CM-Derivaten der N- $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin bzw. der N- $\alpha$ -Aminogruppe einer Aminosäure; (a) Amin und Glycolaldehyd mit anschließender Oxidation (Glomb and Monnier, 1995); (b) Namiki-Weg (Hayashi and Namiki, 1980); (c) Amin und Glyoxal zu Iminoglyoxal; (d) Hydratisierung und Enolisierung (Al-Abed and Bucala, 1995; Van Chuyen et al., 1973b); (e) intra-molekulare Cannizzaro-Reaktion (Salomaa et al., 1956; Wells-Knecht et al., 1995b).

Nach Baker et al. (1994) bzw. Hofmann et al. (1999) kann das 1,2-Enaminol leicht zum 1-Iminoglucoson oxidiert werden, das dem Kondensationsprodukt aus Glucoson und einem Amin entspricht. Ein solcher Oxidationsmechanismus wurde bereits für die Autoxidation von  $\alpha$ -Hydroxycarbonylverbindungen unter physiologischen Bedingungen nach Tautomerisierung zum 1,2-Endiol beschrieben (Wolff et al., 1984). Über eine Retro-Aldol-Spaltung kann das 1-Iminoglucoson zu Iminoglyoxal und Erythrose fragmentieren (Abbildung 2-11, g) (Hofmann et al., 1999). Anschließend kann das Iminoglyoxal wie bereits beschrieben weiter zum Carboxymethylderivat reagieren (Abbildung 2-10, d bzw. e).

Aus dem 1,2-Enaminol entsteht durch Tautomerisierung das Amadori-Produkt (1-Amino-1-desoxyfructose). Mechanistisch gibt es mehrere Möglichkeiten die Bildung von CML aus dem Amadori-Produkt mittels oxidativer und nicht oxidativer Teilschritte zu erklären.

Erstmals wurde die Bildung von CML aus N- $\epsilon$ -Fructosyllysin (Fru-Lys) von *Ahmed et al.* (1986) untersucht. Dabei wurde von einem überwiegend oxidativen Abbau ausgegangen und als Nebenprodukt Erythronsäure identifiziert. Der Mechanismus kann ausgehend vom Amadori-Produkt über das 1-Amino-1-desoxy-2-enol (2,3-Enaminol) verlaufen, das zum 1-Amino-1-desoxy-2,3-glucoson oxidiert wird (Abbildung 2-11, g) (*Baker et al.*, 1994; *Hofmann et al.*, 1999). Das 1-Amino-1-desoxy-2,3-glucoson kann dann über eine oxidative  $\alpha$ -Spaltung zu CML und Erythronsäure fragmentiert werden (Abbildung 2-11, k) (*Davidek et al.*, 2006b; *Dunn et al.*, 1990). Als Oxidationsmittel können beispielsweise Luftsauerstoff, Peroxide oder Übergangsmetalle fungieren (*Ahmed et al.*, 1986; *Davidek et al.*, 2006b). Welchen Anteil der Bildungsweg von CML über die oxidative Spaltung des Glucoserests *in vivo* und in Lebensmitteln einnimmt, wurde bisher kaum untersucht. *Davidek et al.* (2006b) untersuchten Fragmentierungsmechanismen am Beispiel von 1-DG, das strukturell dem 1-Amino-1-desoxy-2,3-glucoson ähnelt. Dabei wurde die oxidative  $\alpha$ -Spaltung zu Essigsäure und Erythronsäure als quantitativ wenig relevanter Fragmentierungsweg identifiziert.

Die Carbonylgruppen in den Glucosonderivaten können ihre Position über eine konsequente Keto-Enol-Tautomerie wechseln (*Biemel et al.*, 2002; *Reihl et al.*, 2004). Dadurch können das 1-Imino-1-desoxy-2-glucoson (1-Iminoglucoson), das 1-Imino-1-desoxy-3-glucoson, das 1-Amino-1-desoxy-2,3-glucoson und das 1-Amino-1-desoxy-2,4-glucoson ineinander überführt werden (Abbildung 2-11, h).

Bei der Untersuchung der Fragmentierungsreaktionen des 1-Desoxyglucosons (1-DG) konnten *Davidek et al.* (2006a) die Fragmentierung über eine hydrolytische  $\beta$ -Spaltung (Retro-Claisen-Reaktion) des 1-Desoxy-2,4-glucosons zu Essigsäure und Erythrose bzw. Erythrose erklären. Die Fragmentierung war auch unter Ausschluss von Sauerstoff vergleichbar effektiv und es wurde geschlussfolgert, dass der beschriebene nicht-oxidative Reaktionsweg der Hauptabbauweg ist (*Davidek et al.*, 2006a). Dieser Mechanismus wurde bereits von *Hayami* (1961) beschrieben und kann direkt auf die Fragmentierung des 1-Amino-1-desoxy-2,4-glucosons übertragen werden, nur dass nicht Essigsäure sondern das CM-Derivat als Spaltprodukt entsteht (Abbildung 2-11, i) (*Hayami*, 1961).

Die Anwendung der hydrolytischen  $\beta$ -Spaltung auf das 1-Imino-1-desoxy-3-glucoson mit dem hydrolytischen Angriff an C-3 erzeugt das von Glycol abzuleitende 1,2-Enaminol (Abbildung 2-11, j). Dieses kann in Anlehnung an *Baker et al.* (1994) bzw. *Hofmann et al.* (1999) direkt zum Iminoglyoxal oxidiert werden.

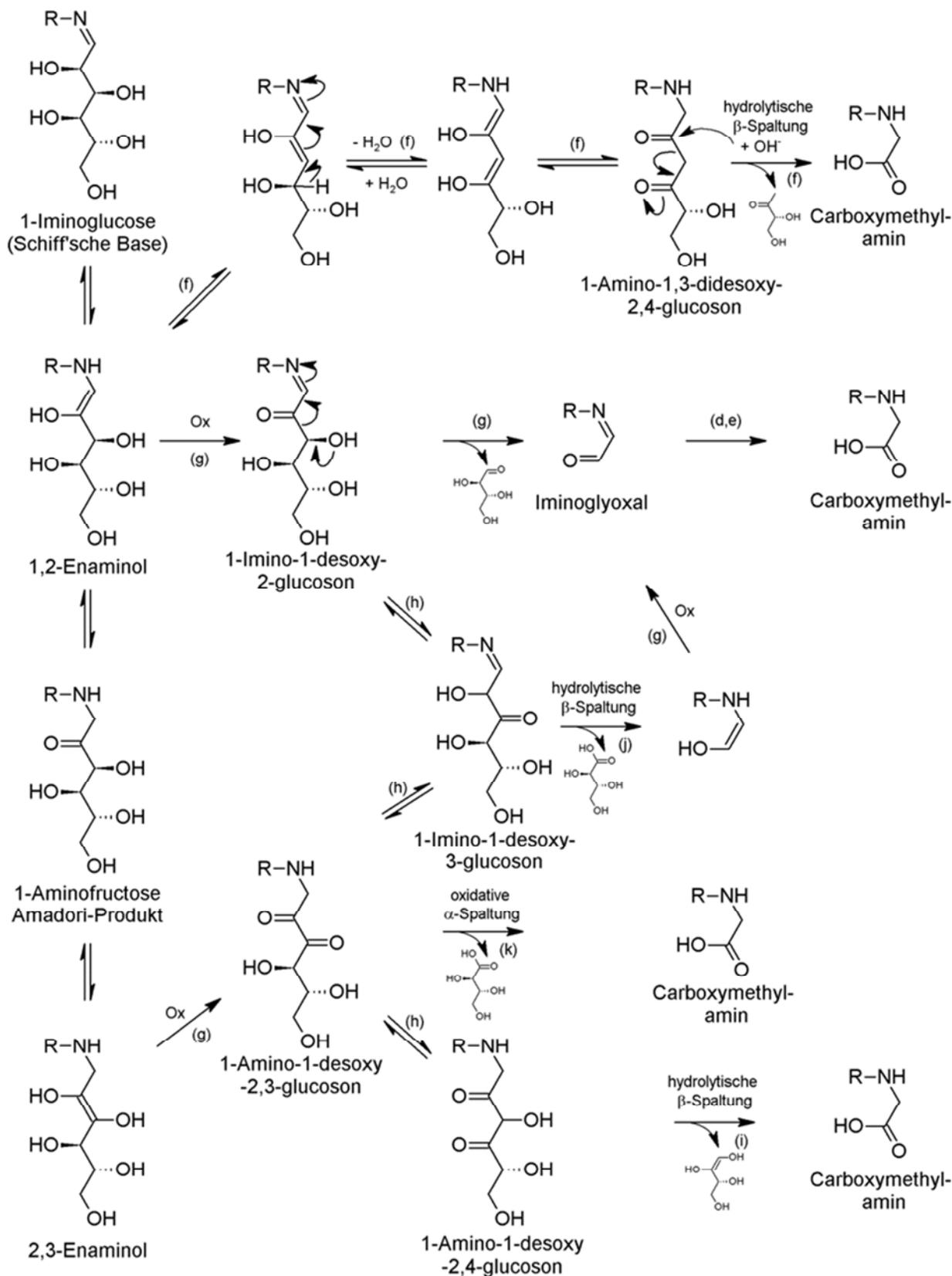


Abbildung 2-11: Mechanismen zur Bildung von CM-Derivaten der N-ε-Aminogruppe von Lysin bzw. der N-α-Aminogruppe einer Aminosäure; (f) β-Dicarbonylspaltung des 1-Amino-1,3-desoxy-2,4-glucosons (*Kasper & Schieberle, 2005*); (g) Oxidation des 1,2-Enaminols bzw. allgemein eines Endiols (*Baker et al., 1994; Hofmann et al., 1999*); (h) Keto-Enol-Tautomerie (*Biemel et al., 2002; Reihl et al., 2004*); (i und j) hydrolytische β-Spaltung (*Davidek et al., 2006a*); (k) oxidative α-Spaltung (*Davidek et al., 2006b*).

### *Carboxyethylderivate*

CE-Derivate können nicht direkt aus Glucose gebildet werden, da der nukleophile Angriff an einer Carbonylfunktion an Position C-2 erfolgen muss. Als Reaktionspartner sind Ketosen wie die Fructose, 1-Desoxyosonstrukturen wie Methylglyoxal und 1-DG oder 3-Desoxyosonstrukturen wie 3-DPs und 3-DG möglich. Zur Bildung des CE-Derivats können die Mechanismen zur Bildung des CM-Derivats übertragen werden.

Ist Fructose das Edukt kann aus der Schiff'schen Base nach Bildung des 2,3-Enaminols eine Dehydratisierung an C-1 erfolgen. Das Reaktionsprodukt ist das 2-Imino-1,2-didesoxyglucoson, das alternativ direkt aus 1-DG formuliert werden kann (Abbildung 2-12, m). Tautomerisiert die Schiff'sche Base zum 1,2-Enaminol, kann die Dehydratisierung an C-3 erfolgen und es wird das 2-Imino-2,3-didesoxyglucoson gebildet, das ebenfalls aus 3-DG und einem Amin entstehen kann (Abbildung 2-12, l). Über eine Retro-Aldol-Spaltung zwischen C-3 und C-4 entsteht aus dem 2-Imino-1,2-didesoxyglucoson bzw. dem 2-Imino-2,3-didesoxyglucoson das 2-Iminomethylglyoxal und Glycerinaldehyd. 2-Iminomethylglyoxal könnte auch direkt aus der Reaktion von Methylglyoxal mit dem Amin entstehen (Abbildung 2-12, o) (*Ahmed et al., 1997*). 2-Iminomethylglyoxal kann dann durch die Mechanismen der Hydratisierung und Enolisierung (*Al-Abed and Bucala, 1995; Van Chuyen et al., 1973b*) bzw. die Cannizzarro-Reaktion (*Salomaa et al., 1956; Wells-Knecht et al., 1995b*) zum CE-Derivat umgesetzt werden (Abbildung 2-12, n).

Das 2-Imino-1,2-didesoxyglucoson kann weiterhin durch mehrfache Keto-Enol-Tautomerie zum 2-Amino-1,2-didesoxy-3,5-glucoson umgewandelt werden. Dieses kann in Anlehnung an *Kasper & Schieberle (2005)* bzw. *Davidek et al. (2006a)* über eine hydrolytische  $\beta$ -Spaltung direkt zum CE-Derivat und Glycerinaldehyd bzw. Dihydroxyaceton fragmentieren (Abbildung 2-12, p).

Die Mechanismen zur Bildung der 2-Imino-1,2-didesoxyglucoson- bzw. 2-Imino-2,3-didesoxyglucosonstrukturen basieren ausschließlich auf nicht-oxidativen Reaktionen. Aber für die Bildung eines CE-Derivats kann nach Umlagerung der Carbonylfunktionen des 2-Imino-1,2-didesoxyglucosons zum 2-Amino-1,2-didesoxy-3,4-glucoson eine oxidative  $\alpha$ -Spaltung in Anlehnung an *Davidek et al. (2006b)* formuliert werden (Abbildung 2-12, q).

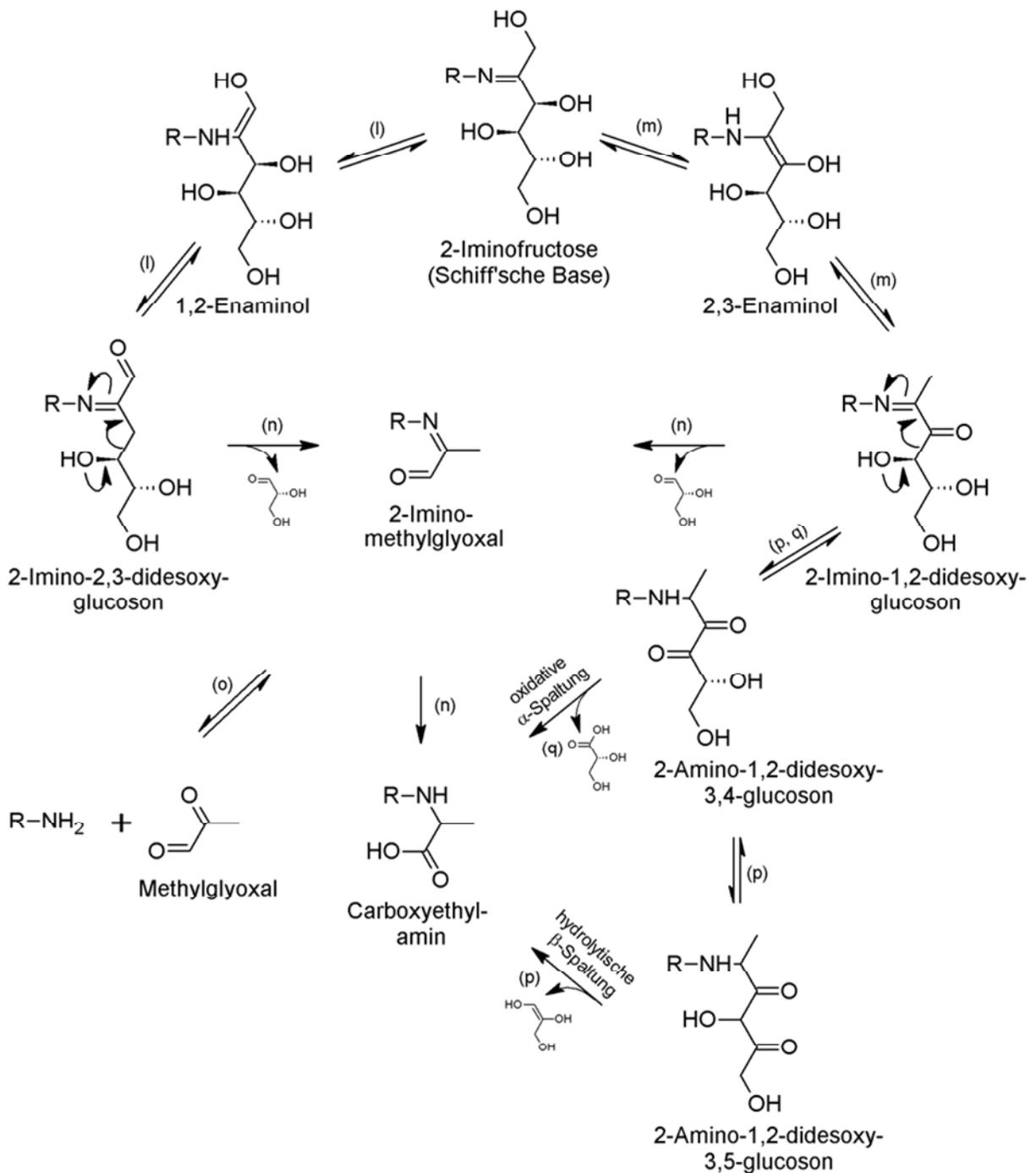


Abbildung 2-12: Mechanismen zur Bildung von CE-Derivaten der N- $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin bzw. der N- $\alpha$ -Aminogruppe einer Aminosäure; (l) Bildung 2-Imino-2,3-dideoxyglucoson; (m) Bildung 2-Imino-1,2-dideoxyglucoson; (n) Retro-Aldol-Spaltung zu 2-Iminomethylglyoxal mit anschließender Hydratisierung und Enolisierung (Al-Abed and Bucala, 1995; Van Chuyen et al., 1973b) bzw. Cannizzaro-Reaktion (Wells-Knecht et al., 1995a) (Wells-Knecht et al., 1995b); (o) Methylglyoxal und Amin (Ahmed et al., 1997); (p) Keto-Enol-Tautomerie zum 2-Amino-1,2-dideoxy-3,5-glucoson (Biemel et al., 2002; Reihl et al., 2004) und hydrolytische  $\beta$ -Spaltung (Davidek et al., 2006a; Kasper and Schieberle, 2005); (q) Keto-Enol-Tautomerie zum 2-Amino-1,2-dideoxy-3,4-glucoson und oxidative  $\alpha$ -Spaltung (Davidek et al., 2006b).

### 2.1.3.3 2(1H)-Pyrazinone

#### Bildung von N-terminalen 2(1H)-Pyrazinonen aus Peptiden

Der Mechanismus zur Bildung von substituierten Pyrazinstrukturen aus der Reaktion von Glyoxal, Methylglyoxal bzw. Diacetyl mit Di- und Triglycin wurde erstmals durch *Prey & Petershofer (1968)* postuliert. Sie konnten mittels Elementaranalyse nachweisen, dass die Produktbildung im Molverhältnis 1 zu 1 erfolgt. Zur Bildung der 2(1H)-Pyrazinone ist ein Peptid, das mindestens aus zwei Aminosäuren besteht, notwendig. Die freie N- $\alpha$ -Aminogruppe des Peptids greift nukleophil an einer Carbonylfunktion einer Dicarbonylverbindung (Glyoxal oder Methylglyoxal) an und unter Abspaltung eines Moleküls Wasser wird ein Imin gebildet. Im zweiten Schritt der 2(1H)-Pyrazinonbildung greift der Stickstoff der sekundären Aminogruppe der ersten Peptidbindung nukleophil an der zweiten Carbonylfunktion der Dicarbonylverbindung an. Nach Abspaltung eines zweiten Wassermoleküls entsteht ein zyklisches Pyrazinderivat (Abbildung 2-13).

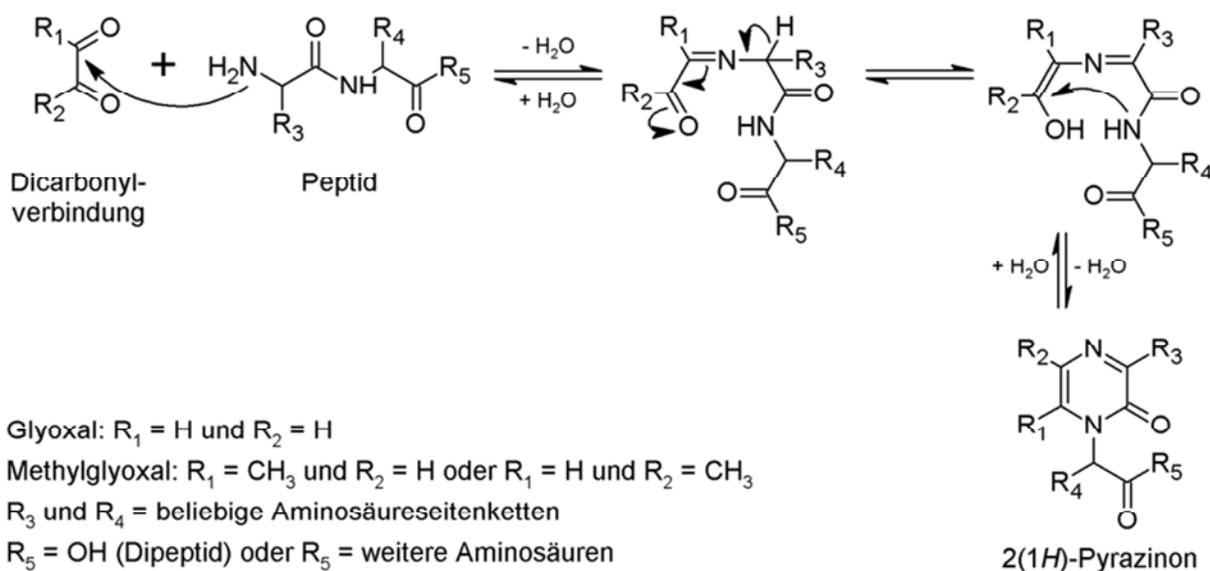


Abbildung 2-13: Mechanismus der Bildung von 2(1H)-Pyrazinonen nach *Prey & Petershofer (1968)*

Das Intermediat Iminoglyoxal bei der Bildung von Glyoxal-2(1H)-Pyrazinonen kann direkt aus der Reaktion mit Glyoxal oder alternativ bei der Fragmentierung der Schiff'schen Base bzw. des Iminoglycosons entstehen (Abbildung 2-10 bzw. Abbildung 2-11). Die Bildung eines vom Methylglyoxal abgeleiteten 2(1H)-Pyrazinons direkt durch die Fragmentierung eines Intermediats mit intakter Kohlenstoffkette der Glucose ist theoretisch möglich. Beispielsweise kann durch die Retro-Aldol-Spaltung eines 1-Imino-3-DGs zwischen C-3 und C-4 ein 1-Iminomethylglyoxal entstehen (Abbildung 2-3).

Ist Methylglyoxal der Reaktionspartner eines Peptids, können zwei Produkte gebildet werden. Abhängig davon, ob der nukleophile Angriff der  $\alpha$ -Aminogruppe an der Aldehyd- oder der Ketofunktion des Methylglyoxals erfolgt, wird das 6-Methyl- (Abbildung 2-3:  $R_1 = CH_3$  und  $R_2 = H$ ) bzw. das 5-Methyl-Pyrazinon (Abbildung 2-3:  $R_1 = H$  und  $R_2 = CH_3$ ) gebildet.

*Krause et al. (2004)* erhielten unter physiologischen Bedingungen überwiegend das 5-Methyl-2(1H)-Pyrazinonpeptid. Eine Begründung für diesen Effekt ist, dass der Angriff bevorzugt am Kohlenstoff der Ketogruppe erfolgt, da diese zu einem geringeren Anteil als Hydrat vorliegt (*Thornalley, 1996*).

*Krause et al. (2004)* konnten eine schnelle und gezielte Umsetzung eines Tripeptids mit Glyoxal bzw. Methylglyoxal zu den entsprechenden 2(1H)-Pyrazinonen schon unter milden, physiologischen Bedingungen beobachten. *Krause (2005)* konnte weder  $\alpha$ -Ketoacyl-Peptide (*Takahashi, 1977*) noch andere mögliche Reaktionsprodukte wie 1,3-Bispeptidylimidazolium-Salze (*Davidk et al., 1991*) und N- $\alpha$ -Carboxymethyl-Peptide (*Van Chuyen et al., 1973b*) nachweisen. Ausgehend von den Beobachtungen von *Takahashi (1977)* hatte *Krause (2005)* vermutet, auch  $\alpha$ -Keto-Peptide als quantitativ relevante Produkte zu finden, konnte diese aber nicht detektieren. *Takahashi (1968)* hatte bei Verwendung von Phenylglyoxal einen schnellen Umsatz von Alanyl-glycin zu dem entsprechenden Desaminierungsprodukt der  $\alpha$ -Ketoacyl-Aminosäure Pyruvyl-glycin (40-60%) beobachtet (*Takahashi, 1968*). Auch der Umsatz mit Glyoxal führte zu einem schnellen Verlust des Peptids. Dieser konnte allerdings nur zu 5% im mit Pyruvyl-glycin erklärt werden (*Takahashi, 1977*). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der Phenylsubstituent des Phenylglyoxals durch Mesomeriestabilisierung konjugierter Doppelbindungen in Zwischenprodukten die Transaminierung begünstigt. Liegt aber Glyoxal als Reaktionspartner von Peptiden vor, ist vermutlich die Bildung von 2(1H)-Pyrazinonen, wie von *Krause et al. (2004)* beschrieben, bevorzugt.

#### *Einflussfaktoren auf die Bildungsgeschwindigkeit von 2(1H)-Pyrazinonen*

Als bevorzugter Reaktionspartner von Dicarbonylverbindungen in Proteinen gilt die Guanidinofunktion des Arginins. *Krause et al. (2004)* konnten zeigen, dass der Umsatz des Tripeptids Gly-Ala-Phe mit Glyoxal unter physiologischen Bedingungen mit der von Hippurylarginin vergleichbar ist. Hippuryllysin wurde nur in vernachlässigbaren Mengen umgesetzt.

*Van Chuyen et al. (1973b)* konnten gemessen am Bräunungsgrad einer Inkubationslösung mit der Kettenverlängerung von der Aminosäure zum Dipeptid und weiter zu höheren Peptiden eine deutlich höhere Reaktivität gegenüber Glyoxal beobachten. Auch nach *Krause (2005)* steigt der Umsatz von Glyoxal in der Reihe Aminosäure < Dipeptid < Tripeptid, wobei der Umsatz der Aminosäure vernachlässigbar ist. Aus einer Aminosäure kann kein 2(1H)-Pyrazinon gebildet werden und auch die Bildung der entsprechenden N- $\alpha$ -Carboxymethylaminosäure wurde nicht beobachtet. *Krause (2005)* verwendete Peptide bestehend aus Aminosäuren mit neutralen Seitenketten. Die Kettenverlängerung vom Di- zum Tripeptid verdoppelte den Umsatz im Modellversuch von 40% auf 80%. Begründet wird dieser Effekt mit der Verringerung des pK<sub>S</sub>-Werts der N- $\alpha$ -Aminogruppe bei Kettenverlängerung. Die Unterschiede in der Reaktivität von Tripeptiden mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz werden ebenfalls mit dem Einfluss der Sequenz auf den pK<sub>S</sub>-Wert der N- $\alpha$ -Aminogruppe erklärt. Daraus schlussfolgerte *Krause (2005)*, dass die Bildung der

Schiff'schen Base als initialer Schritt der 2(1*H*)-Pyrazinonbildung geschwindigkeitsbestimmend ist.

Neben der Kettenverlängerung konnte *Krause (2005)* auch einen Einfluss der Aminosäuresequenz von Tripeptiden auf den Umsatz mit Glyoxal ermitteln. In einem Inkubationsmodell unter physiologischen Bedingungen (100 mM Phosphatpuffer, 37 °C, pH = 7,4) bei äquimolarem Einsatz der Tripeptide und des Glyoxals (5 mM) erhielt er nach 24 Stunden für Ala-Phe-Gly, Gly-Ala-Phe, Gly-Phe-Ala bzw. Phe-Gly-Gly Abnahmen der Peptidkonzentrationen von ca. 40%, 70%, 70% bzw. 90%. Alle Peptide waren aus Aminosäuren mit neutralen Seitenketten aufgebaut. Krause begründete die Unterschiede im Umsatz der Peptide mit dem p*K*<sub>S</sub>-Wert der N-terminalen Aminogruppe. Je niedriger der p*K*<sub>S</sub>-Wert, umso größer ist der Anteil der unprotonierten Aminogruppe und umso leichter sollte der nukleophile Angriff an einer der Carbonylfunktionen des Glyoxals erfolgen. Die p*K*<sub>S</sub>-Wert der N-terminalen Aminogruppe lagen dabei zwischen 7,39 für Phe-Gly-Gly über 7,66 und 7,67 für Gly-Ala-Phe und Gly-Phe-Ala sowie 8,12 für Ala-Phe-Gly.

Da ein katalytischer Effekt von Phosphationen auf die Bildung von Amadori-Produkten beschrieben wird (Abschnitt 2.1.1), untersuchte *Krause (2005)*, ob auch ein Zusammenhang mit der Bildung von 2(1*H*)-Pyrazinonen besteht. Er stellte fest, dass zwar die Ionenstärke des Puffers, nicht aber Phosphat-Ionen selbst einen Einfluss auf die Umsetzung haben.

Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der 2(1*H*)-Pyrazinonbildung aus Glyoxal und dem Tripeptid Gly-Ala-Phe ergab ein Optimum im Basischen bei pH = 10 und die Produktbildung ging bei pH-Werten unter pH = 7 stark zurück.

In vergleichenden Inkubationsexperimenten von Gly-Ala-Phe mit Glyoxal, Methylglyoxal bzw. 3-DG konnte gezeigt werden, dass Dicarbonylverbindungen mit zunehmender Kettenlänge einen geringeren mit dem Peptid aufwiesen (*Krause, 2005*).

#### *Stabilität von 2(1H)-Pyrazinonstrukturen in Abhängigkeit vom pH-Wert bzw. der Anwesenheit von Aminoguanidin*

N-terminale Carboxyalkylderivate sind stabile Endprodukte der Maillard-Reaktion. *Krause (2005)* untersuchte die Stabilität von 2(1*H*)-Pyrazinonen unter verschiedenen Bedingungen. Für die Stabilität in Abhängigkeit vom pH-Wert zwischen pH = 2,0 und 9,0 (60 °C, 3 Tage) wurde praktisch kein Abbau festgestellt, nur bei pH = 9,0 betrug der Verlust des 2(1*H*)-Pyrazinons bis 3%.

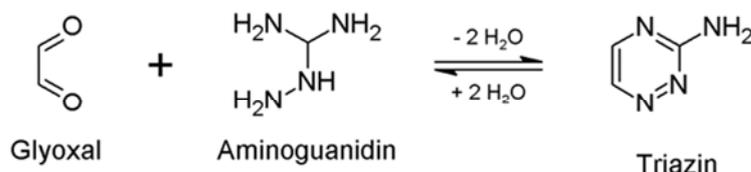


Abbildung 2-14: Derivatisierung von Glyoxal durch Aminoguanidin zum Triazin

Da 2(1*H*)-Pyrazinone aus der Reaktion von Dicarbonylverbindungen mit Peptiden entstehen, wurde die Tendenz zur Rückreaktion durch den Einsatz von Aminoguanidin, eines Derivatisierungsreagenzes für Dicarbonylverbindungen, getestet. Trotz des fünffachen Überschusses von Aminoguanidin war das 2(1*H*)-Pyrazinon sehr stabil. Bei der Inkubation über 3 Tage bei pH = 7,4 und 60 °C wurde ein Abbau von 9% bestimmt und das Triazinderivat des Glyoxals wurde als Nebenprodukt detektiert (Abbildung 2-14). Damit wurde belegt, dass die Bildungsreaktion der 2(1*H*)-Pyrazinone prinzipiell umkehrbar ist (Krause, 2005).

#### Stabilität von 2(1*H*)-Pyrazinonstrukturen bei der Umsetzung in halbkonzentrierter Salzsäure

Krause (2005) untersuchte die zeitliche Abhängigkeit der Freisetzung der Aminosäuren bei saurer Hydrolyse (16-48 h, 110 °C, 6 M Salzsäure) eines Tripeptidpyrazinons (Glyoxal-Gly-Ala-Phe-2(1*H*)-Pyrazinon). Die C-terminale Aminosäure wurde leicht freigesetzt, da sie wie in einem Peptid über eine Peptidbindung gebunden ist. Passend dazu wurde das Dipeptid-2(1*H*)-Pyrazinon nach Abspaltung detektiert.

In Abhängigkeit von der Hydrolysedauer wurden die N-terminale und die zweite Aminosäure des Pyrazinons zunehmend freigesetzt. Dabei betrug die Wiederfindung der zweiten Aminosäure nach 48 Stunden Hydrolyse 40% und die der N-terminalen Aminosäure 26% (Krause, 2005). Dieses Experiment zeigt, dass 2(1*H*)-Pyrazinone unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse zumindest anteilig reversibel zum Peptid reagieren, das direkt weiter zu den Aminosäuren gespalten wird.

Aus dem Dipeptid-2(1*H*)-pyrazinon kann weiterhin durch Decarboxylierung das entsprechende N<sup>1</sup>-Alkyl-2(1*H*)-Pyrazinon gebildet werden (Abbildung 2-15). Die analytische Erfassbarkeit von N<sup>1</sup>-Alkyl-2(1*H*)-Pyrazinonen könnte durch eine Entfernung der Salzsäure aus dem Hydrolysat mittels Vakuumzentrifugation stark beeinträchtigt werden, da insbesondere die leicht flüchtigen N<sup>1</sup>-Alkyl-2(1*H*)-Pyrazinone nicht im Probenrückstand verbleiben. Deshalb wurde eine Strategie zur Analyse von N<sup>1</sup>-Alkyl-2(1*H*)-Pyrazinonen entwickelt, bei der die Salzsäure nicht entfernt, sondern die Salzsäurekonzentration durch Zusatz von Citrat-Puffer kompensiert wurde (Krause, 2005).

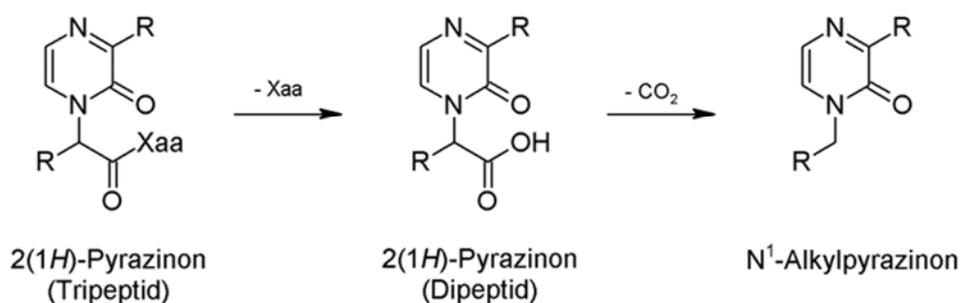


Abbildung 2-15: Abbau eines 2(1*H*)-Pyrazinonpeptids zum N<sup>1</sup>-Alkyl-2(1*H*)-Pyrazinon bei der Hydrolyse mit Salzsäure nach Krause (2005); R = beliebige Aminosäureseitenkette

*Krause (2005)* untersuchte in Modellexperimenten den Einfluss unterschiedlicher Matrices auf das Produktspektrum nach saurer Hydrolyse eines Tripeptid-2(1*H*)-pyrazinons. Der Zusatz von Insulin (Protein) hatte demnach keinen Einfluss auf das Spektrum der Abbauprodukte. Nach Glucose-Zusatz konnte weder das 2(1*H*)-Pyrazinondipeptidderivat noch das N<sup>1</sup>-Alkyl-2(1*H*)-pyrazinon detektiert werden. Dieser Effekt der Glucose konnte durch den Zusatz von Mercaptoethanol vollständig unterbunden werden. Mit diesen Experimenten wurde gezeigt, dass die Analyse von 2(1*H*)-Pyrazinonstrukturen nach saurer Hydrolyse zwar möglich, aber mit matrixabhängigen Schwierigkeiten verbunden sein kann.

Nach Induzierung der 2(1*H*)-Pyrazinonbildung an Insulin durch Glyoxal im Überschuss und Freisetzung der N-terminalen Derivatisierungsprodukte mittels saurer Hydrolyse (23 h, 110 °C, 6 M Salzsäure) konnte das N-terminale 2(1*H*)-Pyrazinondipeptid der  $\beta$ -Kette des Insulins mit intakter Carboxylgruppe als Hauptprodukt analysiert werden. Das N<sup>1</sup>-Alkyl-2(1*H*)-pyrazinon wurde im Gegensatz zu Hydrolysen des 2(1*H*)-Pyrazinontripeptids nur mit sehr viel geringerer Intensität detektiert (*Krause, 2005*). Somit sollten proteingebundene 2(1*H*)-Pyrazinone nach saurer Hydrolyse als Dipeptid-2(1*H*)-pyrazinone analysierbar sein.

#### 2.1.4 Erkenntnisse zur N-terminalen Glykierung

In diesem Abschnitt wurden Kenntnisse zu allgemeinen Mechanismen der Maillard-Reaktion und im speziellen zur Bildung N-terminaler Maillard-Reaktionsprodukte (MRPs) zusammengetragen.

Amadori-Produkte der N- $\alpha$ -Aminogruppe von freien Aminosäuren wurden unter anderem zur Untersuchung mechanistische Zusammenhänge der Bildung und des Abbaus von Amadori-Produkten verwendet. Abgesehen von den N-Termini der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des Hämoglobins wurde die Bildung N-terminaler Amadori-Produkte von Peptiden und Proteinen nur wenig systematisch untersucht. Für die Umsetzung der N-terminalen Aminogruppen von Peptiden mit Glycerinaldehyd wurde festgestellt, dass diese von der Aminosäuresequenz der Peptide beeinflusst wird. Für die unterschiedliche Reaktivität der Dipeptide wurde dabei eine entscheidende Rolle der funktionellen Gruppen der Seitenketten der Aminosäuren vermutet.

Als N-terminale AGEs aus der Reaktion der N-terminalen Aminogruppe von Peptiden mit 1,2-Dicarbonylverbindungen sind sowohl Carboxyalkyl-Derivate als auch 2(1*H*)-Pyrazinone bekannt. Da beide Verbindungsklassen aus den gleichen Edukten entstehen können, kann deren Bildung als konkurrierend angenommen werden. Dieser Zusammenhang und wie das Produktspektrum von der Aminosäuresequenz und den Reaktionsbedingungen beeinflusst werden, wurde bisher noch nicht untersucht.

## 2.2 Maillard-Reaktionsprodukte in Lebensmitteln

Auch ohne das Wissen zur Maillard-Reaktion sind deren Folgen für die Prozessierung von Lebensmitteln von zentraler Bedeutung, da bei der Erhitzung charakteristische Farb- und

Aromabildung stattfindet. Werden aber die Kenntnisse zum Mechanismus der Maillard-Reaktion und zu den MRPs berücksichtigt, können weitere relevante Fragestellungen diskutiert werden. Dazu gehören der Verlust essentieller Aminosäuren, die Steuerung der Farb- und Aromabildung und die Bildung von Produkten mit toxikologischer Relevanz. Deshalb ist die Erforschung der komplexen Zusammenhänge der Maillard-Reaktion bei der Verarbeitung von Lebensmitteln von großer Bedeutung um Herstellungsprozesse über ausgewählte MRPs überwachen und gezielt steuern zu können.

Zur Bildung und dem Vorkommen N-terminaler AGEs in Lebensmitteln ist bisher nur sehr wenig bekannt, weshalb in dieser Arbeit neue Erkenntnisse zu diesen Themen erarbeitet werden sollen. In den folgenden Abschnitten sind ausgewählte Informationen zu MRPs und insbesondere zu N-terminalen MRPs in Lebensmitteln zusammengefasst.

### 2.2.1 Amadori-Produkte in Lebensmitteln

Amadori-Produkte sind die quantitativ bedeutendsten Maillard-Produkte in Lebensmitteln (*Henle, 2003*). Reale Lebensmittelsysteme bestehen aus einer großen Vielfalt von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren, sowie Kohlenhydraten unterschiedlicher Kettenlängen und Monosaccharidzusammensetzung. Das große Spektrum möglicher Produkte macht eine umfassende Quantifizierung aufwendig bis unmöglich.

Für die Bildung von Amadori-Produkten stehen die N- $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins und die N- $\alpha$ -Aminogruppen von Proteinen, Peptiden und freien Aminosäuren zur Verfügung. In Produkten tierischer Herkunft, in Backwaren auf der Basis von Getreidemehl und den meisten anderen Lebensmitteln sind die reduzierenden Aldosen in quantitativer Hinsicht auf Glucose, Galactose, Lactose und Maltose bzw. Maltooligosaccharide beschränkt.

#### 2.2.1.1 N- $\epsilon$ -Amadori-Produkte des Lysins

Zur Erfassung der Blockierung der essentiellen Aminosäure Lysin oder als Indikator für das Ausmaß der Glykierung in Lebensmitteln kann die Bestimmung des Furosins (N- $\epsilon$ -Furoylmethyllysin) eingesetzt werden. Furosin entsteht aus den N- $\epsilon$ -Amadori-Produkten des Lysins bei der Hydrolyse mit Salzsäure (Abbildung 2-16) und ist neben freiem Lysin und Pyridosin ein quantitatives und stabiles Umsetzungsprodukt unter diesen Hydrolysebedingungen (*Finot et al., 1969; Krause et al., 2003*). Die erste Methode zur Quantifizierung von Furosin basierte auf einer ionenchromatographischen Trennung (*Brandt and Erbersdobler, 1972*). Eine deutlich empfindlichere Analytik wurde später über eine HPLC-Methode nach *Resmini et al. (1990)* ermöglicht.

Die Quantifizierung von Furosin könnte als Summenparameter aller Amadori-Produkte der Lysinseitenkette dienen, aber die reproduzierbare Umsetzung eines Amadori-Produkts zu Furosin erfordert standardisierte Hydrolysebedingungen (Salzsäurekonzentration, Zeit, Temperatur) und die Ausbeute ist abhängig vom Zuckerrest. Die systematischen Untersu-

chungen von *Krause et al. (2003)* zeigten, dass Lactosyl-, Maltosyl-, Fructosyl- bzw. Tagatosyllysin abhängig von der Salzsäurekonzentration bei der Hydrolyse individuelle und reproduzierbare Umsatzraten zu Furosin aufweisen. Um nach der Hydrolyse mit beispielsweise 6 M Salzsäure von Furosin auf die Amadori-Produkte zu schließen, wurde für Fructosyllysin der Faktor 3,1, für Lactulosyl- und Maltosyllysin der Faktor 2,9 und für Tagatosyllysin der Faktor 2,4 ermittelt.

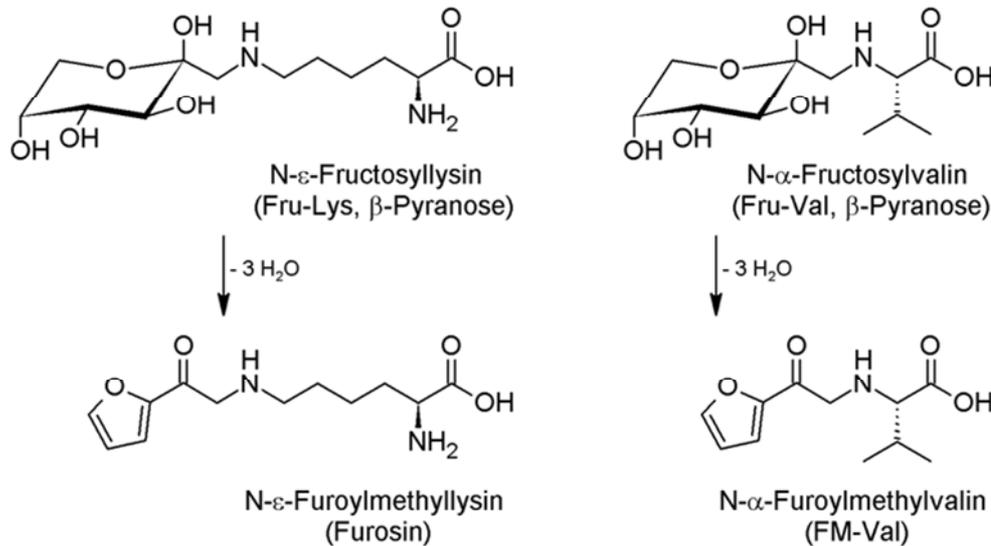


Abbildung 2-16: Bildung der N-ε-Furoylmethylaminosäure des Lysins (Furosin) und einer N-α-Furoylmethylaminosäure am Beispiel von Valin (FM-Val) aus dem jeweiligen Amadori-Produkt bei der Umsetzung in Salzsäure

Darüber hinaus untersuchte *Krause (2005)* den Einfluss von Zusätzen (Zucker, Peptide, Antioxidationsmitteln, Oxidationsmitteln) zur Hydrolyselösung, die Variation des Amadori-Produkt-Salzsäure-Verhältnisses (von 2 mg/mL bis 0,1 mg/mL) und das Spülen der Probengefäße mit Stickstoff. Im Ergebnis blieb die Bildungsrate des Furosins reproduzierbar. Nur ein hoher Überschuss des Oxidationsmittels Natriumazid zeigte einen Effekt. Damit ist die Bestimmung der Lysinblockierung in Proteinen über das Furosin eine robuste Methode.

Alternativ zur Furosinanalytik wurden Methoden zur direkten Quantifizierung von Amadori-Produkten des Lysins in Lebensmitteln entwickelt. Die Freisetzung der Analyten aus dem Proteinverband erfolgte dabei durch eine enzymatische Totalhydrolyse. Auf diese Weise wurde Lactulosyllysin (*Henle et al., 1991*) bzw. mittels Isotopenverdünnungsanalyse Fructosyllysin (*Hegele et al., 2008b*) in Milch und Milchprodukten bestimmt. Eine von *Vinale et al. (1999)* entwickelte Methode berücksichtigt zusätzlich die Effektivität der enzymatischen Hydrolyse, da nicht nur ein isotopenmarkierter Fructosyllysin-Standard sondern ein Fructosyllysin enthaltendes isotopenmarkiertes Tetrapeptid (Ala-(Fru-Lys)-Leu-Gly) als Aufarbeitungsstandard eingesetzt wurde (*Vinale et al., 1999*).

Tabelle 2-2: Furosin/Fructosyllys in Lebensmitteln

Lebensmittel	Furosin	Fru-Lys	Quelle
[mg/100 g Protein]			
<b>Milch und Milchprodukte</b>			
UHT-Milch	56-220	150-590 <sup>‡</sup>	(Resmini et al., 1990)
	50-180	130-480 <sup>‡</sup>	(Henle et al., 1995)
	60-80	230-300 <sup>‡</sup>	(Fenaille et al., 2006)
		7,7 (proteingebunden); 0,006 (frei) <sup>a</sup>	(Hegele et al., 2008a) <sup>#,*</sup>
		7,1 (frei) <sup>a</sup>	(Troise et al., 2015)*
		(0,24 mg/100 g Milch)	
Babynahrung (Pulver), hypoallergen	360-610	960-1630 <sup>‡</sup>	(Penndorf et al., 2007)
	130-870	400-2700 <sup>‡</sup>	(Fenaille et al., 2006)
Babynahrung (Pulver), konventionell	370-1890	1950-5040 <sup>‡</sup>	(Henle et al., 1995)
	280-370	730-990 <sup>‡</sup>	(Penndorf et al., 2007)
	230-1460	710-4530 <sup>‡</sup>	(Fenaille et al., 2006)
Käse	5-580	13-1540 <sup>‡</sup>	(Resmini et al., 1990)
	3-17	7-40 <sup>‡</sup>	(Schwietzke et al., 2011)
<b>Backwaren</b>			
Salzstangen	160	590 <sup>‡</sup>	(Foerster, 2007)
<b>Honig</b>			
Honig	850-1840	1870-4050 <sup>‡</sup>	(Sanz et al., 2003)
<b>Gemüseprodukte</b>			
Karotten, getrocknet	1540-1550	4110-4140 <sup>‡</sup>	(Wellner et al., 2011)
	360-820 <sup>b</sup>	790-1800 <sup>‡</sup>	(Soria et al., 2009)
[mg/100 g Produkt]			
Tomaten, roh		0,33-0,96 (frei) (32-96 mg/100 g Protein) <sup>c</sup>	(Troise et al., 2015)*
Tomaten, Konserve		9-12	(Troise et al., 2015)*
Tomatenmark, doppeltkon- zentriert	43 [mg/100 g Trockenmasse]		(Sanz et al., 2000)*
<b>Produkte aus Obst</b>			
Aprikosen, getrocknet	8	18 <sup>‡</sup>	(Sanz et al., 2001)*
Rosinen	7-31	15-68 <sup>‡</sup>	(Sanz et al., 2001)*
Datteln, getrocknet	16	35 <sup>‡</sup>	(Sanz et al., 2001)*
Pflaumen, getrocknet	21	46 <sup>‡</sup>	(Sanz et al., 2001)*
Feigen, getrocknet	14	31 <sup>‡</sup>	(Sanz et al., 2001)*

<sup>‡</sup> Berechnung von Fru-Lys aus Furosin über Korrekturfaktoren: 6 M Salzsäure → Faktor 3,1; 8 M Salzsäure → Faktor 2,2 (Krause et al., 2003); <sup>a</sup> Angabe des freien, nicht-proteingebundenen Fru-Lys bezogen auf Proteingehalt in Milch von 3,4 mg/100 g (Souci et al., 2008) und vereinfachter Annahme der Dichte von Milch von 1,00 g/mL; <sup>b</sup> N-ε-FM-Lys und N-α-FM-Arg chromatographisch nicht getrennt; <sup>c</sup> Berechnung des Gehalts in mg/100 g Protein auf Grundlage des Proteingehalts in Tomaten von 1,0 mg/100 g (Souci et al., 2008); Bestimmung der Amadori-Produkte in: <sup>#</sup> gesamte Probe, \* im wässrigen Extrakt bzw. nach Proteinfällung.

Ein gut untersuchtes Produktspektrum sind Milch und Milchprodukte, in denen Lactose praktisch der einzige Zucker ist und damit Lactulosyllysin als quantitativ dominierendes Amadori-Produkt entsteht (*Henle et al., 1991*). Deshalb kann über die direkte Bestimmung des Lactulosyllylins oder die indirekte Bestimmung über Furosin der Amadori-Produktgehalt angegeben werden. In Tabelle 2-2 sind die Gehalte einiger Produkte aufgelistet. Neben dem Lactulosyllysin wurde das Fructosyllysin in Milch quantifiziert (*Hegele et al., 2008a*). Es wird ersichtlich, dass dieses in deutlich geringeren Konzentrationen als das Lactulosyllysin enthalten ist.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Amadori-Produkt-Gehalte in Lebensmitteln (Tabelle 2-2) wurden die Furosin-Gehalte entsprechend der verwendeten Salzsäurekonzentrationen bei den Aufarbeitungen und unter Berücksichtigung der entsprechenden Umsatzraten (6 M Salzsäure → Faktor 3,1; 8 M Salzsäure → Faktor 2,2) zusätzlich als Fructosyllysin angegeben (*Krause et al., 2003*). In Backwaren wurden bisher hauptsächlich AGEs quantifiziert. Zu Gehalten von Amadori-Produkten ist bisher wenig bekannt. Die Gehalte für Fructosyllysin in Obst- und Gemüseprodukten sind aufgelistet, um einen Vergleich zu den Amadori-Produkte der  $\alpha$ -Aminogruppen von Aminosäuren in diesen Produkten zu zeigen.

Die Untersuchungen zu den Amadori-Produkten in Lebensmitteln unterscheiden sich zum Teil deutlich in der Art der Aufarbeitung und die Bezugsgröße. Insbesondere der Gehalt von Furosin in Obst- und Gemüseprodukten wurde meist in Bezug auf die Einwaage oder die Trockenmasse ermittelt. Dadurch ist die Vergleichbarkeit der ermittelten Gehalte nur bedingt gegeben. In der Studie von *Sanz et al. (2000, 2001)* wurde nicht die Gesamte Probe hydrolysiert, sondern nur ein wässriger Extrakt. Deshalb kann weder davon ausgegangen werden, dass der gesamte Gehalt der Amadori-Produkte erfasst wurde, noch dass ausschließlich die Amadori-Produkte von freien Aminosäuren bestimmt wurden. *Troise et al. (2015)* und *Davidek et al. (2005)* ermittelten die Fructosyl-Amadori-Produkte von freien Aminosäuren über eine direkte Bestimmung ohne Hydrolyse mit Salzsäure.

#### 2.2.1.2 N- $\alpha$ -Amadori-Produkte

Amadori-Produkte der N- $\alpha$ -Aminogruppe von Aminosäuren können an freien Aminosäuren oder N-terminal in Peptiden oder Proteinen gebundenen Aminosäuren gebildet werden. Deshalb wurden N-terminale Amadori-Produkte bisher überwiegend in Lebensmitteln mit einem hohen Anteil freier Aminosäuren wie Produkten aus Obst und Gemüse analysiert und als Marker für die Prozessierung bzw. Lagerungsdauer diskutiert. Aber auch in Milch und Milchprodukten, die zu den proteinreichen Lebensmitteln gehören, wurden N- $\alpha$ -Amadori-Produkte quantifiziert. Die Gehalte sind in Tabelle 2-3 zusammengefasst, wobei aus einzelnen Studien nicht alle untersuchten Lebensmittel aufgenommen wurden. Um die Gehalte der N-terminalen Amadori-Produkte mit den Gehalten des Fructosyllylins bzw. Furosins (Tabelle 2-2) vergleichen zu können, wurden zu Studien, die mehrere N-terminale Amadori-Produkte

erfasst haben, die Summe aller erfassten Amadori-Produkte angegeben. Zusätzlich wurde bei einigen Studien exemplarisch das Amadori-Produkt mit dem höchsten Gehalt aufgelistet.

Auf Grund methodischer Unterschiede sind die Ergebnisse zwischen den Studien schwer vergleichbar. So wurde zum Teil die gesamte Glykierung, also die Summe aus Amadori-Produkten freier Aminosäuren und peptidgebundenen Amadori-Produkten, erfasst, indem Lebensmittelproben komplett mit Salzsäure hydrolysiert wurden (*Penndorf et al., 2007; Schwietzke et al., 2011; Soria et al., 2009; Wellner et al., 2011*). Die Quantifizierung erfolgte dann vergleichbar mit der Furosinanalytik über die Furoylmethyl-derivate der Aminosäuren (Abbildung 2-16). Wie bereits für die Amadori-Produkte des Lysins beschrieben, ist die Ausbeute des Furoylmethyl-derivats unter standardisierten Bedingungen der Hydrolyse mit Salzsäure vom Zuckerrest abhängig. *Penndorf et al. (2007)* und *Wellner et al. (2011)* konnten für N-terminale Amadori-Produkte (Lactulosyl- bzw. Fructosyl-Aminosäuren) zeigen, dass der Umsatz zum Furoylmethyl-derivat auch von der Aminosäure abhängig ist. Für ausgewählte Amadori-Produkte konnten individuelle Faktoren für die Ausbeute der Furoylmethyl-derivate ermittelt werden (*Penndorf et al., 2007; Wellner et al., 2011*).

In anderen Studien wurden die Amadori-Produkte in wässrigen Extrakten von Lebensmitteln analysiert. Die Amadori-Produkte nach wässriger Extraktion von Trockenfrüchten wurden von *Sanz et al. (2001)* nach Hydrolyse mit Salzsäure als die entsprechenden Furoylmethyl-aminosäuren erfasst. Bei diesem Vorgehen kann nicht unterschieden werden ob die N- $\alpha$ -Amadori-Produkte der proteinogenen Aminosäuren als Derivate freier Aminosäuren oder N-terminal an Peptide gebunden vorlagen. Doch als Aminosäure mit den höchsten Amadori-Produkt-Gehalten wurde die nicht-proteinogene Aminosäure  $\gamma$ -Aminobuttersäure gefunden.

*Troise et al. (2015), Davidek et al. (2005), Reutter & Eichner (1989) und Meitinger et al. (2014)* bestimmten in wässrigen Extrakten von Lebensmittelproben direkt und ausschließlich die Fructosyl-Derivate von freien Aminosäuren. Da nur die freien Amadori-Produkte erfasst wurden, ist kein Rückschluss auf die Gesamtglykierung bzw. kein Vergleich zum Gehalt des Fructosyllysins möglich. Einzig *Troise et al. (2015)* bestimmten zu den N- $\alpha$ -Fructosylaminosäuren auch das freie, nicht-peptidgebundene N- $\epsilon$ -Fructosyllysins.

*Penndorf et al. (2007)* untersuchten hypoallergene Säuglingsnahrung, die aus teil-hydrolysierten Molkenproteinen besteht. In diesen Produkten wurden die N-terminalen Amadori-Produkte der hydrophoben Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin und der N- $\alpha$ -Aminogruppe des Lysins nachgewiesen. In konventioneller Säuglingsnahrung konnten diese N-terminalen Amadori-Produkte nicht detektiert werden. Da die gesamte Probe mit Salzsäure hydrolysiert wurde, wurden die N-terminalen ARP von freien Aminosäuren und Peptiden erfasst. Es wurde vermutet, dass der hohe Gehalt an Peptiden in der hypoallergenen Säuglingsnahrung die Bildung der N-terminalen ARP begünstigt hat. Quantitativ liegt die Summe der N-terminalen ARPs in der gleichen Größenordnung wie Fructosyllysins.

Tabelle 2-3: N- $\alpha$ -FM- bzw. Fru-Aminosäuren in Lebensmitteln

Lebensmittel	Gehalt [mg/100g Produkt]	Analyten	Quelle
<b>Milch und Milchprodukte</b>			
UHT-Milch	0,7 1,0	Fru-Glu (frei) Summe Fru-Xaa (frei) <sup>a</sup>	(Troise et al., 2015)* (Troise et al., 2015)*
<b>[mg/100g Protein]</b>			
Babynahrung (Pulver), hypoallergen	39-95 (560-1350) 110-300 (1630-4220)	FM-Leu (Fru-Leu) Summe FM-Xaa (Fru-Xaa) <sup>b</sup>	(Penndorf et al., 2007) <sup>#</sup>
gereifter Weichkäse	2,4-21,8 (26-232)	Summe FM-Xaa (Fru-Xaa) <sup>c</sup>	(Schwietzke et al., 2011) <sup>#</sup>
Schnittkäse	3,5-15,1 (38-165)	Summe FM-Xaa (Fru-Xaa) <sup>c</sup>	
Hartkäse	3,1-15,5 (33-169)	Summe FM-Xaa (Fru-Xaa) <sup>c</sup>	
<b>Honig</b>			
Honig	520-2830	Summe FM-Xaa <sup>d</sup>	(Sanz et al., 2003) <sup>#</sup>
<b>Gemüseprodukte</b>			
Karotten, getrocknet	700-1140 (5250-8550) 690-910 (3210-4240) 1680-2440 (11230-16440) 130-150 150-310	FM-Ala (Fru-Ala) FM-GABA (Fru-GABA) Summe FM-Xaa (Fru-Xaa) <sup>e</sup> FM-Ala FM-GABA	(Wellner et al., 2011) <sup>#</sup>   (Soria et al., 2009) <sup>#</sup>
<b>[mg/100g Produkt]</b>			
Tomaten, roh	2,4-4,3 (240-230 mg/100 g Protein) <sup>x</sup> 10-13 (1000-1300 mg/100 g Protein) <sup>x</sup>	Fru-Glu (frei) Summe Fru-Xaa <sup>a</sup> (frei)	(Troise et al., 2015)*
Tomaten, Konserve	44-73 137-175	Fru-Glu (frei) Summe Fru-Xaa <sup>a</sup> (frei)	(Troise et al., 2015)*
Tomatenmark, doppeltkonzentriert	88 (mg/100 g Trockenmasse)	FM-GABA	(Sanz et al., 2000)*
Tomatenpulver	1540 680-3790 (mg/100 g Trockenmasse) 530-2070 (mg/100 g Trockenmasse) 2460-10840 (mg/100 g Trockenmasse)	Fru-Glu Fru-Glu Fru-GABA Summe <sup>f</sup>	(Davidek et al., 2005)* (Reutter and Eichner, 1989)*
	4,5 10,5	Fru-His Summe Fru-Xaa <sup>g</sup>	(Meitinger et al., 2014)*
Orangensaft aus Orangensaftkonzentrat	1,0-3,4 (mg/L) 1,3-4,7 (mg/L)	FM-GABA FM-Arg	(del Castillo et al., 2000) <sup>#</sup>
Aprikosen, getrocknet	4 9 206	FM-GABA Summe FM-Xaa <sup>h</sup> Fru-Pro	(Sanz et al., 2001)*  (Davidek et al., 2005)*
Rosinen	10-76 22-162	FM-GABA Summe FM-Xaa <sup>h</sup>	(Sanz et al., 2001)*

Lebensmittel	Gehalt	Analyten	Quelle
Datteln, getrocknet	18	FM-GABA	<i>(Sanz et al., 2001)*</i>
	21	Summe FM-Xaa <sup>h</sup>	
Pflaumen, getrocknet	22	FM-GABA	<i>(Sanz et al., 2001)*</i>
	30	Summe FM-Xaa <sup>h</sup>	
Feigen, getrocknet	8	FM-GABA	<i>(Sanz et al., 2001)*</i>
	12	Summe FM-Xaa <sup>h</sup>	
<b>Malz</b>			
Gerstenmalz	4	Fru-Val	<i>(Meitinger et al., 2014)*</i>
	16	Summe Fru-Xaa <sup>g</sup>	
Weizenmalz	15	Fru-Val	<i>(Meitinger et al., 2014)*</i>
	25	Summe Fru-Xaa <sup>g</sup>	

Summe aus den quantifizierten Fructosylaminosäuren (Fru-Xaa) bzw. Furoylmethylaminosäuren (FM-Xaa) von: <sup>a</sup> Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Cys, Met, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, Arg, His, Pro, Gly (*Troise et al., 2015*); <sup>b</sup> Ala,  $\alpha$ -Lys, Leu, Ile, Val (*Penndorf et al., 2007*); <sup>c</sup>  $\alpha$ -Lys, Val, Ile, Leu (*Schwietzke et al., 2011*); <sup>d</sup> Pro, GABA, Arg (*Sanz et al., 2003*); <sup>e</sup> Ala, GABA, Val, Leu, Ile (*Wellner et al., 2011*); <sup>f</sup> Leu, Ile, Phe, Val, Thr, Gln, Ala, Asn, GABA, Ser, Arg, Glu, Asp (*Reutter and Eichner, 1989*); <sup>g</sup> Leu, Ile, Phe, Met, Val, His, Tyr (*Meitinger et al., 2014*); <sup>h</sup> Ala, Pro, GABA (*Sanz et al., 2001*); <sup>x</sup> Berechnung des Gehalts in mg/100 g Protein auf Grundlage des Proteingehalts in Tomaten von 1,0 mg/100 g (*Souci et al., 2008*); Bestimmung der Amadori-Produkte in: # gesamte Probe, \* im wässrigen Extrakt bzw. nach Proteinfällung.

Schwietzke untersuchten N-terminale ARP in verschiedenen Käsen. Bei der Käsureifung werden Proteine zu Peptiden und Aminosäuren abgebaut. Dadurch steigt der Anteil der N- $\alpha$ -Aminogruppen und die Bildung von N-terminalen ARPs wird begünstigt. Da jeweils die gesamte Probe mit Salzsäure hydrolysiert wurde, konnten mit einer Methode ebenfalls die N- $\alpha$ -Amadori-Produkte von Aminosäuren und Peptiden sowie N- $\epsilon$ -Fructosyllysine als deren FM-Derivate erfasst werden. Die Quantifizierung der N-terminalen Amadori-Produkte ergab Gehalte, die in Summe in der gleichen Größenordnung wie Furosine bzw. Fructosyllysine lagen. Damit wurde eindeutig belegt, dass N-terminale Amadori-Produkte in peptidreichen Lebensmitteln quantitativ relevant sind.

*Troise et al. (2015)* analysierten freie Fructosylaminosäuren von 20 proteinogenen Aminosäuren in Milch. Die Gehalte der meisten N- $\alpha$ -Amadori-Produkte lagen um Faktor 5 bis 10 niedriger als freies N- $\epsilon$ -Fructosyllysine. Nur für Fructosylglutaminsäure wurde ein dreifach höherer Gehalt quantifiziert. Die Bilanzierung zeigt, dass die Summe der N-terminalen Fructosylaminosäuren in Milch in der gleichen Größenordnung wie Fructosyllysine liegt.

*Wellner et al. (2011)* untersuchten die Gehalte N-terminaler Amadori-Produkte in getrockneten Karottenprodukten und erhielten für die untersuchten Aminosäuren Gehalte der N-terminalen ARPs, die schon für die einzelnen Aminosäuren in der Größenordnung von Fructosyllysine bzw. Furosine lagen. In Summe überstiegen die Gehalte der N-terminalen ARPs deutlich den Gehalt von Fructosyllysine. Auch hier wurde die gesamte Glykierung der N- $\alpha$ - und N- $\epsilon$ -Aminogruppen von freien und peptidgebundenen Aminosäuren nach Hydrolyse mit Salzsäure erfasst.

Die Untersuchungen von *Sanz et al. (2001)* und *Troise et al. (2015)* an Trockenobst bzw. Tomaten und Tomatenprodukten zeigten, dass in diesen Lebensmitteln die Amadori-Produkte von quantitativ wichtigen Aminosäuren besonders hohe Gehalte aufweisen. So konnte *Sanz (2001)* in Trockenobst höhere Gehalte von FM-GABA (Furoylmethyl- $\gamma$ -Aminobuttersäure) als Furosin messen. *Troise et al. (2015)* fanden in Tomaten und Tomatenprodukten besonders hohe Gehalte von Fructosylglutaminsäure. Die Ursache für die besonders hohen Gehalte sind mit den hohen Gehalten dieser Aminosäuren in den Früchten zu begründen. *Troise et al. (2015)* zeigten, dass die relative Glykierung für andere freie Aminosäuren je nach Produkt um Faktor 10 bis 100 höher lag als für Glutaminsäure.

Die Gesamtbilanzierung des Gehalts der N- $\alpha$ -Amadori-Produkte von Aminosäuren in den untersuchten Lebensmitteln ist nicht nur von der Probenart und der Prozessierung sondern auch stark vom Spektrum der untersuchten Aminosäuren abhängig. So konnten *Reutter & Eichner (1989)* in Tomatenpulver Gesamtgehalte (Summe) der untersuchten 13 N- $\alpha$ -Fructosylaminosäuren von bis zu 10,8 g/100 g Trockenmasse quantifizieren. Dieser Gehalt entspricht in diesem Extrembeispiel 10% der Trockenmasse des Tomatenpulvers und bezogen auf den Proteingehalt (*Souci et al., 2008*) ergibt sich ein Anteil der N- $\alpha$ -Fructosylaminosäuren von ca. 60 g/100 g Protein.

Anders als in den bisher beschriebenen Methoden haben *Meltretter et al. (2014)* die Glykierung des  $\beta$ -Lactoglobulins nach partieller Hydrolyse mit der Endoproteinase GluC untersucht. Sie konnten über eine Methode mit relativer Quantifizierung N-terminale die Modifizierung des  $\beta$ -Lactoglobulins zum Lactosulylderivat in Milchprodukten nachweisen. Dabei konnte das N-terminale Amadori-Produkt schon in Rohmilch nachgewiesen werden. Mit zunehmender Hitzebehandlung von Trinkmilch in der Reihe Frischmilch, ESL-Milch und UHT-Milch wurden höhere Anteile des N-terminalen Amadori-Produkts bestimmt (*Meltretter et al., 2014*).

## 2.2.2 Carboxyalkyl-AGEs in Lebensmitteln

### 2.2.2.1 Carboxyalkylderivate des Lysins in Lebensmitteln

Carboxymethyllysin (CML) wird verbreitet als Marker zur Bewertung des Fortschreitens der Maillard-Reaktion in Lebensmitteln genutzt und ist eines der am meisten mit der Nahrung aufgenommenen AGEs (*Hellwig and Henle, 2014; Nguyen et al., 2014*). CML, aber zunehmend auch Carboxyethyllysin (CEL), wurden in zahlreichen Lebensmitteln quantifiziert (Tabelle 2-4). Der Gehalt von CML und CEL wird von der Zusammensetzung des Lebensmittels und der thermischen Behandlung bei der Herstellung beeinflusst. Entsprechend wurden besonders in Backwaren hohe Gehalte detektiert und *Assar et al. (2009)* konnten in der Kruste von Brot 10-fach höhere CML-Gehalte quantifizieren als in der Krume. Die Gehalte von CEL sind meist geringer oder höchstens gleich den Gehalten von CML (*Scheijen et al., 2016*).

Ein Vergleich der Gehalte der N-ε-Carboxyalkylderivate (Tabelle 2-4) mit denen der N-ε-Amadori-Produkte des Lysins (Tabelle 2-3) in Lebensmitteln zeigt, dass je nach Lebensmittel ein Unterschied um Faktor 10 bis 100 besteht.

Tabelle 2-4: CML und CEL in ausgewählten Lebensmitteln

Lebensmittel	CML	CEL	Quelle
[mg/kg Lebensmittel]			
<b>Milch und Milchprodukte</b>			
UHT-Milch	0,9-1,5		(Fenaille et al., 2006)
	0,3		(Hegele et al., 2008a)
Babynahrung (Pulver), hypoallergen	2,4-5,3		(Fenaille et al., 2006)
Babynahrung (Pulver), konventionell	3,7-16,4		(Fenaille et al., 2006)
Cheddar	11,8		(Hull et al., 2012)
	5,8		(Assar et al., 2009)
Mozzarella	5,8		(Hull et al., 2012)
	0,5	0,4	(Scheijen et al., 2016)
Parmesan	17,6		(Hull et al., 2012)
	2,2	6,3	(Scheijen et al., 2016)
Cottage cheese	4,3		(Hull et al., 2012)
	0,7	0,1	(Scheijen et al., 2016)
Gouda	0,3	0,1	
Camembert	1,2	3,0	
<b>Backwaren</b>			
Brotkruste	37-46		(Assar et al., 2009)
Brotkrume	2,6-4,5		
Brot	4-39		(Hull et al., 2012)
	2-11	1-6	(Scheijen et al., 2016)
Knäckebrot	10	14	
Salzstangen	92 <sup>b</sup>		(Foerster, 2007)
Kekse	24-62		(Hull et al., 2012)
	10-26	5-34	(Scheijen et al., 2016)
Cornflakes/Reiscrisps/Cerealien	14-54		(Hull et al., 2012)
	6-20	5-16	(Scheijen et al., 2016)
<b>Gemüseprodukte</b>			
Karotten, getrocknet	16-26 <sup>a</sup>		(Wellner et al., 2011)
Tomaten	0,1		(Hull et al., 2012)
Tomatenkonserve	0,3	0,1	(Scheijen et al., 2016)
Oliven, grün	1,2	0,1	
<b>Obst</b>			
Orangen	0,8		(Hull et al., 2012)

<sup>a</sup> berechnet aus 184-308 mg CML/kg Protein (Wellner et al., 2011) über den Proteingehalt des wasserfreien Rückstands einer Karotte (Souci et al., 2008); <sup>b</sup> berechnet aus 1022 mg CML/kg Protein (Foerster, 2007) über den Proteingehalt 9,0 g/100 g Salzstangen (Souci et al., 2008).

### 2.2.2.2 N-terminale Carboxyalkyl-AGEs

Zu N-terminalen Carboxyalkyl-Verbindungen in Lebensmitteln gibt es in der Literatur bisher kaum Informationen. *Meltretter et al. (2013)* entwickelten eine Screeningmethode zur Bestimmung der Glykierungsstellen in  $\beta$ -Lactalbumin. In einem modellhaft mit AGEs angereicherten  $\beta$ -Lactalbumin nach Erhitzung in Gegenwart von Lactose konnten sowohl das N-terminale Carboxymethyleucylpeptid (CM-Leucylpeptid) als auch das Carboxyethylleucylpeptid (CE-Leucylpeptid) detektiert werden. Die semiquantitative Abschätzung des Gehalts der AGEs in realen Milchproben ergab Spuren des CM-Leucylpeptids in Sterilmilch, UHT-Milch, Kaffeesahne und Milchpulver. Das CE-Leucylpeptid wurde nicht detektiert.

Insbesondere für Lebensmittel mit hohen Anteilen freier Aminosäuren und Peptide wurde belegt, dass der Gehalt von N- $\alpha$ -Amadori-Produkten quantitativ genau so relevant sein kann wie von Fructosyllysin. Zu den Gehalten von AGEs der Seitenkette des Lysins und insbesondere zu CML und CEL existieren bereits umfangreiche Daten, die deren Vorkommen über ein breites Spektrum von Lebensmitteln zeigen. Deshalb ist stark davon auszugehen, dass auch N-terminale CM- und CE-Derivate in Lebensmitteln in nachweisbaren Gehalten vorkommen. Da die Analytik von *Meltretter et al. (2013)* auf einer semiquantitativen Methode basierte, kann vermutlich über eine gezieltere Freisetzung und Quantifizierung N-terminaler AGEs eine deutlich höhere Empfindlichkeit erreicht werden.

### 2.2.3 2(1H)-Pyrazinone in Lebensmitteln

Die Entdeckung von 2(1H)-Pyrazinonstrukturen gelang erstmals bei der Untersuchung der farbgebenden Substanzen in Zwischen- und Nebenprodukten der Zuckerherstellung aus Zuckerrüben. Dabei konnten die 2(1H)-Pyrazinone als Reaktionsprodukte aus Peptiden und Dicarbonylverbindungen charakterisiert werden und wurden als Vorstufen der Melanoidinbildung interpretiert (*Prey and Petershofer, 1968*). Über Gehalte der 2(1H)-Pyrazinone in diesen Fabrikationsprodukten und gegebenenfalls in abgeleiteten Lebensmitteln ist allerdings nichts bekannt.

#### 2.2.3.1 2(1H)-Pyrazinone als aromaaktive Moleküle

Die Reaktion der  $\alpha$ -Aminogruppe von Aminosäuren mit 1,2-Dicarbonylverbindungen führt im Zuge des Strecker-Abbaus insbesondere unter thermischer Belastung zur Bildung von aromaaktiven Verbindungen, wie Strecker-Aldehyden, nach Decarboxylierung und Desaminierung, und zu 2(1H)-Pyrazinen, die aus an der Transaminierung beteiligten Dicarbonylverbindungen entstehen (*van Boekel, 2006*).

Die strukturelle Ähnlichkeit von Pyrazinen und 2(1H)-Pyrazinonen lässt für flüchtige Derivate eine entsprechend aromaaktive Wirkung vermuten. 2(1H)-Pyrazinone werden im Gegensatz zu Pyrazinen aus Peptiden gebildet. So konnte nachgewiesen werden, dass in Reaktionsansätzen (180 °C, 2 h) aus Glucose und Peptiden N<sup>1</sup>-Alkyl-2(1H)-pyrazinone mit Röstaroma entstehen. N<sup>1</sup>-Alkyl-2(1H)-pyrazinone (Abbildung 2-15) können aus Dipeptiden

oder längeren Peptiden nach Spaltung nach der zweiten Aminosäure sowie thermisch induzierter Decarboxylierung gebildet werden (*Izzo and Ho, 1992; Oh et al., 1992*).

### 2.2.3.2 2(1H)-Pyrazinone in Modellbackwaren

*Kunert (2009)* untersuchte in einem Modell aus dem Peptid Gly-Ala-Phe und Glyoxal in einer Cellulosematrix den Einfluss von  $a_w$ -Wert, pH-Wert und Erhitzungszeit bei 100 °C auf die 2(1H)-Pyrazinonbildung. Aus Modellierungen leitete sie optimale Bedingungen für die 2(1H)-Pyrazinonbildung ab. Günstig wirkten sich hohe  $a_w$ -Werte, ein leicht basischer pH-Wert und eine lange Erhitzungszeit aus. Die beobachtete Abhängigkeit vom pH-Wert entspricht damit den experimentellen Ergebnissen von *Krause (2005)* in wässriger Lösung bei 37 °C (Abschnitt 2.1.3.3). Die Produktbildung ist in der Anfangsphase (20 min) am größten und die Zunahme mit fortschreitender Erhitzung nur noch gering, was sich mit den Beobachtungen von *Krause (2005)* im wässrigen Modell deckt.

*Kunert (2009)* führte außerdem Backversuche mit Weizenbrötchen und Laugenbrötchen unter Zusatz von Tripeptiden durch, wobei ein äquimolarer Zusatz von Glyoxal oder Methylglyoxal nicht zu einer Steigerung der 2(1H)-Pyrazinongehalte im Vergleich zur Probe ohne Zusatz von Dicarbonylverbindungen führte. Sie folgerte, dass die Bildung von Dicarbonylverbindungen induziert durch den Backprozess deutlich höhere Gehalte erzeugen müsse. *Kunert (2009)* gelang der Nachweis der 2(1H)-Pyrazinonbildung der zugesetzten Peptide in der Kruste der Brötchen, nicht aber in der Krume. Dabei wurde in der Kruste der Weizenbrötchen ausschließlich das vom Glyoxal abgeleitete 2(1H)-Pyrazinon und in der Kruste der Laugenbrötchen ausschließlich das von Methylglyoxal abgeleitete 2(1H)-Pyrazinon gefunden (*Kunert, 2009*).

Die Experimente von *Kunert (2009)* zeigen, dass 2(1H)-Pyrazinone in Lebensmitteln zu erwarten sind. In Backwaren und insbesondere in der thermisch stärker belasteten Kruste scheinen die Reaktionsbedingungen zur Bildung der N-terminalen AGEs besonders günstig zu sein. Das Ergebnis aus dem Umsatz eines Peptids mit Glucose, dass besonders im Basischen hohe Gehalte des Glyoxal-2(1H)-Pyrazinons zu erwarten sind und das Ergebnis aus dem Backversuch mit den Laugenbrötchen, dass in der basischen Kruste nur das Methylglyoxal-2(1H)-Pyrazinon nachweisbar war, erscheinen widersprüchlich. Deshalb sollten weitere Versuche unternommen werden, den Einfluss der Reaktionsbedingungen und insbesondere des pH-Werts auf die Zusammensetzung des Produktspektrums zu untersuchen.

### 2.2.4 N-terminale AGEs in Lebensmitteln

Insbesondere für Lebensmittel mit hohen Anteilen freier Aminosäuren und Peptide wurde belegt, dass der Gehalt von N- $\alpha$ -Amadori-Produkten quantitativ genau so relevant sein kann wie von Fructosyllysine (Abschnitt 2.2.1). Zu den Gehalten von AGEs der Seitenkette des Lysins und insbesondere zu CML und CEL existieren bereits umfangreiche Daten, die deren Vorkommen über ein breites Spektrum von Lebensmitteln zeigen (Abschnitt 2.2.2.1). Da die

Bildung der Carboxyalkylverbindungen mechanistisch eng mit der Bildung bzw. dem Abbau von Amadori-Produkten verknüpft ist, stellt sich die Frage, ob in Lebensmitteln auch das Vorkommen N-terminaler CM- und CE-Derivate nachweisbar ist.

In der bisher einzigen Studie zu N-terminalen Carboxyalkyl-Verbindungen in Lebensmitteln konnten *Meltretter et al. (2013)* in Erhitzungsexperimenten von  $\beta$ -Lactoglobulin mit Lactose die Bildung des N-terminalen CM- und CE-Derivats zeigen. In kommerzieller Milch gelang allerdings nur die Detektion des N-terminalen CM-Peptids in Spuren. Die Analytik basierte allerdings auf einer semiquantitativen Methode. Über eine gezieltere Freisetzung und Quantifizierung N-terminaler AGEs kann vermutlich eine deutlich höhere Empfindlichkeit erreicht werden.

Als AGEs, die ausschließlich an den N-Termini von Peptiden entstehen können, wurden die 2(1H)-Pyrazinone entdeckt (*Prey and Petershofer, 1968*). *Kunert (2009)* konnte bereits deren Bildung in der Kruste von Backwaren nach Zusatz eines Tripeptids belegen. In der thermisch weniger stark belasteten Krume waren keine 2(1H)-Pyrazinone nachweisbar.

Mit dieser Arbeit sollen die Kenntnisse der Bildung N-terminaler AGEs in Lebensmitteln erweitert werden. Dabei soll die Verwendung von Peptiden sowohl den Nachweis N-terminaler CM- und CE-Derivate als auch von 2(1H)-Pyrazinonen ermöglichen. Die Gehalte von CML und CEL sind in Backwaren im Vergleich zu anderen Lebensmitteln besonders hoch (Tabelle 2-4). Deshalb soll die Bildung N-terminaler AGEs in Modellbackwaren systematisch untersucht werden.

## 2.3 Maillard-Reaktion *in vivo*

In diesem Abschnitt sind Kenntnisse zum Stoffwechsel von Erythrozyten und der Glykierung des Hämoglobins zusammengetragen. Erythrozyten werden im Knochenmark gebildet und verlieren während ihrer Reifung Zellorganellen wie den Zellkern und die Mitochondrien. Deshalb werden reife Erythrozyten nicht als Zellen sondern korpuskuläre Elemente bezeichnet. Bei der Reifung wird das Hämoglobin gebildet, das mengenmäßig bedeutendste Protein in Erythrozyten ist. Die Hauptaufgabe der Erythrozyten ist die Versorgung aller Körperzellen mit Sauerstoff, der an Hämoglobin gebunden transportiert wird (*Löffler et al., 2007*). Die im Blutkreislauf zirkulierenden Erythrozyten haben ein durchschnittliches Alter von ca. 60 Tagen und erreichen ein maximales Alter von ca. 120 Tagen (Abschnitt 2.3.4.3). Während dieser Zeit wird das Hämoglobin nicht erneuert und kann Glykierungsprodukte akkumulieren. Diese Eigenschaft wird in der medizinischen Diagnostik zur Bewertung des Langzeitblutzuckers über den HbA<sub>1c</sub>-Wert genutzt. In der vorliegenden Arbeit soll das Hämoglobin von Dialysepatienten und von Probanden einer normoglykämischen Kontrollgruppe auf das Vorkommen N-terminaler AGEs untersucht werden. Die Gehalte der N-terminalen AGEs des Hämoglobins sollen im Zusammenhang mit den Besonderheiten im

Stoffwechsel von Urämikern wie einem erhöhten oxidativen Stress sowie erhöhten Gehalten von 1,2-Dicarbonylverbindungen diskutiert werden.

### 2.3.1 Glucosestoffwechsel von Erythrozyten

#### 2.3.1.1 Glucosetransport und Hyperglykämie

Erythrozyten als frei zirkulierende Zellen werden über das Blut mit Stoffen versorgt, die zur Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels nötig sind. Als Energiequelle nehmen Erythrozyten Glucose aus dem Blut auf. Das geschieht über erleichterte Diffusion von Glucose über den insulinunabhängigen Glucosetransporter GLUT-1.

Die Aktivität des GLUT-1 in Erythrozyten wird über die Bindung von ATP reguliert. Die vermehrte Bindung von ATP an das Transportprotein kann  $v_{\max}$  und  $K_m$  für die Glucoseaufnahme verringern. Dieser Effekt von ATP auf die Transportaktivität kann durch  $H^+$ , AMP bzw. ADP kompetitiv gehemmt werden. Liegt ein ATP-Mangel vor, führt die Konformationsänderung des Transportproteins zu einer Erhöhung von  $v_{\max}$  um den Faktor 1,4 bis 2. Weiterhin wurde für die Aufnahme von Glucose in Erythrozyten auf Grund der hohen GLUT-1-Expression festgestellt, dass diese um drei Größenordnungen über der metabolischen Kapazität liegt. Als Erklärungsansatz für die viel höhere Aufnahme von Glucose im Vergleich zur Kapazität des Metabolismus wird diskutiert, dass die Erythrozyten Glucose zu bestimmten Geweben und Organen mit besonders großem Energiebedarf transportieren. Dadurch könnte zum Beispiel das Gehirn zusätzlich zu der im Plasma gelösten Glucose über die Erythrozyten mit Glucose versorgt werden (*Cura and Carruthers, 2012; Jacquez, 1984*).

Das Vorliegen einer Hyperglykämie wirkt sich direkt auf die Glucoseaufnahme durch Zellen mit insulinunabhängigen Glucosetransportern aus und führt dadurch zu einer intrazellulären Hyperglykämie. Davon sind zum Beispiel Erythrozyten und Endothelzellen betroffen (*Thornalley, 1988*). *Khera et al. (2008)* beobachteten in *in vitro*-Experimenten mit Erythrozyten, dass das nichtmetabolisierbare Glucose-Analogon  $^{14}C$ -3-O-Methylglucose konzentrationsunabhängig im Konzentrationsbereich 1 bis 50 mM in 2-5 Minuten bis zu einem steady-state-Verhältnis aufgenommen wurde. Die Regulation des Transports wirkt sich also nur gering bis unwesentlich auf die quantitative Aufnahme der Glucose aus. Deshalb führt der hyperglykämische Zustand des Plasmas zu einer intrazellulären Hyperglykämie in insulinunabhängigen Geweben (*Thornalley, 1988*).

#### 2.3.1.2 Hyperglykämie als Krankheitsbild

Eine zeitweise Hyperglykämie tritt postprandial nach Nahrungsaufnahme ein und wird vom Körper auf das Nüchternlevel mit einer Konzentration von ca. 5 mmol Glucose/L Plasma innerhalb von 2 Stunden reguliert (*Maessen et al., 2015*). Dies geschieht hauptsächlich insulinvermittelt. Das Vorliegen eines Diabetes mellitus ist grundsätzlich durch eine Erhöhung der Plasmaglukosekonzentration und somit eine dauerhafte Hyperglykämie definiert.

Wenn der Wert der Nüchtern-Plasmaglucose auf über 7 mmol/L oder die Plasmaglucose postprandial auf über 11,1 mmol/L (oraler Glucosetoleranztest) ansteigt, wird ein Diabetes mellitus diagnostiziert. Dabei werden zwei Haupttypen unterschieden. Bei Typ-I-Diabetes liegt ein absoluter Insulinmangel vor, der aus der autoimmunen Zerstörung der  $\beta$ -Zellen in der Bauchspeicheldrüse resultiert. Typ-II-Diabetes ist durch Insulinresistenz kombiniert mit einer eingeschränkten Insulinsekretion charakterisiert (*Deutsche Diabetes Gesellschaft, DDG*).

### 2.3.1.3 Glycolyse und anaerobe Fermentation

Zur Energiegewinnung in den Erythrozyten wird die Glucose in der Glycolyse zu Pyruvat abgebaut, wobei pro Molekül Glucose zwei ATP entstehen und zwei  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  reduziert werden. Da Erythrozyten in ihrem Reifungsprozess die Mitochondrien verlieren, sind sie nicht in der Lage Pyruvat oxidativ zu Acetyl-CoA und weiter im Citratzyklus zu Kohlendioxid umzusetzen. Deshalb wird in Erythrozyten die anaerobe Milchsäurefermentation genutzt, um  $\text{NADH}$  zu  $\text{NAD}^+$  zu oxidieren und die Glycolyse zur Produktion von ATP aufrecht zu halten (*Cura and Carruthers, 2012*).

### 2.3.1.4 Glycolyse und Hyperglykämie

Für Endothelzellen, die wie Erythrozyten bei vorliegender Plasma-Hyperglykämie einer intrazellulären Hyperglykämie ausgesetzt sind, fanden *Tilton et al. (1992)*, dass die Glycolyse die überschüssige Glucose nicht so schnell verwerten kann, wie diese verfügbar ist. Daraus resultiert eine erhöhte Konzentration von Triosephosphaten, die Intermediate der Glycolyse darstellen (*Tilton et al., 1992*). Aus dieser erhöhten Konzentration der Triosphosphate ergibt sich eine verstärkte Bildung von Methylglyoxal und dessen Abbauprodukt aus dem Glyoxalasesystem D-Lactat (Abschnitt 2.3.2.5). Dieser Zusammenhang konnte für Erythrozyten in *in vitro*-Experimenten belegt werden (*Karg et al., 2009; Thornalley et al., 2001*).

## 2.3.2 Dicarbonylverbindungen in Blutplasma und Erythrozyten

### 2.3.2.1 Direkte alimentäre Aufnahme von Dicarbonylverbindungen

Die im Plasma messbare Konzentration von 1,2-Dicarbonylverbindungen kann als Quellen die alimentäre Aufnahme und die endogene Bildung haben. Methylglyoxal aus der Nahrung wirkt sich nach einer Untersuchung von *Degen et al. (2013)* nicht quantitativ auf die Ausscheidung von Methylglyoxal bzw. dessen Metaboliten D-Lactat im Urin aus und sollte damit auch die Plasmakonzentration nicht entscheidend beeinflussen (*Degen et al., 2013*). Für 3-DG konnten *Degen et al. (2014)* nachweisen, dass die alimentäre Aufnahme von 3-DG dessen renale Exkretion, vor allem aber die des Metaboliten 3-Desoxyfructose, erhöht. Es wird angenommen, dass 3-DG intestinal resorbiert, aber anschließend enzymatisch in die weniger reaktive 3-Desoxyfructose umgewandelt wird und somit nur zu einem geringen Teil zum Gehalt von freiem 3-DG *in vivo* beiträgt (*Degen et al., 2014*).

### 2.3.2.2 Postprandialer Anstieg der Plasmagehalte von Dicarbonsylverbindungen

*Beisswenger et al. (2001)* untersuchten in einer Studie mit Typ-1-Diabetikern einen postprandialen Anstieg der Plasmakonzentration von Methylglyoxal und 3-DG nach einer Testmahlzeit. Der Anstieg der Dicarbonsylkonzentrationen korrelierte direkt mit der postprandialen Plasma-Glucosekonzentration (*Beisswenger et al., 2001*).

In einer modellhafteren Studie konnten *Maessen et al. (2015)* den Einfluss oral verabreichter Glucose auf den Plasmagehalt von 1,2-Dicarbonsylverbindungen zeigen. Dabei wurde nach Aufnahme der Glucose ausgehend von einem Grundlevel nach 10-12 h Fasten ein deutlicher Anstieg der Konzentrationen von Methylglyoxal, Glyoxal und 3-DG beobachtet. Im Verlauf von 2 Stunden fiel die Plasmaglukosekonzentration bei Normoglykämikern annähernd auf das Ausgangslevel zurück. Bei Probanden mit beeinträchtigter Glucosetoleranz und stärker ausgeprägt bei Typ-II Diabetes war die Glucosekonzentration nach 2 Stunden noch nicht normalisiert. Vergleichbare Effekte wurden für die Plasmagehalte der Dicarbonsylverbindungen Methylglyoxal, Glyoxal und 3-DG beobachtet, wobei nach 2 Stunden bei allen Probandengruppen die Plasmakonzentration noch nicht auf den Ausgangswert zurück gesunken war. Die Zunahme der Konzentration der Dicarbonsylverbindungen im Plasma war mit zunehmendem Grad der Glucoseintoleranz stärker ausgeprägt bzw. das Absinken verzögert.

*Maessen et al. (2015)* vermuteten aus der höheren Konzentration der Dicarbonsylverbindungen im Plasma der Probanden mit Glucoseintoleranz, dass die Dicarbonsylverbindungen aus Zellen mit insulinunabhängiger Glucoseaufnahme wie Erythrozyten und Endothelzellen stammen könnten. Für Erythrozyten wurde dieser Effekt von *Thornalley (1988)* in *in vitro* Experimenten nachgewiesen. Hyperglykämische Bedingungen verursachten erhöhte extrazelluläre Gehalte von Methylglyoxal und dessen Abbauprodukt D-Lactat.

Die Studie von *Maessen et al. (2015)* zeigt, dass der von *Beisswenger et al. (2001)* beobachtete postprandiale Anstieg der Konzentration von Methylglyoxal und 3-DG im Plasma allein aus der Aufnahme von Kohlenhydraten über die Testmahlzeit resultieren könnte. Ein Beitrag alimentärer Dicarbonsylverbindungen, insbesondere von 3-DG, ist allerdings nicht auszuschließen (*Degen et al., 2014*).

### 2.3.2.3 Quellen für Glyoxal und Methylglyoxal in vivo

Die Bildungsmechanismen für Glyoxal und Methylglyoxal aus Glucose bzw. nach Reaktion der Glucose mit einem Amin sind in Abschnitt 2.1.2 beschrieben. Die Entstehung von Glyoxal durch oxidative Prozesse ist neben Kohlenhydraten auch aus dem Abbau von Ascorbinsäure (*Dunn et al., 1990*) oder ungesättigten Fettsäuren (*Loidl-Stahlhofen and Spiteller, 1994*) bekannt. Für Methylglyoxal ist *in vivo* insbesondere die Bildung als Nebenprodukt der Glycolyse relevant. Weitere Quellen sind Aminoaceton und Hydroxyaceton aus dem Katabolismus von Threonin, der Metabolismus von Aceton und die Oxidation von Ketonkörpern insbesondere bei diabetischer Ketoacidose (*Van der Jagt and Hunsaker, 2003*).



In Erythrozyten wird 3-DG nicht-enzymatisch (Abschnitt 2.1.2) oder nach enzymatischer Deglykierung (Abschnitt 2.3.4) aus dem Amadori-Produkt gebildet bzw. aus dem Plasma aufgenommen (*Fujii et al., 1995*). Das intrazelluläre 3-DG kann von einer Aldehyddehydrogenase als weiterer Bestandteil der enzymatischen Abwehr gegen 1,2-Dicarbonylverbindungen zu 2-Keto-3-desoxygluconsäure oxidiert werden (*Collard et al., 2007*). Da Aldehyddehydrogenasen eine breite Substratspezifität gegenüber Aldehyden aufweisen kann das gleiche Enzym vermutlich auch Methylglyoxal zu Pyruvat umsetzen (*Van der Jagt and Hunsaker, 2003*). Für 3-DG und Methylglyoxal ist als weiterer Abbauweg die Bildung von 3-Desoxyfructose bzw. Acetol durch die Aldosereduktase bekannt. Die Aldosereduktase weist eine breite Substratspezifität, eine hohe Affinität zu 1,2-Dicarbonylverbindungen, aber in Erythrozyten nur eine geringe Aktivität auf (*Schalkwijk et al., 2004; Van der Jagt et al., 1992*).

### 2.3.2.6 Gehalte von Dicarbonylverbindungen in Erythrozyten und Plasma

Für die kurzkettigen 1,2-Dicarbonylverbindungen Glyoxal und Methylglyoxal wird angenommen, dass diese die Erythrozytenmembran auf Grund ihrer kleinen Molekülmasse durchdringen können (*Phillips and Thornalley, 1993*). Für 3-DG konnten *Fuji et al. (1995)* *in vitro* eine Aufnahme aus dem Medium in Erythrozyten zeigen. Die Konzentrationen der 1,2-Dicarbonylverbindungen in Erythrozyten bzw. Plasma müssten sich folglich gegenseitig beeinflussen. Es sind nur wenige quantitative Daten zu den Gehalten von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Erythrozyten aus der Literatur verfügbar. Die in Tabelle 2-5 angegebenen Gehalte für Methylglyoxal in Erythrozyten unterscheiden sich zwischen den Studien geringfügig, liegen aber in der gleichen Größenordnung. Für die Methylglyoxalgehalte in den Erythrozyten von Diabetikern wurden signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu Kontrollgruppen bestimmt (*Nicolay et al., 2006; Thornalley et al., 1989*).

Tabelle 2-5: 1,2-Dicarbonylverbindungen in Erythrozyten

$\mu\text{mol/L}^*$	Kontrolle	Patienten		Quelle
MGO	0,1-1,2	0,2-3,0	Urämie, nicht diabetisch	( <i>Karg et al., 2009</i> )
	$0,4 \pm 0,2^a$ (0,2-0,7) <sup>a</sup>	$0,8 \pm 0,6^a$ (0,1-1,8) <sup>a</sup>	Typ-I-Diabetes	( <i>Nicolay et al., 2006</i> )
	$1,4 \pm 0,2$	$3,6 \pm 2,3$	Diabetes (Typ nicht angegeben)	( <i>Thornalley et al., 1989</i> )
3-DG	$1,0 \pm 0,1^a$	$1,6 \pm 0,2^a$	Typ-II-Diabetes	( <i>Hamada et al., 2000</i> )
	$3,7 \pm 0,4$	$10,4 \pm 2,0$	Typ-I- und Typ-II-Diabetes	( <i>Tsukushi et al., 2002</i> )

\*Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung bzw. Spannweite; <sup>a</sup> Berechnung aus  $5,46 \pm 0,57$  nmol/g Hämoglobin (Typ-II-Diabetes) bzw.  $3,23 \pm 0,24$  nmol/g Hämoglobin (Kontrolle) und mit der Näherung 300 mg Hämoglobin/mL Erythrozyten (*Delpierre et al., 2004*).

*Karg et al. (2009)* analysierten den Gehalt von Methylglyoxal in Erythrozyten (Tabelle 2-5) und Plasma (Tabelle 2-6) von Patienten, die keine Diabetiker waren und auf Grund einer eingeschränkten Nierentätigkeit langfristig auf die Hämodialyse angewiesen waren (nicht-

diabetische Urämiker). Es wurden zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede in den Methylglyoxalkonzentrationen sowohl in den Erythrozyten als auch dem Blutplasma ermittelt. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Methylglyoxalgehalte in der Kontrollgruppe in den Erythrozyten höher waren als im Plasma, bei den Urämikern aber nicht. Das ist ein Hinweis auf die Akkumulation von Dicarbonylverbindungen im Plasma von Urämikern auf Grund der eingeschränkten Nierenfunktion (Karg et al., 2009).

Der Gehalt von 3-DG (Tabelle 2-5) wurde von Tsukushi et al. (2002) in Erythrozyten von Normoglykämikern bzw. diabetischen Kindern (Typ 1 und Typ 2) und von Hamada et al. (2000) in Erythrozyten von Typ-II Diabetikern mit normaler Nierenfunktion im Vergleich zu einer Kontrollgruppe bestimmt. Die Daten aus den zwei Studien unterscheiden sich im absoluten Betrag, was vermutlich auf unterschiedliches methodisches Vorgehen zurück zu führen ist, aber es wurde in beiden Studien ersichtlich, dass die Gehalte von 3-DG in den Erythrozyten von Diabetikern signifikant erhöht waren.

Tabelle 2-6: 1,2-Dicarbonylverbindungen in Plasma

nmol/L*	Kontrolle	Typ-I-Diabetes	Typ-II-Diabetes	Urämie
MGO		157 ± 53 <sup>a</sup>		
	132 ± 63 <sup>b</sup>			
	61 ± 7 <sup>c</sup>			219 ± 129 <sup>c</sup>
	350 ± 71 <sup>d</sup>		392 ± 72 <sup>d</sup>	
	653 ± 167 <sup>f</sup>		2194 ± 639 <sup>f</sup>	1528 ± 250 <sup>f</sup>
	92 ± 10 <sup>g</sup>			248 ± 95 <sup>g1</sup>
				715 ± 257 <sup>g2</sup>
	50 bis 700 <sup>h</sup>			100 bis 3600 <sup>h</sup>
	439 ± 90 <sup>i</sup>	842 ± 237 <sup>i</sup>		
GO	491 ± 47 <sup>c</sup>			1273 ± 980 <sup>c</sup>
	1087 ± 287 <sup>d</sup>		1057 ± 280 <sup>d</sup>	
	1155 ± 345 <sup>f</sup>		1345 ± 483 <sup>f</sup>	3810 ± 483 <sup>f</sup>
	229 ± 127 <sup>g</sup>			398 ± 156 <sup>g1</sup>
				763 ± 210 <sup>g2</sup>
	328 ± 208 <sup>i</sup>	1052 ± 515 <sup>i</sup>		
3-DG		103 ± 36 <sup>a</sup>		
	43 ± 5 <sup>c</sup>			65 ± 125 <sup>c</sup>
	1102 ± 156 <sup>d</sup>		1619 ± 300 <sup>d</sup>	
	59 ± 14 <sup>e</sup>	99 ± 34 <sup>c</sup>		
	160 ± 99 <sup>f</sup>		500 ± 123 <sup>f</sup>	364 ± 80 <sup>f</sup>
	92 ± 89 <sup>g</sup>			181 ± 93 <sup>g1</sup>
				72 ± 60 <sup>g2</sup>

\* Mittelwert ± Standardabweichung; Quellen: <sup>a</sup> Beisswenger et al. (2001), <sup>b</sup> Rabbani & Thornalley (2014), <sup>c</sup> (Henning et al., 2014) (Urämiker, HD, ohne Diabetes), <sup>d</sup> Maessen et al. (2015), <sup>e</sup> Lal et al. (1997), <sup>f</sup> Odani et al. (1999) (Diabetiker; Urämiker ohne Diabetes), <sup>g</sup> Agalou et al. (2002) (<sup>g1</sup> moderate Urämie, <sup>g2</sup> ESRD (Endstage renal disease), keine Angabe zu Diabetes), <sup>h</sup> Karg et al. (2009) (Urämiker ohne Diabetes), <sup>i</sup> Han et al. (2007)

In Tabelle 2-6 sind Plasma-Gehalte von 1,2-Dicarbonylverbindungen angegeben. Es wird deutlich, dass diese zwischen den Studien stark divergieren, obwohl alle Daten mittels

Flüssig- bzw. Gaschromatographie und Massendetektion ermittelt wurden. Neben methodischen Effekten, die bedingt durch die Aufarbeitung zu Über- oder Unterquantifizierung führen können, kann sich insbesondere bei nicht normoglykämischen Proben die individuelle Stoffwechsellage der Patienten auf die Messwerte auswirken.

Der Vergleich der Gehalte der einzelnen 1,2-Dicarbonylverbindungen in den jeweiligen Studien zeigt, dass je nach Behandlung und Ausprägung des Diabetes bzw. der Urämie im Plasma der Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe 2 bis 4-fach erhöhte Gehalte quantifiziert wurden.

### 2.3.2.7 Carbonylstress und oxidativer Stress

Die erhöhten Plasmakonzentrationen der 1,2-Dicarbonylverbindungen bei Diabeteserkrankungen werden auf den hohen mittleren Blutglucosespiegel (Hyperglykämie) zurückgeführt. Gleichzeitig wird davon ausgegangen, dass Hyperglykämie eine Ursache diabetischer Komplikationen ist und 1,2-Dicarbonylverbindungen bzw. daraus entstehende AGEs einen entscheidenden Einfluss haben (*Beisswenger et al., 2001*).

Bei Urämikern bzw. diabetischen Urämikern führt die verringerte renale Filtrationsrate zusätzlich zu einer geringeren Ausscheidung der 1,2-Dicarbonylverbindungen und damit zu erhöhten Plasmakonzentrationen (*Karg et al., 2009; Odani et al., 1999*). Deshalb werden 1,2-Dicarbonylverbindungen den urämischen Toxinen zugeordnet und der Begriff „Carbonylstress“ wurde eingeführt (*Miyata et al., 2001*).

Neben dem Carbonylstress liegt bei Urämikern auch ein erhöhter oxidativer Stress vor (*Locatelli et al., 2003; Miyata et al., 2001*). Oxidativer Stress wirkt durch die erhöhte Bildung hochreaktiver Peroxide und Radikale. Diese Spezies können enzymatisch unter Beteiligung von Glutathion inaktiviert werden um Schädigungen an Proteinen und DNA zu verhindern (*Shan et al., 1990*). Da sowohl die Detoxifizierung von 1,2-Dicarbonylverbindungen über das Glyoxalasesystem als auch die Abwehr gegen oxidativen Stress reduziertes Glutathion verbraucht, sind diese beiden Abwehrstrategien mechanistisch miteinander verbunden (*Abordo et al., 1999; Rabbani and Thornalley, 2012*).

### 2.3.3 Hämoglobin und genetische Varianten des N-Terminus der $\beta$ -Kette

Die Funktion der Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff in die peripheren Gewebe und der Abtransport von Kohlendioxid. Die unpolaren Gase können frei durch die Zellmembran diffundieren. Da Sauerstoff in Wasser nur schlecht löslich ist, verfügen Erythrozyten über Hämoglobin, um Sauerstoff zu binden und damit die Menge des „gelösten“ Sauerstoffs erhöhen zu können. Hämoglobin ist aus vier Proteinketten aufgebaut. Bei den meisten erwachsenen Menschen handelt es sich dabei um zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Ketten. Deren Tertiärstruktur weist hauptsächlich  $\alpha$ -Helices auf. In jede einzelne Globinkette ist eine Häm-Gruppe bestehend aus einem Porphyrinring und einem komplexierten Eisen-II-Ion nicht-

kovalent eingeschlossen. Jeweils eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Kette bilden ein Dimer. Zwei dieser Dimere bilden zusammen das funktionelle Hämoglobin. Die komplexe Quartärstruktur wird durch nicht-kovalente Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen) stabilisiert. Ein Sauerstoffmolekül kann an ein komplexiertes Eisen-II-Ion der Hämgruppe gebunden werden. Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung des Hämoglobin-Tetramers (Löffler *et al.*, 2007).

Das Vorkommen von genetischen Varianten des Hämoglobins auf Grund von Punktmutationen betrifft ca. jeden 600sten Menschen und es sind mehr als 700 Varianten bekannt (Bry *et al.*, 2001; Löffler *et al.*, 2007). Dieser Austausch einer einzigen Aminosäure kann durch Einfluss auf Konformation und Funktion des Hämoglobins drastische Auswirkungen haben, wie bei der Sichelzellanämie, oder „still“ und unentdeckt bleiben. Individuen mit abweichenden Hämoglobin-Varianten werden oft durch von der Norm abweichende HbA<sub>1c</sub>-Werte auffällig und auf diesem Weg entdeckt. Bei HbA<sub>1c</sub>-Werten über 15% wird empfohlen auf eine Abweichung der genetischen Variante vom Haupttyp HbA als Ursache zu testen (Chen *et al.*, 1998).

Es sind bisher vier genetische Varianten der  $\beta$ -Kette und eine der  $\alpha$ -Kette bekannt, bei denen die zweite Aminosäure nach dem N-terminalen Valin ersetzt ist (www.uniprot.org:  $\alpha$ : P69905,  $\beta$ : P68871). Für Hämoglobin ist bekannt, dass die  $\alpha$ -Kette mit Glucose zu einem deutlich geringeren Anteil zum Amadori-Produkt reagiert als die  $\beta$ -Kette (Shapiro *et al.*, 1980). Ein Grund für diesen Unterschied im Umsatz an der N-terminalen Aminogruppe des Valins könnte der Einfluss der funktionellen Seitenkette der Aminosäure in Position 2 sein. Die Änderung in der Aminosäuresequenz kann den pK<sub>s</sub>-Wert der N-terminalen Aminogruppe erhöhen oder erniedrigen bzw. die Umlagerung der Schiff'schen Base zum Amadori-Produkt beeinflussen (Siehe 2.1.1).

Bei einem Screening von Patienten auf Hb-Varianten in den USA wurde 1972 Hb Deer Lodge ( $\beta$ His2 $\rightarrow$ Arg) entdeckt (Labossiere *et al.*, 1972). 1983 wurde in Japan die Variante Hb Okayama ( $\beta$ His2 $\rightarrow$ Gln) auf Grund abweichender elektrophoretischer Eigenschaften identifiziert (Harano *et al.*, 1983) und 1990 die Variante Hb Fukuoka ( $\beta$ His2 $\rightarrow$ Tyr) (Harano *et al.*, 1990). Die Messung von extrem hohen HbA<sub>1c</sub>-Werten von ca. 50% hat 1992 zur Entdeckung der Hämoglobinvariante Hb Graz ( $\beta$ 2His $\rightarrow$ Val) mit einem Leucin statt Histidin an Position zwei der  $\beta$ -Kette geführt (Schmedl *et al.*, 1995). Eine genetische Variante der  $\alpha$ -Kette Hb ChongQing ( $\alpha$ Leu2 $\rightarrow$ Arg) wurde 1984 in China entdeckt (Zeng *et al.*, 1984). Als Folge der veränderten Aminosäuresequenz auf die Funktionalität des Hämoglobins sind Veränderungen in der Sauerstoffaffinität bzw. des Bindungsvermögens für 2,3-BPG bekannt. Unter den aufgeführten genetischen Varianten wurde für Hb Okayama, Hb Deer Lodge und Hb ChongQing eine erhöhte Sauerstoffaffinität beobachtet.

### 2.3.4 Kenntnisse zur Glykierung von humanem Hämoglobin durch Glucose

#### 2.3.4.1 Entwicklung der HbA<sub>1c</sub>-Analytik zum Diagnoseinstrument bei Diabetes mellitus

*Allen et al. (1958)* und mit verbesserter Chromatographie *Clegg & Schroeder (1959)* konnten die chromatographische Trennung von adultem Hämoglobin mittels Kationenaustausch-Chromatographie in eine Hauptkomponente und mehrere Minorfraktionen zeigen (*Allen et al., 1958; Clegg and Schroeder, 1959*). Da die HbA<sub>1</sub>-Fraktionen früher eluierten als die Hauptkomponente HbA<sub>2</sub> (HbA<sub>0</sub>) müssten diese eine negativere Netto-Ladung aufweisen. HbA<sub>1c</sub> war dabei quantitativ die größte Minor Komponente mit 5-7% im Blut von gesunden Probanden (*Holmquist and Schroeder, 1966*). Für die Zusammensetzung von HbA<sub>1c</sub> wurde  $\alpha_2\beta_{A1c}$  vermutet, wobei  $\beta_{1c}$  eine N-terminale Modifizierung aufweist.

*Holmquist & Schroeder (1966)* konnten die Identität der Modifizierung in HbA<sub>1c</sub> soweit einschränken, dass an eine der beiden  $\beta$ -Ketten ein Keton oder Aldehyd in Form einer Schiff'sche Base gebunden ist. Sie konnten die Derivatisierung auf das N-terminale tryptische Peptid einschränken und fanden keine weiteren Modifizierungen. Basierend auf ihren Erkenntnissen vermuteten sie eine Schiff'sche Base und sie schätzten die Molekülmasse des Ketons oder Aldehyds auf 280 Da. *Holmquist & Schroeder (1966)* beobachteten, dass das N-terminale tryptische Peptid der  $\beta$ -Kette von HbA<sub>1c</sub> und HbA<sub>2</sub> (HbA<sub>0</sub>) die gleiche Aminosäurezusammensetzung nach saurer Hydrolyse aufweisen, aber bei vorheriger Reduzierung kein Valin nach saurer Hydrolyse des N-terminalen Peptids von HbA<sub>1c</sub> detektierbar war.

*Bookchin & Gallop (1968)* folgten dieser Erkenntnis und identifizierten die Modifizierung von HbA<sub>1c</sub> als Hexose, was sie massenspektrometrisch nach Reduzierung und Derivatisierung belegten. Auf Grund elektrophoretischer Untersuchungen vermuteten sie im Gegensatz zu *Holmquist & Schroeder (1966)*, dass beide  $\beta$ -Ketten in HbA<sub>1c</sub> gleichermaßen modifiziert sein müssten.

*Huisman & Dozy (1962)* stellten erstmals Auffälligkeiten der HbA<sub>1</sub>-Fraktion von Diabetikern fest, aber *Rahbar et al. (1969)* waren die ersten, die eine Zunahme der HbA<sub>1c</sub>-Fraktion bei Diabetikern (7,5 bis 10,6%) im Vergleich zu gesunden nicht-diabetischen Patienten (4-6%) feststellten (*Huisman and Dozy, 1962; Rahbar et al., 1969*). *Trivelli et al. (1971)* untersuchten 100 Diabetiker und stellten fest, dass der HbA<sub>1c</sub>-Wert bei Diabetikern verdoppelt ist, 75-80% der HbA<sub>1</sub>-Fraktion auf HbA<sub>1c</sub> entfallen und kein Zusammenhang zwischen HbA<sub>1c</sub> und dem Alter, der Dauer des Diabetes, der Therapie oder mit anderen Komplikationen des Diabetes besteht (*Trivelli et al., 1971*). *Paulsen (1973)* fand erhöhte HbA<sub>1c</sub>-Werte bei diabetischen Kindern und vermutete einen genetischen Zusammenhang (*Paulsen, 1973*). *Tattersall et al. (1975)* untersuchten diesen Ansatz an Zwillingen, kamen aber zu dem Schluss, dass die erhöhten HbA<sub>1</sub>-Werte auf metabolische Veränderungen des Diabetes zurück zu führen sind (*Tattersall et al., 1975*).

*Koenig & Cerami (1975)* fanden in diabetischen Mäusen keinen Zusammenhang des HbA<sub>1c</sub> mit dem Alter, Dauer des Diabetes, dem Blutglucosespiegel oder dem Gewicht, konnten aber feststellen, dass der HbA<sub>1c</sub> innerhalb der ersten 50 Tage der Lebensdauer der Erythrozyten linear zunahm und vermuteten einen zirkulierenden Einflussfaktor der im Zusammenhang mit dem Kohlenhydratmetabolismus steht (*Koenig and Cerami, 1975*).

*Bunn et al. (1976)* konnten die Modifizierung am N-Terminus der  $\beta$ -Kette weiter konkretisieren und dem Amadori-Umlagerungs-Produkt der Schiff'schen Base aus der Reaktion von Hämoglobin mit Glucose zuordnen und ermittelten einen Modifizierungsgrad von 0,25 mol pro mol  $\alpha$ - $\beta$ -Dimer. Sie konnten weiterhin zeigen, dass HbA<sub>1c</sub> eine posttranslationale Modifizierung darstellt, die kontinuierlich über die Lebensdauer eines Erythrozyten akkumuliert und vermuteten, dass mit Hilfe des HbA<sub>1c</sub>-Werts eine Aussage über die durchschnittliche Glucosekonzentration in den Erythrozyten und eine Kontrolle der angemessenen Einstellung von Diabetikern möglich ist (*Bunn et al., 1976*). *Flückiger & Winterhalter (1976)* und *König et al. (1977)* bestätigten die Struktur von HbA<sub>1c</sub> als Amadori-Produkt der Glucose (*Flückiger and Winterhalter, 1976; Koenig et al., 1977*).

*Koenig et al. (1976)* fanden schließlich Korrelationen zwischen dem HbA<sub>1c</sub>-Wert und der maximalen Antwort in einem Glucose-Toleranztest bzw. der Nüchtern-Glucose bei diabetischen Patienten und zeigten somit den Zusammenhang der Einstellung des Blutglucosespiegels mit einer nachfolgenden Senkung des HbA<sub>1c</sub>-Werts (*Koenig et al., 1976*). Mit Hilfe umfangreicher epidemiologischer Studien zum Zusammenhang der Diabetes-Kontrolle mit weiterführenden Komplikationen konnte 1993 für Typ 1 Diabetes und 1998 bzw. 2003 für Typ 2 Diabetes ursächlich ein protektiver Effekt vor degenerativen Langzeit-Komplikationen durch eine optimale glykämische Kontrolle belegt werden (*Gillery, 2013*).

#### 2.3.4.2 Analytik HbA<sub>1c</sub>-Wert: Methoden, Unterschiede, Aussagekraft, Spezifität

Als HbA<sub>1c</sub>-Wert wird nach der International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) die Glykierung an einem oder beiden N-terminalen Valins der  $\beta$ -Ketten des Hämoglobins definiert (*Jeppsson et al., 2002*). Die weiteren Glykierungsstellen sind dann einer der 44 Lysin-Reste oder die N-terminalen Aminogruppen des Valins der  $\alpha$ -Ketten. Wegen der mittleren maximalen Lebensdauer eines Erythrozyten von 120 Tagen ermöglicht der HbA<sub>1c</sub> einen Rückblick auf den Glykierungsstatus der vergangenen 2 bis 3 Monate. Alle kommerziell verfügbaren Analysemethoden umfassen die N-terminale Glykierung der  $\beta$ -Kette (HbA<sub>1c</sub>), aber unterscheiden sich in der Fähigkeit weitere glykierte Varianten zu detektieren bzw. zu trennen. Die verbreitetsten Analysemethoden sind die Boronat-Affinitäts-Chromatographie, Kationenaustausch-Chromatographie, Immuno-Assays und Elektrophoretische Methoden (*Bry et al., 2001*).

Zur internationalen Standardisierung der Analysenergebnisse bei der HbA<sub>1c</sub>-Analytik wurde eine Methode entwickelt, mit der eindeutig die N-terminale Glykierung der  $\beta$ -Kette quantifiziert und in der SI Einheit mmol HbA<sub>1c</sub>/mol HbA<sub>0</sub> angegeben wird. In der Vergangenheit war

die Angabe des HbA<sub>1c</sub> in % etabliert. Beide Einheiten stehen in einem linearen Zusammenhang und so kann eine einfache Formel zur Umrechnung angewendet werden  $\text{HbA}_{1c} [\text{mmol/mol}] = (\text{HbA}_{1c}\% - 2,15) \cdot 10,93$  (John and English, 2012). Das Ziel der Standardisierung ist die internationale Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen. Dabei wird das N-terminale Hexapeptid der  $\beta$ -Kette in glykierter bzw. nicht glykierter Form enzymatisch (Endoproteinase Glu-C) freigesetzt und mittels HPLC-ESI-MS oder HPLC-CE (Kapillarelektrophorese) detektiert. Die Kalibrierung erfolgt mittels isolierten und aufgereinigten Standards für HbA<sub>1c</sub> bzw. HbA<sub>0</sub> (Finke et al., 1998). Durch die häufigsten genetischen Hämoglobin-Varianten HbS ( $\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$ , Sichelzellanämie) und HbC ( $\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Lys}$ ) traten keine Störungen auf, weil deren N-terminales Hexapeptid durch die Modifizierung an Position 6 nicht freigesetzt wurde. N-terminale Carbamylierung und Acetylierung führten bei Ionenaustauschchromatographie, aber nicht bei der HPLC-CE-Analytik, zu keiner Abweichung im bestimmten HbA<sub>1c</sub>-Wert (Jeppsson et al., 2002).

Eine alternative Strategie zur Bestimmung der Glykierung des Hämoglobins durch Glucose besteht in der Freisetzung der Amadori-Produkt-Aminosäuren, was für die N-Termini der Hämoglobinketten das N- $\alpha$ -Fructosylvalin und für die Seitenkettenderivatisierung das N- $\epsilon$ -Fructosyllysin sind. Penndorf et al. (2008) entwickelten eine Methode zur Quantifizierung der korrespondierenden Furoylmethyl-derivate (FM-Derivate) nach Hydrolyse mit Salzsäure mittels Isotopenverdünnungsanalyse und RP-HPLC-ESI-TOF-MS. Die hydrolytische Spaltung von Proteinen in die einzelnen Aminosäuren ist vollständig und der Umsatz der Fructosyl-derivate zu den entsprechenden Furoylmethyl-derivaten bei der angewendeten Hydrolyse ist reproduzierbar. Somit konnten die Gehalte der Fructosyl-derivate berechnet werden. Die Ergebnisse zeigten gute Korrelationen für N- $\alpha$ -Fructosylvalin bzw. N- $\epsilon$ -Fructosyllysin zum HbA<sub>1c</sub>-Wert von Normoglykämikern und Diabetikern (Penndorf et al., 2008). Der analytische Ansatz der Methode ist sehr spezifisch für die Amadori-Produkte des N-terminalen Valins bzw. die Seitenkette des Lysins. Es kann im Fall des Valins nicht unterschieden werden, ob die Glykierung an der  $\alpha$ - oder der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins vorlag, was aber die Bewertung des Glykierungsgrads nicht beeinträchtigt. Das gleiche Prinzip gilt für Fructosyllysin. Bei der Analyse werden jeweils alle 11 Lysinreste jeder  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette und damit auch alle derivatisierten Seitenketten freigesetzt und erfasst. Die Gehalte des N- $\epsilon$ -Fructosyllysin in Hämoglobin wurden auch in weiteren Studien, allerdings nach enzymatischer Hydrolyse, quantifiziert. Auf die Studien wird in Abschnitt 2.3.5 eingegangen und die Gehalte sind in Tabelle 2-8 aufgelistet.

#### 2.3.4.3 Metabolische und methodische Grenzen in der Bewertung der Gesamtglykierung über den HbA<sub>1c</sub>-Wert

Für Normoglykämiker wurde festgestellt, dass unter den Bedingungen einer über einen langen Zeitraum stabilen Glykierung ein starker Zusammenhang des HbA<sub>1c</sub>-Werts zur Glykierung des Serumalbumins besteht. Aber für das Verhältnis der Glykierung des Hämoglobins

(HbA<sub>1c</sub>-Wert) zur Glykierung des Serumalbumins („Fructosamin“) waren große interindividuelle Unterschiede nachweisbar.

Beim Transport der Glucose aus dem Blutplasma in die Erythrozyten wird allgemein von der Annahme ausgegangen, dass dieser Transport über den GLUT-1 schnell erfolgt und der Glucosegradient über die Erythrozytenmembran zwischen Personen gleich ist. In *in vitro* Untersuchungen mit einem markierten, nicht metabolisierbaren Glucose-Analogon (<sup>14</sup>C-3-O-Methylglucose) an Erythrozyten von 26 Probanden wurde aber festgestellt, dass die intra/extrazelluläre Verteilung zwischen 0,74 und 1,04 lag. Dabei korrelierten erhöhte intrazelluläre Glucosegehalte mit dem HbA<sub>1c</sub>-Wert, aber nicht mit der Glykierung des Serumalbumins. Diese Variation in der Glucose-Aufnahme kann den HbA<sub>1c</sub> um 1,5 bis 2 Prozent beeinflussen (HbA<sub>1c</sub>%) (*Khera et al., 2008*). Der Vergleich der intrazellulären Glykierung des Erythrozyten mit der extrazellulären Glykierung des humanen Serumalbumins wird als „Glycation Gap“ bezeichnet. Als Ursachen werden interindividuelle Unterschiede im Metabolismus der Erythrozyten, des mittleren Alters bzw. der Lebensdauer der Erythrozyten und auch genetische Unterschiede diskutiert (*Herman and Cohen, 2010*).

So konnten Studien in den USA zum Einfluss der ethnischen Abstammung auf den HbA<sub>1c</sub>-Wert (Normoglykämiker und Patienten mit zunehmender Glykämie) um 0,3-0,5% (HbA<sub>1c</sub>%) erhöhte HbA<sub>1c</sub>-Werte bei Afroamerikanern feststellen (*Ziemer et al., 2010*). Ein genetischer Einfluss (Erblichkeit) auf den HbA<sub>1c</sub>-Wert wurde auch bei Untersuchungen an Geschwistern und Zwillingspaaren gezeigt. Dabei scheinen sich genetische Unterschiede, den Glucosemetabolismus betreffend, nicht einheitlich auf den HbA<sub>1c</sub>-Wert und die Nüchternglucose auszuwirken, so dass diese als unabhängige Parameter betrachtet werden müssen (*Simonis-Bik et al., 2008; Snieder et al., 2001*). Außerdem wurde geschlussfolgert, dass die Gene einen oder mehrere der folgenden Faktoren betreffen müssten: Lebensdauer der Erythrozyten, Glucosekonzentration in den Erythrozyten, intrazelluläre Glykierung bzw. intrazelluläre Deglykierung (*Cohen et al., 2006*).

In einem Markierungsexperiment haben *Cohen et al. (2008)* die interindividuellen Unterschiede im durchschnittlichen Alter von Erythrozyten untersucht. Sie konnten einen linearen Zusammenhang zwischen dem Alter der Erythrozyten und dem HbA<sub>1c</sub>-Wert bestätigen und fanden im Vergleich von 12 Probanden (Normoglykämiker und Diabetiker) heraus, dass sich das mittlere Alter der Erythrozyten um bis zu 30% unterschied. Sie folgerten, dass dieser Effekt den HbA<sub>1c</sub>-Wert um mehr als 1% (HbA<sub>1c</sub>%) beeinflussen kann und damit direkte Folgen auf Entscheidungen zur Behandlung von Patienten hat (*Cohen et al., 2008*). Mit einer Stabilisotopenmethode wurde in einer neueren Studie mit zehn normoglykämischen Probanden das mittlere Erythrozytenalter und die Lebensdauer der Erythrozyten bestimmt. Für das mittlere Erythrozytenalter ergaben sich 59 Tage bei einer Spannweite von 53 bis 64 Tagen. Die Lebensdauer der Erythrozyten betrug im Mittel 106 Tage bei einer Spannweite von 89 bis 121 Tagen (*Khera et al., 2015*).

In der Literatur wird eine Beeinflussung des mittleren Alters der Erythrozyten durch schlechte glykämische Kontrolle kontrovers diskutiert. *Peterson et al. (1977)* stellten ein verringertes mittleres Alter der Erythrozyten in Zusammenhang mit schlechter glykämischer Kontrolle fest (*Peterson et al., 1977*). *Cohen et al. (2008)* fanden aber keine Verringerung des mittleren Alters im Vergleich zwischen Normoglykämikern und Diabetikern. Aus Studien zum mittleren Erythrozytenalter und der Lebensdauer von Erythrozyten bei gesunden Probanden ist bekannt, dass sich diese ab einem Alter von 16 Jahren mit zunehmendem Lebensalter eines Menschen nicht mehr ändern (*An et al., 2016; Mock et al., 2011*). Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen dem Alter von Dialysepatienten und der Lebensdauer der Erythrozyten existiert bisher keine Studie. Für nicht-diabetische Urämiker konnte jedenfalls im Vergleich zu einer gleichaltrigen Kontrollgruppe eine Verringerung des mittleren Erythrozytenalters von 20% ermittelt werden (*Vos et al., 2011*). Somit wirkt sich die terminale Niereninsuffizienz vermutlich deutlich stärker als das Lebensalter der Patienten auf das mittlere Erythrozytenalter und den Glykierungsgrad des Hämoglobins aus.

Neben den bereits beschriebenen Faktoren bei gesunden, normoglykämischen Probanden und Diabetikern mit normaler Nierentätigkeit können der HbA<sub>1c</sub>-Wert bzw. dessen Bestimmungsmethoden von weiteren besonderen Stoffwechsellagen, Krankheiten, Modifizierungen und Genmutationen beeinflusst werden. Diese Veränderungen können je nach Analysenmethode zu einer Über- oder Unterquantifizierung des HbA<sub>1c</sub>-Werts führen (*Bry et al., 2001*).

Zur Überschätzung des HbA<sub>1c</sub>-Werts kann die Verlängerung der Lebenszeit von Erythrozyten führen. Diese Situation kann nach der operativen Entfernung der Milz (Splenektomie) eintreten. Stoffwechsellagen, die durch Eisenmangel charakterisiert sind, erhöhen ebenfalls den HbA<sub>1c</sub>-Wert, was insbesondere bei 20% der menstruierenden Frauen und bei Schwangerschaft auftreten kann (*Coban et al., 2004; Herman and Cohen, 2010*).

Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion ist die Bildung von Erythropoetin verringert, weshalb diese an urämischer Anämie leiden. Durch eine Behandlung mit erythropoetischen Medikamenten kann die Neubildung von Erythrozyten deutlich erhöht werden, wodurch das mittlere Erythrozytenalter sinkt. Als zweite Ursache der Anämie wird die Verringerung des mittleren Alters der Erythrozyten durch urämische Toxine diskutiert, deren Konzentration im Blut wegen der verringerten Ausscheidung erhöht ist. Welche toxischen Verbindungen verantwortlich sind, ist noch nicht ausreichend geklärt. In verschiedenen Studien wurde in den 1950er und 1960er Jahren eine Verringerung des Erythrozytenalters um bis zu 50-70% ermittelt. *Vos et al (2011)* fanden in ihrer Studie mit Patienten- und Kontrollgruppen, die bezüglich ihres Alters abgestimmt waren, die Verringerung des mittleren Alters der Erythrozyten bei nicht-diabetischen Urämikern um etwa 20%. Die Diskrepanz zu den älteren Studien wurde mit einer besseren Behandlung mit erythropoiese-stimulierenden Medikamenten begründet. Es gab keinen Unterschied zwischen den Behandlungsmethoden Hämodialyse und Peritonealdialyse (*Vos et al., 2011*). Nach *Gallagher et al (2009)* ist der Zusammenhang zwischen chronischer renaler Disfunktion und dem HbA<sub>1c</sub>-Wert komplex. So

ist die chronische renale Disfunktion mit einer verringerten Bildung von Erythropoietin verbunden, was die Neubildung von Erythrozyten verringert und so das mittlere Alter der Erythrozyten anhebt. Auf Grund der Dialysetechnik kann zusätzlich eine erhöhte Exposition mit Glucose stattfinden. Diese Faktoren führen potentiell zu erhöhter Glykierung und damit erhöhten HbA<sub>1c</sub>-Werten. Wogegen die Behandlung von Patienten mit chronischer renaler Disfunktion mit erythropoietischen Medikamenten, die Neubildung von Erythrozyten erhöht und so mit einem verringerten mittleren Erythrozytenalter den HbA<sub>1c</sub>-Wert verringert (*Gallagher et al., 2009*).

Die Carbamylierung entsteht durch die Reaktion des Hämoglobins mit Isocyanat, das aus hohen Harnstoff-Gehalten im Plasma resultiert, was quantitativ bei Personen mit stark ausgeprägter Urämie relevant ist. Carbamyl-Hb hat einen Isoelektrischen Punkt nahe HbA<sub>1c</sub> und führt dadurch besonders bei Methoden basierend auf ionischen Wechselwirkungen, aber auch bei elektrophoretischen Methoden zur Überquantifizierung. Die Carbamylierung beeinträchtigt aber nicht die Boronat-Affinitätschromatographie und immunologische Methoden (*Weykamp et al., 1993*).

Aus der Reaktion mit Acetyl-CoA oder Acetylsalicylat kann ein acetyliertes Hämoglobin gebildet werden. Die acetylierte Form der Hämoglobin- $\beta$ -Kette stört immunologische Methoden und wird besonders bei Varianten mit Punktmutationen am Anfang der  $\beta$ -Kette (Hb Raleigh, Hb South Florida  $\beta 1\text{Val}\rightarrow\text{Met}$ , etc.) begünstigt gebildet (*Bry et al., 2001*). Die Blockierung der N-terminalen Aminogruppen der  $\beta$ -Ketten durch Acetylierung soll außerdem zu einer geringeren Glykierung des N-Terminus der  $\beta$ -Kette (HbA<sub>1c</sub>) und damit zu einer Unterschätzung der Gesamtglykierung führen (*Chen et al., 1998*). Die Boronat-Affinitätschromatographie ist von acetyliertem Hämoglobin nicht betroffen (*Weykamp et al., 1993*).

Drastischer können genetisch abweichende Hämoglobin-Varianten, die strukturelle Hämoglobinopathien hervorrufen, oder Krankheiten direkt die analytische Strategie bzw. die Lebenszeit der Erythrozyten beeinflussen. Die häufigsten genetischen Varianten HbS ( $\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$ , Sichelzellanämie), HbE ( $\beta 26\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$ ) und HbC ( $\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$ ) können insbesondere bei Methoden beruhend auf Kationenaustausch-Chromatographie zu falschen Ergebnissen führen. Immuno-Assays interagieren mit der glykierten Form des N-Terminus der  $\beta$ -Kette und der Sequenz der ersten vier bis zehn Aminosäuren. Mutationen, die ersten zehn Aminosäuren betreffend (HbF  $\beta$ -Kette $\rightarrow\gamma$ -Kette, HbS, HbC, Hb-Raleigh  $\beta 1\text{Val}\rightarrow\text{Ala}$ , Hb-Graz  $\beta 2\text{His}\rightarrow\text{Leu}$ , etc.), können so Abweichungen in der Quantifizierung verursachen (*Bry et al., 2001*).

Zur Verkürzung der mittleren Lebensdauer der Erythrozyten mit Verringerung des HbA<sub>1c</sub>-Werts führen alle Formen der hämolytischen Anämie, wie die Thalassämie oder die Sichelzellanämie HbSS (auch HbCC und HbSC), aber auch starker Blutverlust (*Bry et al., 2001; Herman and Cohen, 2010*). Insbesondere bei der homozygoten Sichelzellanämie (HbSS), der homozygoten Form HbCC und der Kombinationen HbSC verursacht die Aggregation des

Hämoglobins in den zirkulierenden Erythrozyten deren Zerstörung und somit eine Anämie. Bei Amerikanern afrikanischer Abstammung treten Varianten von HbS und HbC mit 9% bzw. 3% auf (*Schnedl et al., 1999*).

Das Thalassämie-Syndrom wird wegen eines Gendefekts durch die verringerte bis nicht vorhandene Bildung der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Globinketten ( $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Thalassämie) verursacht und ist allgemein durch eine stark verkürzte Lebenszeit der Erythrozyten gekennzeichnet. Die  $\beta$ -Thalassämie ist am stärksten auf den Malediven (18%), Zypern (14%), Sardinien (10.3%) und Südostasien (3-5%) verbreitet. Die  $\alpha$ -Thalassämie tritt vor allem bei der Bevölkerung Südostasiens und Chinas mit einer Verbreitung von zum Teil 40% auf. In der Ausprägung der homozygoten  $\beta$ -Thalassämie ist die HbA<sub>1c</sub>-Analytik als solche durch das vollständige Fehlen der Hb- $\beta$ -Kette unmöglich (*Cappellini et al., 2014*).

#### 2.3.4.4 Bevorzugte Reaktionsorte der Glykierung zum Amadori-Produkt

*Bunn et al. (1979)* fanden neben der Glykierung an HbA<sub>1c</sub> von 4%, dass mit HbA<sub>0</sub> weitere Glykohämoglobine koeluiieren, die 8-10% ausmachen und deren Gehalte bei Diabetikern mit dem HbA<sub>1c</sub> zunehmen (*Bunn et al., 1979*). Die Glykierung des N-Terminus scheint die chromatographische Trennung besonders zu begünstigen. So wurde das am N-Terminus der  $\alpha$ -Kette glykierte Hämoglobin im Anfangsbereich des HbA<sub>0</sub>-Peaks lokalisiert. *Garlick et al. (1983)* gaben den Anteil von glykiertem Hämoglobin in der HbA<sub>0</sub>-Fraktion mit 5-6% an, wobei die Verteilung mit 14% am N-Terminus der  $\alpha$ -Kette, 40% an Lysinresten der  $\alpha$ - und 46% an Lysinresten der  $\beta$ -Kette angegeben wurde (*Garlick et al., 1983*).

*Shapiro et al. (1980)* fanden deutliche Unterschiede in den bevorzugten Glykierungsstellen zwischen *in vitro*-Inkubationen (Reihenfolge nach absteigendem Glykierungsgrad:  $\beta$ -Val-1,  $\alpha$ -Lys-16,  $\beta$ -Lys-66,  $\beta$ -Lys-17,  $\alpha$ -Val-1,  $\alpha$ -Lys-7,  $\beta$ -Lys-120) und nativem Hämoglobin (Reihenfolge nach absteigendem Glykierungsgrad:  $\beta$ -Val-1,  $\beta$ -Lys-66,  $\alpha$ -Lys-61,  $\beta$ -Lys-17,  $\alpha$ -Val-1) *in vivo* (*Shapiro et al., 1980*). *Zhang et al. (2001)* untersuchten mittels LC-ESI-MS ebenfalls die Glykierungsstellen des Hämoglobins und konnten die bekannten Stellen bestätigen. Zusätzlich wurden mit  $\alpha$ -Lys-7 oder 16 und  $\alpha$ -Lys-127 oder 139 zwei weitere Stellen mit geringer *in vivo*-Glykierung entdeckt. Die genaue Position konnte nicht bestimmt werden, sondern nur der Peptidabschnitt und die einfache Glykierung.

#### 2.3.4.5 Enzymatische Deglykierung

Der hohe Anteil der Glykierung des N-Terminus der  $\beta$ -Kette basiert einerseits auf der hohen Reaktivität, andererseits existiert eine enzymatische Abwehrstrategie, um die Amadori-Produkt-Gehalte der Lysin-Seitenketten zu verringern. Als Funktion des intrazellulären, phosphorylierenden Enzyms FN3K aus Erythrozyten wurde die Deglykierung proteingebundenen Fructosyllysins bestimmt (*Delpierre et al., 2000a, 2000b*). Das später entdeckte FN3K-RP hat eine vergleichbare Funktion. Allerdings sind dessen Substrate Lysinderivate von C-3 bis C-5 Zuckern (*Collard et al., 2003*).

Die Ketosamin-3-kinasen zählen somit zu den Protein-Reparaturenzymen. Die FN3K kommen in allen Geweben vor. Die höchsten Aktivitäten wurden für Gehirn, Herz, Niere, Skelettmuskel und Erythrozyten gefunden (*Delplanque et al., 2004*). Damit ist glykiertes Hämoglobin nicht das einzige Substrat. Die Reparatur der Proteine soll allgemein die Funktionalität und Aktivität erhalten. Eine entsprechende Verringerung der Aktivität von intrazellulären Enzymen der Erythrozyten durch Glykierung ist beispielsweise für die Cu-Zn-Superoxid-Dismutase und 2,3-Bisphosphoglycerat-Mutase bekannt. Die Inaktivierung der Cu-Zn-Superoxid-Dismutase wird im Zusammenhang mit intrazellulär erhöhtem oxidativem Stress diskutiert (*Arai et al., 1987*). Die glykierungsinduzierte Inaktivierung der 2,3-Bisphosphoglycerat-Mutase führt zu einer verringerten 2,3-BPG-Bildung und beeinflusst damit direkt die Regulierung der Sauerstoffbindung (*Fujita et al., 1998*).

Für die Deglykierung von Hämoglobin durch die FN3K identifizierten *Delpierre et al. (2004)* die bevorzugten Lysinreste Lys- $\alpha$ -16, Lys- $\alpha$ -139, Lys- $\beta$ -17, Val- $\beta$ -1 und Lys- $\alpha$ -61 sind dagegen schlechte Substrate. Die Diskrepanz im Glykierungsgrad zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten von *Shapiro et al. (1980)* (s.o.) lässt sich zum Teil über diesen selektiven Deglykierungsmechanismus erklären. Die Selektivität resultiert hauptsächlich aus der sterischen Zugänglichkeit der glykierten Lysinseitenketten und der Tatsache, dass glykierte N- $\alpha$ -Aminogruppen ein sehr schlechtes Substrat darstellen. Die Erkenntnis, dass die interindividuelle Variabilität der FN3K-Aktivität den HbA<sub>1c</sub>-Wert nicht beeinflusst, unterstützt dieses Ergebnis (*Delpierre et al., 2006*). *Delpierre et al. (2006)* verglichen die FN3K-Aktivität von Typ-1 Diabetikern mit einer Kontrollgruppe und fanden dabei, dass die FN3K-Aktivität über mehrere Monate konstant blieb und kein Unterschied in der Aktivität zwischen den Gruppen bestand.

#### 2.3.4.6 Auswirkung der Glykierung auf die Funktionalität – Sauerstoffbindung

Die Glykierung an der N-terminalen Aminogruppe der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins gemessen als HbA<sub>1c</sub> führt auf Grund einer allosterischen Wechselwirkung zu einer Konformationsänderung, die eine höhere Sauerstoffaffinität zur Folge hat und zusätzlich eine geringere Bindung von organischen Phosphaten wie 2,3-Bisphosphoglycerat ermöglicht. Ähnliche Effekte wurden auch für die Glykohämoglobine HbA<sub>1a1</sub>, HbA<sub>1a2</sub> und HbA<sub>1b</sub> beobachtet, wobei HbA<sub>1a1</sub> und HbA<sub>1a2</sub> eine geringere Sauerstoffaffinität aufwiesen (*Bunn and Briehl, 1970*; *Bunn et al., 1978*; *McDonald et al., 1979*). Aus der höheren Sauerstoffaffinität bei erhöhtem HbA<sub>1c</sub>-Wert könnte eine schlechtere Versorgung der peripheren Gewebe mit Sauerstoff resultieren. Die Anlagerung von 2,3-Bisphosphoglycerat an intaktes Hämoglobin verringert gegenläufig die Sauerstoffaffinität und verbessert damit die Abgabe von Sauerstoff bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck in der Peripherie. Der nachteilige Einfluss der erhöhten Sauerstoffaffinität bei erhöhtem HbA<sub>1c</sub>-Wert kann also über eine erhöhte 2,3-Bisphosphoglycerat-Synthese kompensiert werden (*Lowrey et al., 1985*; *Roberts et al., 1984*).

*Bunn et al. (1978)* schätzten den Effekt der veränderten Sauerstoffaffinität der Erythrozyten von Diabetikern als nicht signifikant für die periphere Versorgung ein.

In *in vitro*-Experimenten ermittelten *Colletta et al. (1988)* die Sauerstoffbindungskurven für HbA<sub>0</sub> und HbA<sub>1c</sub> und fanden einen deutlicheren Unterschied in der Sauerstoffsättigung und der Sauerstoffaffinität, die für HbA<sub>1c</sub> um 40% bzw. den Faktor 10 höher lagen (*Colletta et al., 1988*). *De Rosa et al. (1998)* untersuchten den Einfluss der Glykierung zum HbA<sub>1c</sub> auf die Sauerstoffbindung und die Wechselwirkung mit Protonen, Chlorid und 2,3-Bisphosphoglycerat. Neben *in vitro*-Experimenten setzten sie computergestützte Modellierungen der Proteinstruktur ein. Dabei gingen sie von der Modifizierung beider  $\beta$ -Ketten aus. Es wurde eine leicht erhöhte Sauerstoffaffinität des glykierten Hämoglobins in Chlorid und 2,3-Bisphosphoglycerat freier Lösung beobachtet, was auf eine potentielle Begünstigung der sauerstoffaffineren Konformation zurückgeführt wurde. Die Zugabe von Chlorid in physiologischer Konzentration und 2,3-Bisphosphoglycerat verringerte die Sauerstoffaffinität bei HbA<sub>0</sub> und HbA<sub>1c</sub>. Doch die Affinität der Desoxy- und der Oxy-Form zu 2,3-Bisphosphoglycerat war bei HbA<sub>1c</sub> geringer als bei HbA<sub>0</sub>. Mit Hilfe mechanischer und dynamischer Berechnungen wurde dieser Effekt mit einer Verringerung der Interaktionsmöglichkeiten für 2,3-Bisphosphoglycerat in der Bindungstasche von HbA<sub>1c</sub> begründet (*De Rosa et al., 1998*).

### 2.3.5 MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin in humanem Blut

Die Derivatisierung der Seitenkette der Lysinreste des Hämoglobins zum Fructosyllysin ist bereits gut untersucht. Sowohl zu den Glykierungsstellen als auch den bevorzugten Angriffsstellen der enzymatischen Deglykierung (Abschnitt 2.3.4) gibt es einige Publikationen. Zum Vorkommen und den Gehalten von AGEs an Hämoglobin ist hingegen wenig bekannt.

Wissenschaftliche Studien haben sich bisher überwiegend mit der Analytik und Interpretation von AGEs der Seitenketten von Lysin und Arginin in Blutplasma befasst. Die AGEs wurden im Zusammenhang mit Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Urämie darauf untersucht, ob sie als diagnostische Marker zur Erkennung bestimmter Komplikationen geeignet sind. Dabei wurden sowohl frei vorliegende als auch proteingebundene AGEs analysiert.

#### 2.3.5.1 AGEs der Seitenketten von Lysin und Arginin in Blutplasma

AGEs können analytisch zur Bewertung des Glykierungsstatus von Proteinen verwendet werden. So wurden beispielsweise Methoden zum Nachweis und der Quantifizierung der AGEs Argpyrimidin, Pentosidin, CML und CEL in Plasmaproteinen entwickelt (*Teerlink et al., 2004; Wilker et al., 2001*).

Um die Glykierung *in vivo* allgemein bewerten zu können wurden Methoden zur Quantifizierung freier AGEs entwickelt. Diese haben unter anderem den Vorteil einer einfacheren Probenaufarbeitung. *Beisswenger et al. (2014)* untersuchten in einer 5-jährigen Studie freie

AGEs als Marker für die Entwicklung diabetischer Nephropathie bei Typ-I-Diabetikern. Es ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie und erhöhten Gehalten der Analyten MG-H1, CEL und CML im Plasma (*Beisswenger et al., 2014*). *Henning et al. (2011)* quantifizierten Amidderivate des Lysins (N- $\epsilon$ -Acetyllysin, N- $\epsilon$ -Formyllysin, N- $\epsilon$ -Lactoyllysin, N- $\epsilon$ -Glycerinyllysin) als freie AGEs im Plasma von nicht-diabetischen Hämodialysepatienten und konnten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe signifikant erhöhte Konzentrationen im Plasma der Dialysepatienten detektieren.

Der umfangreichsten Daten zu freien und proteingebundenen AGEs in Blutplasma sowie freien AGEs in Urin stammen aus der Arbeitsgruppe um *Paul Thornalley*. Die ersten Gehalte eines größeren Spektrums von AGEs wurden zu Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe publiziert (*Thornalley et al., 2003*). Die Methode wurde später zur Untersuchung von Typ-I-Diabetikern (*Ahmed et al., 2005a, 2005b*) bzw. zum Vergleich der Behandlung von Dialysepatienten mit Peritoneal- oder Hämodialyse (*Agalou et al., 2005a, 2005b*) angewendet. Bei Diabetikern und Urämikern wurden erhöhte Gehalte der freien und proteingebundenen AGEs im Plasma bzw. bei Diabetikern mit normaler Nierenfunktion auch der freien AGEs im Urin festgestellt. Bei der Untersuchung der Effizienz von Peritonealdialyse und Hämodialyse konnte für beide Techniken eine effektive Reinigung des Blutes von freien AGEs gezeigt werden.

#### 2.3.5.2 AGEs und Fructosyllysin als Derivate der Seitenketten von Lysin und Arginin in Hämoglobin

Im Unterschied zu AGEs in Plasma und Urin, gibt es nur wenige Studien zu AGEs der Seitenketten von Lysin und Arginin am Hämoglobin. Die Daten sind in Tabelle 2-8 aufgelistet, wobei Quervernetzungsprodukte nicht berücksichtigt wurden.

Ein Hämoglobin Tetramer enthält 44 N- $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins, 11 pro  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette, und 12 Guanidino-Funktionen des Arginins, 3 pro  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette (Tabelle 2-7). Aus dieser großen Zahl reaktiver Gruppen in Kombination mit Glucose bzw. den drei für physiologische Fragestellungen relevanten Dicarbonylverbindungen Glyoxal, Methylglyoxal und 3-DG kann eine große Vielfalt und Anzahl an Derivaten in einem Hämoglobinmolekül entstehen.

*Thornalley et al. (2003)* entwickelten eine LC-MS-Methode zur simultanen Quantifizierung der Lysinderivate Fructosyllysin, CML, CEL und der Argininderivate MG-H1, G-H1, 3DG-H, Argpyrimidin sowie der Quervernetzungsprodukte MOLD und Pentosidin. Diese wurde nach einer enzymatischen Hydrolyse auf die Quantifizierung der MRPs in humanem Hämoglobin von 3 gesunden Probanden angewendet. *Ahmed et al. (2005a)* analysierten mit der gleichen Methode die MRP-Gehalte des Hämoglobins von 21 Typ-I-Diabetikern und 12 Normoglykämikern. Signifikante Unterschiede in den MRP-Gehalten wurden für Fructosyllysin, CEL, MG-H1 und 3DG-H ermittelt. Nach dem Amadori-Produkt Fructosyllysin waren

die Gehalte der Argininderivate MG-H1 und 3DG-H am höchsten. Die ermittelten Gehalte der MRPs aus beiden Studien sind in Tabelle 2-8 zusammengefasst.

Tabelle 2-7: Aminosäurezusammensetzung des Hämoglobins

Aminosäure			$\alpha$ -Kette	$\beta$ -Kette	Hämoglobinetrimer <sup>b</sup>
			[mmol/mol $\alpha$ -Kette]	[mmol/mol $\beta$ -Kette]	[mmol/mol Hämoglobin]
Alanin	A	Ala	15	21	72
Cystein	C	Cys	2	1	6
Asparaginsäure	D	Asp	7	8	30
Glutaminsäure	E	Glu	8	4	24
Phenylalanin	F	Phe	8	7	30
Glycin	G	Gly	13	7	40
Histidin	H	His	9	10	38
Lysin	K	Lys	11	11	44
Leucin	L	Leu	18	18	72
Methionin	M	Met	1	2	6
Asparagin	N	Asn	6	4	20
Prolin	P	Pro	7	7	28
Glutamin	Q	Gln	3	1	8
Arginin	R	Arg	3	3	12
Serin	S	Ser	5	11	32
Threonin	T	Thr	7	9	32
Valin	V	Val	18	13	62
Tryptophan	W	Trp	2	1	6
Tyrosin	Y	Tyr	3	3	12

<sup>a</sup> Quelle: www.uniprot.org:  $\alpha$ -Kette: P69905,  $\beta$ -Kette: P68871; <sup>b</sup> Hämoglobintetramer: 2 ·  $\alpha$ -Kette und 2 ·  $\beta$ -Kette

*Penndorf et al. (2008)* verwendeten die Furosins-Analytik zur Quantifizierung des Fructosylsinglyehaltes im Hämoglobin von 14 diabetischen Urämikern und 6 gesunden Probanden. Die Quantifizierung erfolgte mittels Isotopenstandard und LC-MS. Die Gehalte der Kontrollgruppe lagen im Bereich von 75 und 113 mmol/mol Hämoglobin und für die diabetischen Urämiker zwischen 77 und 155 mmol/mol Hämoglobin. Die Auftragung des Fructosyllysins gegen den HbA<sub>1c</sub>-Wert ergab einen linearen Zusammenhang. Die Gehalte des Fructosyllysins für die diabetischen Urämiker liegen im gleich Bereich wie für die Typ-I-Diabetiker bei *Ahmed et al. (2005a)*. Dagegen sind die Gehalte der Normoglykämiker im Bereich der Werte von *Thornalley et al. (2003)* und um Faktor 2 höher als bei *Ahmed et al. (2005a)*.

*Shapiro et al. (1980)* ermittelten Lysin-66 der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins als quantitativ wichtigste Modifizierungsstelle zum Fructosyllysin *in vivo*. Da CML durch oxidativen Abbau aus Fructosyllysin entstehen kann, gingen *Iwamoto et al. (2001)* davon aus, dass diese Lysinseitenkette zu einem relevanten Anteil als CML vorliegt. Mit einem Immuno-Assay wurde der Gehalt von CML an der Position 66 der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins bei 80 nicht-diabetischen Urämikern mit 32,2 bis 65,7 mmol CML-66/mol Hämoglobin und in einer Kontrollgruppe (n = 20) mit 27,7 bis 41,9 mmol CML-66/mol Hämoglobin bestimmt (*Iwamoto et al., 2001*). Die Mittelwerte der Gruppen unterschieden sich signifikant. Die

Modifizierungsgrade zu CML von 5,0% für die Urämiker und 3,4% für die Kontrollgruppe an einer einzigen Lysinseitenkette liegen im Bereich des Derivatisierungsgrades des N-Terminus mit Glucose. Im Vergleich zum CML-Gehalt des gesamten Hämoglobins von 0,3% bis 0,4% (*Ahmed et al., 2005a; Thornalley et al., 2003*) erscheinen diese Werte zu hoch.

Tabelle 2-8: MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin in humanem Hämoglobin

MRPs	Normo- glykämiker	Diabetiker/ Urämiker	Normo- glykämiker	Diabetiker/ Urämiker	Quelle
	[mmol/mol Hämoglobin]*		[mmol/mol Aminosäure]*		
Fru-Lys	76,6 ± 27,3		1,74 ± 0,62		a
	37,0 ± 13,2	86,2 ± 33,9***	0,84 ± 0,30	1,96 ± 0,77***	b
	75-113	77-155	1,7-2,6	1,8-3,5	c
CML	2,99 ± 0,18		0,068 ± 0,004		a
	3,30 ± 1,01	3,52 ± 0,62	0,075 ± 0,023	0,080 ± 0,014	b
CML-66 (β-Kette)	33,8 ± 4,9 (27,7-41,9)	50,1 ± 8,8*** (32,2-65,7)	16,9 ± 2,4 (13,9-21,0)	25,1 ± 4,4*** (16,1-32,9)	d
CEL	2,42 ± 0,18		0,055 ± 0,004		a
	2,29 ± 0,70	2,99 ± 0,10*	0,052 ± 0,016	0,068 ± 0,023*	b
MG-H1	14,6 ± 4,9		1,22 ± 0,41		a
	31,4 ± 7,2	41,0 ± 14,5*	2,62 ± 0,60	3,42 ± 1,21*	b
G-H1	1,92 ± 1,56	3,36 ± 2,16	0,16 ± 0,13	0,28 ± 0,18	b
3-DG-H	85,4 ± 54,1		7,12 ± 4,51		a
	28,8 ± 10,6	57,4 ± 26,3***	2,40 ± 0,88	4,78 ± 2,19***	b

\*Mittelwert ± Standardabweichung; (Spannweite); Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit dem Signifikanzniveau: \* ( $\alpha < 0,05$ ); \*\* ( $\alpha < 0,01$ ); \*\*\* ( $\alpha < 0,001$ ); Umrechnung von [mmol/mol Hämoglobin] auf [mmol/mol Aminosäure] bezogen auf 44 x Lys bzw. 12 x Arginin pro Hämoglobintetramer; Umrechnung von pmol/mg Hämoglobin in mmol/mol Hämoglobin bezogen auf  $M(\text{Hämoglobin}) = 64450 \text{ g/mol}$  (*Braunitzer, 1964*); Berechnung CML-66 als [mmol/mol Aminosäure] bezogen auf 2 x Lys-66 der β-Ketten pro Hämoglobintetramer; Quellen: <sup>a</sup> *Thornalley et al. (2003)*; <sup>b</sup> *Ahmed et al. (2005a)*: Diabetes Typ-I; <sup>c</sup> *Penndorf et al. (2008)* bzw. *Kunert (2009)*: Diabetes Typ-II und Urämie; <sup>d</sup> *Iwamoto et al. (2001)* normoglykämische Urämiker (Hämodialysepatienten).

### 2.3.6 N-Terminale AGEs des Hämoglobins

Das N-terminale Amadori-Produkt der β-Kette des Hämoglobins ist als HbA<sub>1c</sub>-Wert ein etablierter klinischer Parameter und von großer Bedeutung bei der Diagnose von Diabetes mellitus. Bisher sind aber nur wenige Publikationen verfügbar, die sich mit dem Nachweis und der Relevanz N-terminaler AGEs an Proteinen auseinandersetzen.

Wie bereits in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, wurde für β-Lactoglobulin die N-terminale Modifizierung zu den CM- und CE-Derivaten in Milchprodukten nachgewiesen (*Meltretter et al., 2013*). Der Nachweis des proteingebundenen N-α-Carboxymethylvalins (CM-Val) an humanem Hämoglobin wurde von *Cai & Hurst (1999)* erbracht. *Krause et al. (2004)* wiesen nach, dass die Bildung von 2(1H)-Pyrazinonen in biologischen Systemen relevant sein kann und *Kunert (2009)* konnte das Glyoxal-2(1H)-Pyrazinon des N-Terminus der β-Kette von Hämoglobin in Blutproben nachweisen.

Die Studien zeigen, dass N-terminale AGEs am Hämoglobin detektierbar sind. Doch bisher wurden nur zwei der zu erwartenden Carboxyalkyl- bzw. Pyrazinon-Derivate nachgewiesen und quantifiziert. Insbesondere die von den kurzkettigen Dicarbonylverbindungen Glyoxal und Methylglyoxal abgeleiteten Derivate CM-Val, CE-Val sowie die Glyoxal- und Methylglyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette sollen deshalb in humanem Hämoglobin nachgewiesen und quantifiziert werden.

#### 2.3.6.1 CM-Val bzw. N- $\alpha$ -CM-Val-Hämoglobin

*Cai & Hurst (2001)* verwendeten einen modifizierten Edman-Abbau, um gezielt das Carboxymethylierungsprodukt des Valins (CM-Val) vom N-Terminus des Hämoglobins abzuspalten und nachzuweisen. Als Aufarbeitungsstandard wurde in Hämoglobinproben und Standardlösungen eine definierte Stoffmenge CE-Val zugesetzt. Für die Kalibrierung wurde das Intensitätsverhältnis der Derivate von CM-Val und CE-Val gegen die eingesetzte Konzentration eines CM-Val-Standards aufgetragen. In 10 nicht genauer charakterisierten humanen Blutproben konnten  $13,5 \pm 3,2$  nmol CM-Val/g Hämoglobin (entsprechend:  $0,87 \pm 0,20$  mmol CM-Val/mol Hämoglobin, Tabelle 2-9) mittels GC-MS quantifiziert werden.

CM-Val wurde als möglicher Biomarker für oxidativen Stress diskutiert, da die Bildung von CM-Val, wie die Bildung von CML, oxidative Teilschritte benötigt. Methodisch bietet die Quantifizierung von CM-Val in Hämoglobin nach modifiziertem Edmann-Abbau den Vorteil einer einfachen Probenaufarbeitung. Störungen durch eine Nachbildung von CM-Val aus dem N-terminalen Amadori-Produkt wie bei der klassischen CML-Analytik sind dabei nicht zu erwarten. CML als Derivat des Lysins muss hydrolytisch aus dem Protein freigesetzt werden. Bei einer Hydrolyse mit Salzsäure muss die Nachbildung von CML aus Fructosyllysin berücksichtigt werden, weshalb Fru-Lys vor der Hydrolyse in einem zusätzlichen Arbeitsschritt reduziert wird (*Cai and Hurst, 1999*).

*Uchimura et al. (2001)* entwickelten einen Immuno-Assay zur direkten Bestimmung von CM-Val-Hämoglobin in Blutproben. Die Auswahl des Antikörpers erfolgte auf Grund der positiven Reaktion auf das N-terminale CM-Heptapeptid der Hb- $\beta$ -Kette und der ausbleibenden Reaktion auf das unmodifizierte Heptapeptid. Der Antikörper zeigte keine oder nur sehr geringe Wechselwirkungen mit CML-Peptiden, CM-HSA (humanes Serumalbumin) sowie unmodifiziertem Hämoglobin und HSA. Die Kalibrierung wiederum erfolgte über den absoluten Gehalt von CM-Val im Hämoglobin einer ausgewählten Blutprobe. Die Richtigkeit der Messergebnisse des Immuno-Assays wurde durch Vergleich der quantifizierten Gehalte von CM-Val mit einer HPLC-Methode nach Hydrolyse des Hämoglobins mit 6 M Salzsäure und Derivatisierung mit Phenylisothiocyanat (PITC) überprüft. Da in der Studie keine Reduzierung des Hämoglobins vor der Hydrolyse mit Salzsäure durchgeführt wurde, blieb unberücksichtigt, dass CM-Val aus N-terminalem Fructosylvalin aufarbeitungsinduziert nachgebildet werden könnte. Auch wurde nicht untersucht ob eine Wechselwirkung des

Antikörpers mit dem CM-Derivat der  $\alpha$ -Kette oder den CE-Derivaten der  $\alpha$ - bzw. der  $\beta$ -Kette besteht.

Nach der Analyse von Blutproben von 94 Normoglykämikern und 207 Typ-II-Diabetikern konnte gezeigt werden, dass CM-Val-Hämoglobin bei den Diabetikern signifikant erhöht ist. In der gesunden Kontrollgruppe wurden Gehalte von 0,44 bis 1,66 mmol CM-Val/mol Hämoglobin ( $0,82 \pm 0,44$  mmol CM-Val/mol Hämoglobin) und für die Diabetiker Gehalte von 0,44 bis 5,05 mmol CM-Val/mol Hämoglobin ( $1,17 \pm 0,44$  mmol CM-Val/mol Hämoglobin) bestimmt (Tabelle 2-9). Die Gruppen unterschieden sich ebenfalls nach dem HbA<sub>1c</sub>-Wert signifikant. Eine Korrelation zwischen dem HbA<sub>1c</sub>-Wert und dem CM-Val-Hämoglobin bestand allerdings nicht. Es konnten auch keine Zusammenhänge zwischen dem CM-Val-Gehalt und dem Geschlecht oder dem Alter festgestellt werden. Die Gruppe der Typ-II-Diabetiker wurde zusätzlich nach ihrer Nierenfunktion unterteilt. Dabei konnten die Gruppen nicht hinsichtlich des HbA<sub>1c</sub>-Werts, aber nach dem CM-Val-Hämoglobin unterschieden werden. Der CM-Val-Gehalt des Hämoglobins war mit zunehmend eingeschränkter Nierenfunktion signifikant höher. Diese Erhöhung von CM-Val-Hämoglobin wurde als ein Maß für einen erhöhten oxidativen Stress diskutiert, da CM-Derivate aus dem oxidativen Abbau des Amadori-Produkts (Fru-Val-Hämoglobin) entstehen können (*Uchimura et al., 2001*).

Tabelle 2-9: CM-Val bzw. CM-Val-Hämoglobin (CM-Val-Hb) und GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon in humanem Blutproben

Analyt	Probanden	[nmol/g Hämoglobin] <sup>#</sup>	[mmol/mol Hämoglobin <sup>‡</sup> ] <sup>#</sup>
CM-Val <sup>a</sup>		13,5 ± 3,2	0,87 ± 0,20
CM-Val-Hb <sup>b</sup>	Diabetiker (Typ II)	18,2 ± 6,9 (6,8-78,3)	1,17 ± 0,44 (0,44-5,05)
	Kontrolle	12,7 ± 6,9 (6,8-25,8)	0,82 ± 0,44 (0,44-1,66)
CM-Val-Hb <sup>c</sup>	Diabetiker (Typ II)	22,4 ± 7,9	1,44 ± 0,51
	Kontrolle	15,3 ± 3,1	0,99 ± 0,20
GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon <sup>d</sup>	diabetische Urämiker	42-73	2,7-4,7
	Diabetiker	18-38	1,2-2,4
	Kontrolle	7-9	0,5-0,6

<sup>#</sup>Mittelwert ± Standardabweichung (Spannweite); <sup>‡</sup> Berechnung mittels  $M(\text{Hämoglobintetramer}) = 64450$  g/mol;

<sup>a</sup> *Cai & Hurst (1999)*; <sup>b</sup> *Uchimura et al. (2001)*; <sup>c</sup> *Shimada et al. (2005)*; <sup>d</sup> *Kunert (2009)*.

*Shimada et al. (2005)* analysierten mit dem gleichen Immuno-Assay wie *Uchimura et al. (2001)* Blutproben von 1163 Typ-II-Diabetikern (normale Nierenfunktion) und von 486 normoglykämischen Probanden (Kontrolle). Die Gehalte von CM-Val-Hämoglobin unterschieden sich zwischen den Gruppen signifikant und waren in der Gruppe der Diabetiker im Mittel um Faktor 1,5 erhöht (Tabelle 2-9). Auch in dieser Studie konnte keine Korrelation von CM-Val-Hämoglobin mit dem HbA<sub>1c</sub>-Wert ermittelt werden. Mit *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten sollte der Zusammenhang der Bildung von CM-Val-Hämoglobin mit dem oxidativen Stress genauer untersucht werden. Die Inkubation von Hämoglobin mit Glucose und Wasserstoffperoxid resultierte dabei in höheren Gehalten von CM-Val-Hämoglobin als wenn nur Glucose eingesetzt wurde. 15 Patienten mit besonders hohen Werten für CM-Val-

Hämoglobin bekamen in einer Interventionsstudie über 6 Monate eine Supplementierung mit Antioxidantien. Dadurch konnte der CM-Val-Hämoglobin-Gehalt signifikant gesenkt werden. Die Autoren kamen ebenfalls zu der Schlussfolgerung, dass CM-Val-Hämoglobin als Marker für den oxidativen Stress bei Diabetikern dienen könnte und die Carboxymethylierung in langlebigem Hämoglobin insbesondere chronischen oxidativen Stress detektiert (*Shimada et al., 2005*).

#### 2.3.6.2 2(1H)-Pyrazinone

*Krause (2005)* untersuchte die Bildung von 2(1H)-Pyrazinonen aus der Umsetzung eines Tripeptids mit Glyoxal und Methylglyoxal unter physiologischen Bedingungen *in vitro*. Ein Vergleich der Reaktivität des Peptids mit der Seitenkettenfunktion des Arginins zeigte, dass sich diese nicht unterschied. Da Arginin in Proteinen als wichtigster Reaktionspartner für Dicarbonylverbindungen gilt, wurde vermutet, dass 2(1H)-Pyrazinone in biologischen Systemen als quantitativ relevante AGEs vorkommen. Um die Bildung von 2(1H)-Pyrazinonen an Proteinen unter physiologischen Bedingungen zu belegen, wurde bovines Insulin mit Glyoxal inkubiert. Es zeigte sich, dass an beiden N-Termini des Insulins Pyrazinonstrukturen nachweisbar waren. Dabei ergab die Produktbildung für die  $\alpha$ -Kette einen Umsatz von 2% und für die  $\beta$ -Kette von 6%.

*Kunert (2009)* hat in ihrer Dissertation die Bildung von 2(1H)-Pyrazinonen am N-Terminus von Hämoglobin und Serumalbumin untersucht und konnte das Glyoxal-2(1H)-Pyrazinon der  $\beta$ -Kette des humanen Hämoglobins (GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) nachweisen. Dabei wurde das N-terminale AGE enzymatisch mit Pronase E freigesetzt und mittels RP-HPLC-Fluoreszenz über eine externe Kalibrierung quantifiziert. Das GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon wurde in Proben von Normoglykämikern mit 0,5 bis 0,6 mmol/mol Hämoglobin, von Diabetikern mit 1,2 bis 2,4 mmol/mol Hämoglobin und von diabetischen Urämikern mit 2,7 bis 4,7 mmol/mol Hämoglobin quantifiziert. Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der Gehalte des GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinons signifikant (*Kunert, 2009*).

#### 2.3.7 2(1H)-Pyrazinone biologischer Herkunft und Ableitung synthetischer 2(1H)-Pyrazinonderivate mit pharmakologischer Wirkung

2(1H)-Pyrazinonstrukturen sind nicht nur aus der Maillard-Reaktion bekannt. Natürlich vorkommende 2(1H)-Pyrazinonstrukturen wurden in Molekülen entdeckt, die von terrestrischen oder marinen Mikroorganismen produziert werden. Für einige dieser Moleküle sind Wirkungen auf biologische Systeme belegt, so dass die Untersuchung einer biologischen Wirkung von 2(1H)-Pyrazinonen aus Bräunungsreaktionen interessant sein könnten. Daneben können biologische Synthesestrategien Anregungen zur Herstellung von Pyrazinonstrukturen geben. In diesem Kapitel werden Erkenntnisse zum Vorkommen und der Wirkung von Molekülen mit 2(1H)-Pyrazinonstruktur beschrieben.

Mit der Aspergillussäure wurde vermutlich das erste natürliche 2(1*H*)-Pyrazinon entdeckt. Für Aspergillussäure aus *Aspergillus flavus* wurde eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen, die aber nicht auf der 2(1*H*)-Pyrazinonstruktur, sondern der Hydroxyl-Amin-Funktion beruht (Dutcher, 1947).

Durch das Screening von sequenzierten Genomen von den menschlichen Körper besiedelnden Mikroorganismen nach kleinen sekundären Molekülen, wurde entdeckt, dass *Staphylococcus aureus* und andere hautbesiedelnde Staphylococci Moleküle mit 2(1*H*)-Pyrazinonstruktur produzieren (Alvarez et al., 1995). Bei deren Synthese durch eine nichtribosomale Synthetase wird ein Dipeptid hergestellt, die C-terminale Carboxylgruppe zum Aldehyd reduziert und anschließend kann durch einen nukleophilen Angriff der N-terminalen Aminogruppe am Aldehyd die Zyklisierung zum Dihydropyrazinon stattfinden. Zur Ausbildung des 2(1*H*)-Pyrazinons ist ein abschließender oxidativer Schritt nötig. Bisher wurden in Staphylococci die 2(1*H*)-Pyrazinone Tyrvalin, Phevalin und Leuvalin nachgewiesen (Abbildung 2-18). Das aus dem Dipeptid Val-Phe gebildete Phevalin wurde neben weiteren 2(1*H*)-Pyrazinonstrukturen bereits aus Actinomyceten (*Streptomyces sp.*) isoliert und ihm konnte eine inhibierende Wirkung auf die Cystein-Protease Calpain nachgewiesen werden, die in Säugetieren ubiquitär vorkommt. Ihre Inhibierung in Nervenzellen könnte einen positiven Effekt bei neurodegenerativen Erkrankungen haben (Alvarez et al., 1995). *Staphylococcus aureus* besiedelt die Haut und Schleimhäute des Menschen und kann dort an Entzündungsprozessen beteiligt sein. Einige Varianten von *Staphylococcus aureus* weisen Antibiotikaresistenzen auf, weshalb die Erforschung ihrer molekularen Stoffwechselprodukte von großem Interesse ist (Zimmermann and Fischbach, 2010). Für Tyrvalin konnte nachgewiesen werden, dass es an der Regulation der Expression von Virulenzfaktoren beteiligt und notwendig für eine produktive Infektion durch *Staphylococcus aureus* ist (Wyatt et al., 2010).

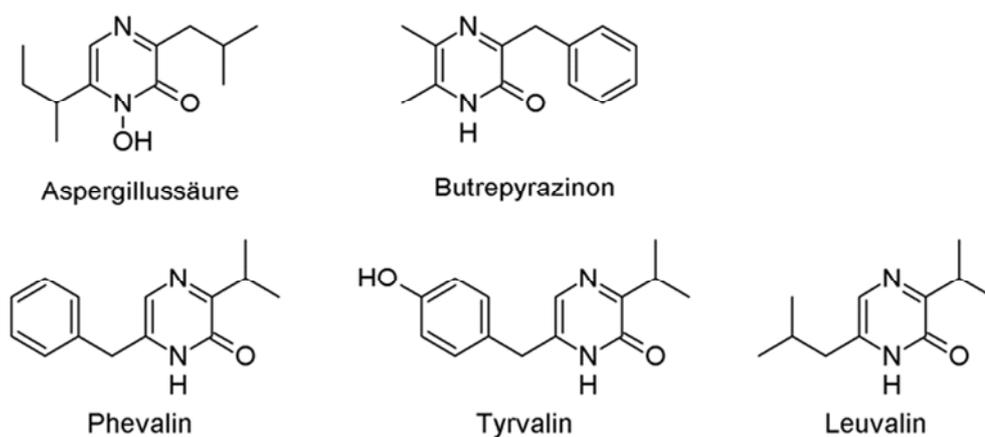


Abbildung 2-18: Aspergillussäure, Phevalin, Tyrvalin, Leuvalin, Butrepyrazinon

2(1*H*)-Pyrazinone ohne Substituenten an C-5 lassen sich über eine Biosynthese aus Dipeptiden erklären. Es konnten allerdings auch 2(1*H*)-Pyrazinone isoliert werden, die wie Butrepyrazinon sowohl an C-6 als auch C-5 substituiert sind. Diese Strukturen wurden aus dem

Actinomyceten-Stamm *Verrucosispora sp.* (Mangrovensediment, Ghana) bzw. aus *Streptomyces sp.* (aus marinem Schwamm, Japan) gewonnen. Für Butrepyrazinon wird vermutet, dass nach der Bildung des 2(1*H*)-Pyrazinons aus Ala-Phe die Methylierung an C-5 als abschließender Schritt der Biosynthese folgt. Butrepyrazinon zeigte keine antibakterielle Aktivität. Die Funktion ist entsprechend noch nicht geklärt (Kyeremeh *et al.*, 2014). Mit dem Wissen über die Bildung von 2(1*H*)-Pyrazinonen auf dem Maillard-Weg wäre eine Bildung von Butrepyrazinon aus Diacetyl und Phenylalaninamid denkbar.

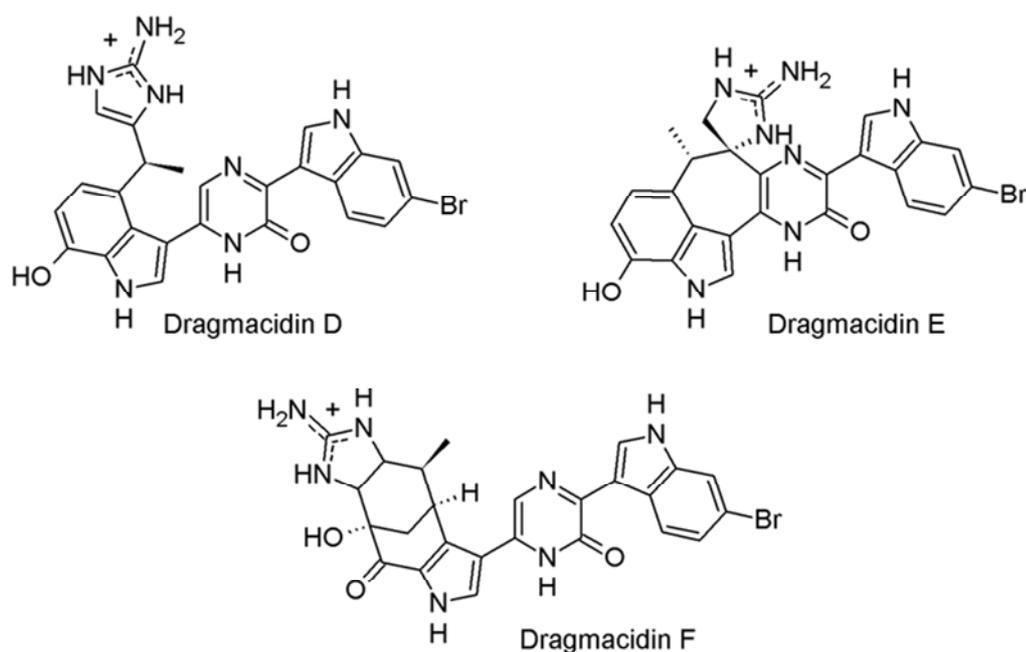


Abbildung 2-19: Dragmacidin D, E, F

Die Gruppe der Dragmacidine (Abbildung 2-19) wurde aus verschiedenen marinen Schwämmen isoliert, Dragmacidin D und E aus dem australischen Tiefseeschwamm *Spongosorites sp.* und Dragmacidin F aus einem Halicortex-Schwamm in Italien (Capon *et al.*, 1998; Cutignano *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 1992). Für Dragmacidin D und F wurde antiinflammatorische und cytotoxische Aktivität sowie Phosphatase-Inhibierung nachgewiesen. Dragmacidin D wirkt außerdem inhibierend auf die neurale Stickstoffmonoxid-Synthase, was dessen Struktur für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen neurodegenerative Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Chorea Huntington interessant macht. Dragmacidin F soll *in vitro* antivirale Aktivität gegen Herpes simplex Viren und HI-Viren (HIV-1) zeigen. Auf Grund der umfangreichen biologischen Untersuchungen und da die Verfügbarkeit von Dragmacidin-Alkaloiden aus natürlichen Quellen schwierig ist, wurden systematische Synthesestrategien entwickelt (Garg and Stoltz, 2006). Die 2(1*H*)-Pyrazinon-Struktur ist nicht nur in Molekülen biologischer Herkunft relevant. Die Entwickler von synthetischen Peptidometics greifen ebenfalls auf diese Struktureinheit zurück, wie die folgenden Beispiele zeigen. So wurden substituierte 2(1*H*)-Pyrazinone als Kinase-Inhibitoren systematisch untersucht. Kleine Kinase-Inhibitoren sind ein Ansatz in der Krebstherapie (Caldwell *et al.*, 2012). Moleküle mit

agonistischer oder antagonistischer Wirkung auf Opioid-Rezeptoren mit einer zentralen 2(1*H*)-Pyrazinonstruktur als „Spacer“ wurden auf synthetischem Weg erhalten (*Okada, 2009*). Der Entwicklungsprozess eines Serin-Protease-Inhibitors hat als Resultat einen oral verfügbaren antitrombotischen Wirkstoff mit einer zentralen 2(1*H*)-Pyrazinon-Struktur ergeben (*Sanderson, 1999*).

### 2.3.8 Offene Fragen zur N-terminalen Glykierung des Hämoglobins

Das Glykierungsprodukt des N-Terminus der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins mit Glucose (HbA<sub>1c</sub>-Wert) ist ein etablierter Indikator zur Diagnose eines Diabetes mellitus. Durch die hohe Lebensdauer der Erythrozyten und damit des darin enthaltenen Hämoglobins können im Mittel erhöhte Glucosekonzentrationen retrospektiv nachgewiesen werden. Da Erythrozyten Glucose über den GLUT-1 insulinunabhängig aufnehmen, kann von einer intrazellulären Hyperglykämie der Erythrozyten auf eine systemische Hyperglykämie geschlossen werden.

Aus Glucose können *in vivo* enzymatisch oder nicht-enzymatisch 1,2-Dicarbonylverbindungen gebildet werden. Die kurzkettigen Verbindungen Glyoxal und Methylglyoxal weisen im Vergleich zu Glucose eine erheblich höhere Reaktivität auf. Bei Hyperglykämie oder erhöhtem oxidativem Stress ist die Bildung von Glyoxal und Methylglyoxal begünstigt. Die erhöhten Konzentrationen dieser 1,2-Dicarbonylverbindungen werden als Dicarbonylstress bezeichnet. Dieser Dicarbonylstress wird im Zusammenhang mit Schädigungen von zellulären und extrazellulären Proteinen und möglichen funktionellen Konsequenzen diskutiert.

Als N-terminale von Glyoxal abgeleitete AGEs des Hämoglobins wurden bereits CM-Val und das Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinon der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins in humanen Blutproben nachgewiesen. Davon ausgehend ist zu erwarten, dass auch das Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinon der  $\alpha$ -Kette sowie die N-terminale Modifizierung durch Methylglyoxal über CE-Val und die Methylglyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone nachweisbar sind. Für Diabetiker und Urämiker sind erhöhte Konzentrationen von Glyoxal und Methylglyoxal im Blutplasma und in Erythrozyten bekannt. So wie die Hyperglykämie über Fructosylderivate bzw. den HbA<sub>1c</sub>-Wert diagnostiziert wird, könnten die AGE-Gehalte des Hämoglobins Rückschlüsse auf einen erhöhten Dicarbonylstress zulassen. Dazu können N-terminale AGEs und AGEs der Seitenketten von Lysin und Arginin dienen. Im Vergleich zur Quantifizierung der momentanen Konzentration der freien 1,2-Dicarbonylverbindungen könnten die abgeleiteten stabilen AGEs eine Einschätzung der mittleren Belastung über einen längeren Zeitraum zulassen.

Über die Quantifizierung kettenpezifischer N-terminaler AGEs kann überprüft werden, ob die stark bevorzugte Bildung des Fructosylderivats am N-Terminus der  $\beta$ -Kette im Vergleich zur  $\alpha$ -Kette auch auf die Reaktion mit 1,2-Dicarbonylverbindungen zutrifft.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

#### 3.1.1 Chemikalien

Tabelle 3-1: Verwendete Chemikalien

Name	Spezifikation, Katalognr.	Hersteller
Aceton	p.a.	Fisher Scientific, Schwerte
Acetonitril	HPLC grade	VWR, Darmstadt
Ameisensäure	99%	Grüssing, Filsum
Aminopeptidase M (11 U/mg Protein; 60,6 U/mL)	Porcine Kidney; 60,6 U/ml; 164598	Calbiochem, Darmstadt
Brenztraubensäure	p.s., ≥ 98%,	Merck, Darmstadt
1-Butanol	reinst	Applichem, Darmstadt
Carboxypeptidase Y	lyophilized powder, 87 UN/mg solid, from <i>S. cerevisiae</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
CEL, N-ε-(1-Carboxyethyl)-L-Lysin	hergestellt von Michael Hellwig, 2007	(Peßler, 2013)
Chinoxalin	99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
CML, N-ε-(1-Carboxymethyl)-L-Lysin	hergestellt von Michael Hellwig, 2007	(Peßler, 2013)
D <sub>2</sub> -CML, 2D-N-ε-(1-Carboxymethyl)-L-Lysin	> 99% (w/w)	PolyPeptide Laboratories, Strasbourg
3-Desoxyglucosonchinoxalin	hergestellt von Julia Degen	Reinheit 98 %
3-Desoxypentosonchinoxalin	hergestellt von Julia Degen	Reinheit 98 %
ortho-Dianisidin	p.a.	Ferak, Berlin
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	p.a.	Ferak, Berlin
Eisessig	100%	VWR, Darmstadt
Essigsäure	100%, MS grade	VWR, Briare, Frankreich
Ethanol	96%, vergällt mit Petrolether	Berkel, Berlin
Ethylacetat	p.a.	VWR, Darmstadt
Fru-Lys, N-ε-Fructosyllysin	hergestellt von Michael Hellwig	(Hellwig, 2011; Peßler, 2013)
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Fru-Lys, <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -N-ε-Fructosyllysin	hergestellt aus <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Lysin, von Rene Krause	(Peßler, 2013)
D-Glucose	wasserfrei; > 99%	Alfa Aesar, Karlsruhe
Glyoxal	40 % (~8,8 M) in Wasser, Dichte = 1,270 g/cm <sup>3</sup>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glyoxylsäure Monohydrat	purum, ≥ 97%	Fluka, Taufkirchen
Kaliumchlorid	99,5%	Grüssing, Filsum
Kaliumdihydrogenphosphat	99,5%	Grüssing, Filsum

Name	Spezifikation, Katalognr.	Hersteller
Kaliumiodid	99,5%, reinst	Grüssing, Filsum
Kaliumpermanganat	rein	VEB Laborchemie, Appolda
Kieselgel 60	0,063–0,200 mm	Merck, Darmstadt
Methanol	HPLC grade	VWR, Darmstadt
Methanol	MS grade	VWR, Leuven, Belgien
2-Methylchinoxalin	Reinheit 97%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methylglyoxal	40%ige Lösung, M-0252	Sigma-Aldrich, Steinheim
MG-H1, N- $\delta$ -(5-Methyl-4-oxoimidazol-2-yl)-L-ornithin (Methylglyoxalhydroimidazol-1)	hergestellt von Michael Hellwig, 2010	(Peßler, 2013)
$^{13}\text{C}_6$ -MG-H1, Methylglyoxalhydroimidazol-1	aus $^{13}\text{C}_6$ -Arginin hergestellt, Dissertation Julia Degen	(Degen, 2014; Peßler, 2013)
mikrokristalline Cellulose	1.02331.0500; 20–160 $\mu\text{m}$	Merck, Darmstadt
Natriumborhydrid	p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	100%,	VWR, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	99,5%	Grüssing, Filsum
Natriumhydroxid	p.a. , 99%	Grüssing GmbH, Filsum
Ninhydrin	$\geq 99\%$	Serva, Heidelberg
Palladium auf Aktivkohle	10% Pd (w/w)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepsin (10 FIP-U/mg Protein, Merck)	Porcine gastric mucosa cryst. lyophilized; 10 FIP-U/mg; 1.07192	Merck, Darmstadt
ortho-Phenylendiamin (OPD)	purum	Fluka, Taufkirchen
Prolidase (1000 U, 106 U/mg Protein)	Porcine Kidney; 106 U/mg; P6675- 1KU	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pronase E (4000 PU/mg Protein)	Streptomyces griseus; 4.000.000 PU/g; 1.07433	Merck, Darmstadt
Reinstwasser	Purelab plus hauseigene Anlage (Mischbettionenaustauscher und Filter 1 $\mu\text{m}$ ), Leitfähigkeit 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$	USFilter, Ransbach-Baumbach
Salzsäure	37%	Merck, Darmstadt
Seesand	reinst	Grüssing, Filsum
Schwefelsäure	95–97%, p.a.	Merck, Darmstadt
Stärke	aus Weizen	Sigma-Aldrich, Steinheim
2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid	für die Bakteriologie	Feinchemie K.-H. Kallies, Sebnitz
Thymol	purum, > 99,0%	Fluka, Taufkirchen
L-Valin (Val)	1.08495.0025; $\leq 0,5\%$ D-enantiomer	Merck, Darmstadt
Valyl-Glutaminsäure (Val-Glu)	G-3520	Bachem, Bubendorf Schweiz
Valyl-Histidin (Val-His)	G-3535	Bachem, Bubendorf Schweiz
Valyl-Leucin Hydrochlorid (Val-Leu · HCl)	G-3545	Bachem, Bubendorf Schweiz
Valyl-Leucyl-Serin (Val-Leu-Ser)	Reinheit 95 %	Bachem, Bubendorf Schweiz

Name	Spezifikation, Katalognr.	Hersteller
Valyl-Serin (Val-Ser)	G-3580	Bachem, Bubendorf Schweiz
Valyl-Tyrosin (Val-Tyr)	G-3585	Bachem, Bubendorf Schweiz
Wasserstoff	5.0, > 99,999% H <sub>2</sub>	Air Liquide, Düsseldorf

### 3.1.2 Materialien

Tabelle 3-2: Materialien

Name	Spezifikation, Katalognr.	Hersteller
Anionenaustauscher	AG 1-X8 Resin, 200-400 mesh, Acetat-Form	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaring, Deutschland
Auftragskapillaren für die DC	1 µL, 2 µL	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
DC-Platten	Cellulose F, 0,25 mm, Nr. 5574	Merck, Darmstadt, Deutschland
DC-Platten	Kieselgel 60, 0,25 mm, Nr. 5553	Merck, Darmstadt, Deutschland
Einwegspritzen	1–20 mL	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Faltenfilter	185 mm	Munktell, Bärenstein, Deutschland
Filter für Lösungsmittel-Filtration	0,45 µm, Hydrophiles Polypropylen	Pall, Crailsheim, Deutschland
Glassäulen mit Fritte	d = 3,0 cm, verschiedene Längen	Rettberg, Göttingen, Deutschland
Hydrolyseröhrchen, Duran, mit Schraubdeckel und Septum	12 mm × 100 mm, 16 mm × 160 mm	Schott AG, Mainz, Deutschland
HPLC-Säulen	Eurospher 100-5 C18 Vertex Column: 100 mm x 16 mm, Porengröße 100 Å, Partikelgröße 10 µm, mit Vorsäule (30 × 16 mm) des entsprechenden Materials	Knauer, Berlin, Deutschland
	ProntoSil 60 Phenyl, 250 × 4,6 mm, 5 µm, mit integrierter Vorsäule (5 × 4 mm) des entsprechenden Materials	Knauer, Berlin, Deutschland
	Eurospher 100-5 C18 Vertex Column: 250 mm x 4,6 mm, Porengröße 100 Å, Partikelgröße 5 µm, mit integrierter Vorsäule (5 × 4 mm) des entsprechenden Materials	Knauer, Berlin, Deutschland
	Eurospher 100-5 C18 Vertex Column: 250 mm x 3,0 mm, Porengröße 100 Å, Partikelgröße 5	Knauer, Berlin, Deutschland

Name	Spezifikation, Katalognr.	Hersteller
	µm, mit integrierter Vorsäule (5 × 4 mm) des entsprechenden Materials	
	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8: 4,6 mm x 150 mm, Porengröße 80 Å, Partikelgröße 5,0 µm	Agilent, Frankfurt a. M., Deutschland
	Agilent Zorbax 300 SB-C8: 4,6 mm x 150 mm, Porengröße 300 Å, Partikelgröße 3,5 µm	Agilent, Frankfurt a. M., Deutschland
	Thermo Hypercarb: 2,1 mm x 150 mm, Partikelgröße 5 µm	Thermo Scientific
	CS-Chromatographie: Multospher 120 RP18 HP, Partikelgröße 5 µm, 250 mm x 2 mm mit Vorsäule des gleichen Materials (20 mm x 2 mm)	Chromatographie Service, 52374 Langerwehe, Deutschland
Kationenaustauscher	Lewatit S 100	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Kationenaustauscher-Säule für Aminosäureanalysen	Kationenaustauschersäule LCA K07/Li	Sykam, Fürstenfeldbruck, Deutschland
Kieselgel 60, für die Säulenchromatographie	0,063–0,200 mm	Merck, Darmstadt, Deutschland
Parafilm		Pechiney, Chicago, USA
Reaktionsgefäße	1,5 mL und 2,0 mL, safe-lock	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rollrandschnappdeckelgläser	versch. Größen (10–50 mL)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Septen für HPLC-Vials	d = 8 mm, PTFE-beschichtet	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	0,45 µm Poren, d = 13 mm, hydrophilisiertes Polypropylen	Pall, Crailsheim, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Perfect flow RC, Porengröße 0,2 µm	WICOM Germany GmbH, Heppenheim
Universalindikatorpapier		Feinchemie K.-H. Kallies, Sebnitz, Deutschland
Vials für HPLC	1,5 mL, Glas, ggf. mit Inserts 200 µL	VWR, Darmstadt, Deutschland

### 3.1.3 Geräte

Tabelle 3-3: Verwendete Geräte

Name	Spezifikation	Hersteller
Aminosäureanalysator (Abschnitt 3.3.16)	S4300	SYKAM, Fürstenfeldbruck, Deutschland
Analysenwaage	BP 121 S, Genauigkeit 0,0001 g	Sartorius, Göttingen, Deutschland

<b>Name</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Hersteller</b>
Chromatographiesäulen für die semipräparative Ionenaustausch-Chromatographie	Econo <sup>®</sup> Column, verschiedene Größen	BioRad Lab., München, Deutschland
DC-Kammern	verschiedene Größen	Camag, Berlin, Deutschland
Elementaranalysator	EA 3000 Euro Vektor CHNSO	Hekatech GmbH, Wegberg, Deutschland
ESI-MS	Mariner Elektrosprayionisation und Flugzeit-massenspektrometer	PerSeptive Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
Feinwaage	BP 3100 S (Genauigkeit 0,01 g)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fraktionssammler	Redifrac, 10-ml-Röhrchen, Glas	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Fraktionssammler	BioRad 2110, 6-ml-Röhrchen, PP	BioRad Lab., München, Deutschland
Gefriertrocknung	Alpha 1-2	Christ GmbH, Osterode, Deutschland
HPLC-UV/FD, analytisch	Autosampler Basic Marathon 816	Sparta Holland BV, Emmen, Deutschland
	Wellchrom: Degasser, Solvent-Organizer K-1500, Pumpe K-1001 mit 10 ml Pumpenkopf, Mischkammer, Säulenofen (Umluft, Jetstream 2 Plus), 2 x UV-Detektor K-2501	Knauer GmbH, Berlin, Deutschland
	Fluoreszenzdetektor La Chrom L-7485	Merck, Hitachi
HPLC, semipräparativ	Manuelles Injektionsventil, Smartline Manager-5000 (Degaser Modul, Interface-Modul, Niederdruckgradientenblock), Pumpe Smartline-1000 mit 50 ml Pumpenkopf, UV-Detektor Smartline-2500	Knauer GmbH, Berlin, Deutschland
HPLC-CLND, analytisch	1100 Series mit Degasser G1322A, Pumpe G1312A, Autosampler G1313A, Säulenofen G1316A, UV-Detektor G1314A, Stickstoffsensitiver Detektor Antek 8060	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
Kolbenhubpipetten	Reference, verschiedene Größen	PAC, Houston, Texas Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
LC-MS/MS	1200 Series mit Entgaser G1379B, Pumpe G1312A, Autosampler G1329A, Säulenofen G1316A, DAD G1315D Agilent Technologies 6410 Triple Quad mit	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland

Name	Spezifikation	Hersteller
	ESI-Ionenquelle, Triple-Quadrupol-Massenanalysator	
NMR-Spektrometer	DRX-500 und Avance 600	Bruker, Reinstetten, Deutschland
Ölbad	temperierbar mit Rührwerk, HBR4	Ika, Staufen, Deutschland
pH-Meter	WTW pH 526	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
pH-Elektrode für potentiometrische Titration	LL-micro pH-Elektrode	Metrohm, Herisau, Schweiz
Trockenschrank	Umluft	Heraeus, Thermo Sci., Langenselbold
Ultraschallbad	Sonorex RK 52H	Badelin, Berlin
Vakuumkonzentrator	Thermo Savant SPD SpeedVac, Kühlfalle RVT 4104, Vakuumpumpe OFP 400	TermoSavant, Holbrook, USA
Vakuumpumpe (Hoch-)	Vap 5, bis 0,01 mbar, Ölpumpe	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Vakuumrotationsverdampfer	Laborota 4000, Membranpumpe	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Zentrifuge	Eppendorf 5804R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

## 3.2 Synthese der Vergleichssubstanzen

### 3.2.1 Synthese von N- $\alpha$ -Fructosylderivaten (Amadori-Produkte)

#### *Synthese von N- $\alpha$ -Fructosyl-Valin (Fru-Val)*

Die Synthese von Fru-Val orientierte sich an den Methoden von *Reutter & Eichner (1989)* sowie *Krause et al. (2003)*. 236,7 mg (2,02 mmol) L-Valin und 2,1648 g (12 mmol) D-Glucose wurden in 100 mL Methanol gelöst und bei 90 °C unter Rückfluss für 2,5 h erhitzt. Das Lösungsmittel Methanol wurde unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde zur Isolierung weiterverwendet.

#### *Synthese von N- $\alpha$ -Fructosylvalylleucin (Fru-Val-Leu) und N- $\alpha$ -Fructosylvalylhistidin (Fru-Val-His)*

Die Synthesen der Amadori-Produkte der Dipeptide Val-Leu und Val-His wurden von *Tina Müller* in ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt (*Müller, 2012*). Es wurden 300 mg Val-Leu·HCl (1,13 mmol) und 1,215 g D-Glucose (6,75 mmol) in eine Petrischale (Durchmesser 14 cm) eingewogen und in 50 mL Reinstwasser gelöst. Das molare Verhältnis zwischen Dipeptid und Glucose ist somit 1 zu 6. Zu dieser Lösung werden 25 g mikrokristalline Cellulose gegeben. Anschließend wurde aus der homogenen Mischung das Wasser mittels Gefriertrocknung entfernt. Der trockene Ansatz wurde für 20 min bei 120 °C inku-

biert. Die Extraktion der Reaktionsprodukte erfolgte mit 150 mL Reinstwasser für eine Stunde. Der Extrakt wurde mit einer Fritte vom Feststoff abgetrennt und am Vakuum eingengt.

Die Synthese von Fru-Val-His wurde analog der Synthese von Fru-Val-Leu durchgeführt. Es wurden 292,6 mg Val-His (1,15 mmol) mit 1,2431 g D-Glucose (6,9 mmol) umgesetzt.

#### *Synthese von Fructosylvalylserin (Fru-Val-Ser), Fructosylvalyltyrosin (Fru-Val-Tyr) und Fructosylvalylglutaminsäure (Fru-Val-Glu)*

Zur Synthese der Amadori-Produkte der Dipeptide Val-Ser, Val-Tyr und Val-Glu wurde das Verfahren wie zur Synthese von Fru-Val-Leu, aber kleinere Reaktionsansätze, angewendet. Für Fru-Val-Ser wurden 57,0 mg Val-Ser (0,28 mmol) mit 334 mg D-Glucose (1,85 mmol), für Fru-Val-Tyr wurden 70,1 mg Val-Tyr (0,25 mmol) mit 305 mg D-Glucose (1,69 mmol) und für Fru-Val-Glu wurden 61,6 mg Val-Glu (0,27 mmol) mit 326 mg D-Glucose (1,81 mmol) umgesetzt. Das molare Verhältnis der Edukte war etwa 1 zu 6 (Dipeptid zu Glucose). Diese wurden in 10 mL Reinstwasser gelöst und mit 5 g mikrokristalliner Cellulose vermischt. Anschließend wurde aus der homogenen Mischung das Wasser mittels Gefriertrocknung entfernt. Der trockene Ansatz wurde für 20 min bei 120 °C inkubiert. Die Extraktion der Reaktionsprodukte erfolgte mit 30 mL Reinstwasser für eine Stunde. Der Extrakt wurde dekandiert. Es wurde zweifach mit 10 mL nachgewaschen und die vereinten Lösungen durch einen Spritzenvorsatzfilter von restlichen Partikeln getrennt und am Vakuum eingengt.

#### *Isolierung von Fru-Val, Fru-Val-Leu, Fru-Val-His, Fru-Val-Ser, Fru-Val-Tyr und Fru-Val-Glu*

Als erster Schritt der Reinigung der Fructosylderivate wurde überschüssige Glucose mittels IEC (Entzuckerung, Abschnitt 3.4.2) entfernt. Die eingengten Reaktionsansätze wurden in 50 mL Reinstwasser aufgenommen, der pH-Wert mit Salzsäure auf  $\leq 3$  eingestellt und die Lösung auf einen Kationenaustauscher aufgetragen. Die Glucose wurde mit Reinstwasser von der Säule gewaschen und die gebundenen Substanzen mit 4 M Salzsäure eluiert. Die Salzsäure wurde am Wasserstrahlvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Reinstwasser aufgenommen und nach Tüpfeltest (Abschnitt 3.3.5) mittels Detektion mit ethanolischer Schwefelsäure (Tabelle 3-11) darauf geprüft, ob die Zucker erfolgreich entfernt wurden. Das Reinstwasser wurde erneut am Vakuum entfernt.

Die entzuckerten Rückstände wurden im Fließmittel für die Flash-Chromatographie aufgenommen und wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben auf die mit Kieselgel gefüllte Trennsäule aufgetragen, unmittelbar eluiert und fraktioniert. Die Methode wurde in Anlehnung an *Theis et al. (2008)* entwickelt (*Theis et al., 2008*). Die Säulendimension und die verwendete Menge Kieselgel sind in Tabelle 3-4 angegeben. Für die Trennungen bei der Flash-Chromatographie und der Dünnschichtchromatographie wurde für das jeweilige Präparat das gleiche Fließmittelsystem verwendet. Die Fließmittelsysteme sind in Tabelle 3-4 angegeben. Die Fraktionen wurden mittels Tüpfeltest (Abschnitt 3.3.5) untersucht und die relevanten Fraktionen über die Dünnschichtchromatographie (Abschnitt 3.3.6) identifiziert. Die Detektion erfolgte mit

Ninhydrin bzw. TTC (Tabelle 3-11). Fraktionen, die ausschließlich das Reaktionsprodukt enthielten, wurden vereint und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in wenig Reinstwasser aufgenommen und für die Charakterisierung gefriergetrocknet.

Tabelle 3-4: Fraktionierung der Syntheseansätze der Fructosylderivate mittels Flash-Chromatographie

Synthese	FM <sup>b</sup>	Flash-Chromatographie		R <sub>F</sub> -Wert bei Dünnschichtchromatographie
		Säulendimension [cm] Kieselgel <sup>c</sup> [g]	Elution Produkt [mL]	
N- $\alpha$ -Fructosylvalin (Fru-Val)	1	3,0 x 50, 100	240 bis 400	0,44 (Val); 0,27 (Fru-Val)
N- $\alpha$ -Fructosylvalylleucin (Fru-Val-Leu) <sup>a</sup>	2	3,0 x 50, 140	260 bis 320	0,50 (Val-Leu); 0,79 (Fru-Val-Leu)
N- $\alpha$ -Fructosylvalylhistidin (Fru-Val-His) <sup>a</sup>	3	3,0 x 50, 140	220 bis 350	0,27 (Val-His); 0,57 (Fru-Val-His)
N- $\alpha$ -Fructosylvalylserin (Fru-Val-Ser) <sup>a</sup>	2	2,5 x 20, 70	55 bis 95	0,27 (Val-Ser); 0,64 (Fru-Val-Ser)
N- $\alpha$ -Fructosylvalyltyrosin (Fru-Val-Tyr) <sup>a</sup>	2	2,5 x 20, 70	60 bis 75	0,52 (Val-Tyr); 0,90 (Fru-Val-Tyr)
N- $\alpha$ -Fructosylvalyl- glutaminsäure (Fru-Val-Glu) <sup>a</sup>	2	2,5 x 20, 70	60 bis 95	0,23 (Val-Glu); 0,54 (Fru-Val-Glu)

<sup>a</sup> Synthese und Isolierung von *Tina Müller* in der wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt (*Müller, 2012*); <sup>b</sup> Abschnitt 3.3.6 Tabelle 3-10; <sup>c</sup> Kieselgel 60 (Partikelgröße: 0,063-0,200 mm).

Abweichend wurden bei der Isolierung von Fru-Val-Ser, Fru-Val-Tyr und Fru-Val-Glu alle Fraktionen der Flash-Chromatographie, die das Amadori-Produkt enthielten, vereint, auch wenn zum Teil eine Überschneidung mit der Bande des Dipeptids vorlag. Wegen der relativ kleinen Ansätze war das Ziel die maximale Ausbeute für das Amadori-Produkt zu erzielen. Für die Bestimmung des Umsatzes der jeweiligen Amadori-Produkte bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure zu FM-Val war die Verunreinigung mit Dipeptid kein Nachteil (*Penndorf et al., 2007; Wellner et al., 2011*). Die Gehalte der Präparate der Amadori-Produkte wurden mittels HPLC-CLND (Abschnitt 3.3.8) bestimmt.

## Analytische Daten

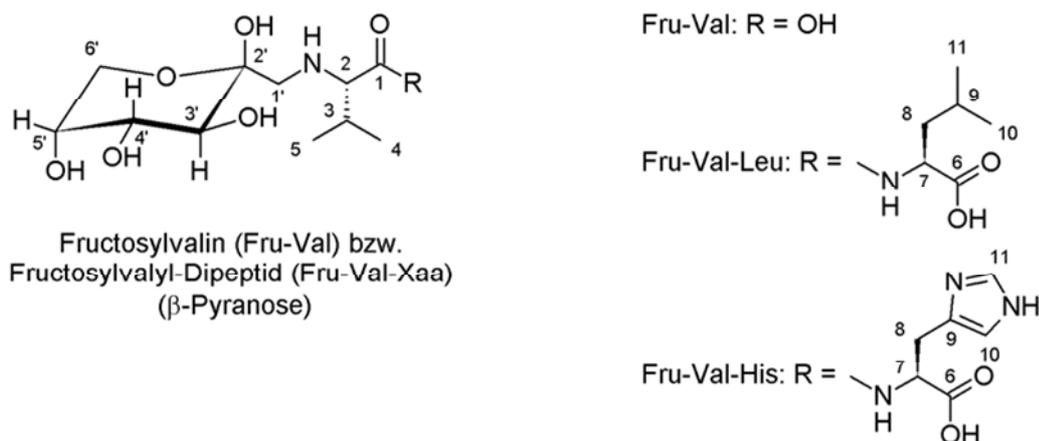


Abbildung 3-1: Strukturen von Fru-Val und Fru-Val-Xaa.

**Fructosylvalin 1 (Fru-Val). Summenformel:**  $C_{11}H_{21}NO_7$  ( $M = 279,29$  g/mol). **ESI-MS<sup>a</sup>:**  $m/z = 280,2$  ( $[M+H]^+$ ). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ /ppm ( $\beta$ -Pyranose): 0,89 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-4); 0,96 (3H, d,  $^3J = 7,0$  Hz, H-5); 2,17 (1H, o,  $^3J = 2,6$  Hz,  $^3J = 6,9$  Hz, H-3); 3,18 (1H, d,  $^2J = 13,0$  Hz, H-1'A); 3,21 (1H, d,  $^2J = 12,8$  Hz, H-1'B); 3,53 (1H, d,  $^3J = 4,2$ , H-2); 3,62-3,66 (1H, m, H-6'A); 3,65 (1H, d,  $^3J = 9,9$  Hz, H-3'); 3,78 (1H, dd,  $^3J = 3,3$  Hz,  $^3J = 9,9$  Hz, H-4'); 3,88-3,92 (2H, m, H-5' und H-6'B). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ /ppm ( $\beta$ -Pyranose): 16,73 (C-4); 18,35 (C-5); 28,91 (C-3); 53,21 (C-1'); 63,73 (C-6'); 68,76 (C-5'); 68,92 (C-2); 69,18 (C-4'); 69,99 (C-3'); 95,13 (C-2'); 172,19 (C-1). **Gehalt<sup>b</sup>:** 46,1% (CLND). **Ausbeute<sup>c</sup>:** 307,4 mg; leicht bräunlicher Feststoff.

**Fructosylvalylleucin 3 (Fru-Val-Leu). Summenformel:**  $C_{17}H_{32}N_2O_8$  ( $M = 392,44$  g/mol). **ESI-MS<sup>a</sup>:**  $m/z = 393,2$  ( $[M+H]^+$ ). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ /ppm ( $\beta$ -Pyranose): 0,80 (3H, d,  $^3J = 5,9$  Hz, H-10); 0,83 (3H, d,  $^3J = 5,9$  Hz, H-11); 0,92 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-4); 1,01 (3H, d,  $^3J = 7,0$  Hz, H-5); 1,52 (3H, m, H-8 und H-9); 2,20 (1H, o,  $^3J = 6,8$  Hz, H-3); 3,10 (1H, d,  $^2J = 13,0$  Hz, H-1'A); 3,14 (1H, d,  $^2J = 13,2$  Hz, H-1'B); 3,59 (1H, d,  $^3J = 9,9$  Hz, H-3'); 3,63 (1H, dd,  $^3J = 2,0$  Hz,  $^2J = 13,0$  Hz, H-6'A); 3,77 (1H, dd,  $^3J = 3,4$  Hz,  $^3J = 9,8$  Hz, H-4'); 3,84 (1H, d,  $^3J = 5,5$ , H-2); 3,88-3,90 (2H, m, H-5' und H-6'B); 4,18 (1H, m, H-7). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ /ppm ( $\beta$ -Pyranose): 16,77 (C-4); 17,85 (C-5); 20,65 (C-10); 22,25 (C-11); 24,44 (C-9); 29,71 (C-3); 40,17 (C-8); 52,34 (C-1'); 54,16 (C-7); 63,81 (C-6'); 66,37 (C-2); 68,74 (C-5'); 69,11 (C-4'); 69,89 (C-3'); 95,27 (C-2'); 166,80 (C-1), 178,75 (C-6). **Gehalt<sup>b</sup>:** 37,4% (CLND). **Ausbeute<sup>c</sup>:** 88,7 mg; leicht bräunlicher Feststoff.

**Fructosylvalylhistidin 4 (Fru-Val-His). Summenformel:**  $C_{17}H_{28}N_4O_8$  ( $M = 416,19$  g/mol). **ESI-MS<sup>a</sup>:**  $m/z = 417,2$  ( $[M+H]^+$ ). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ /ppm ( $\beta$ -Pyranose): 0,72 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-4); 0,73 (3H, d,  $^3J = 6,8$  Hz, H-5); 1,73 (1H, o,  $^3J = 6,7$  Hz, H-3); 2,46 (1H, d,  $^2J = 12,9$ , H-1'A); 2,52 (1H, d,  $^2J = 12,9$ , H-1'B); 2,85 (1H, dd,  $^3J = 9,8$  Hz,  $^2J = 15,2$  Hz, H-8A); 2,86 (1H, d,  $^3J = 6,5$  Hz, H-2); 3,06 (1H, dd,  $^3J = 4,6$  Hz,  $^2J = 15,0$  Hz, H-8B); 3,52-3,59 (1H, m, H-6'A); 3,55 (1H, d,  $^3J = 10,0$  Hz, H-3'); 3,74 (1H, dd,  $^3J = 3,6$  Hz,  $^3J = 10,0$  Hz,

H-4'); 3,86-3,99 (2H, m, H-6'B und H-5'), 4,40 (1H, dd,  $^3J = 4,6$  Hz,  $^3J = 9,7$  Hz, H-7); 6,88 (1H, m, H-10); 7,69 (1H, m, H-11).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta/\text{ppm}$  ( $\beta$ -Pyranose): 17,79 (C-4); 18,14 (C-5); 28,96 (C-8); 30,90 (C-3); 54,61 (C-7); 62,30 (C-1'); 63,20 (C-6'); 68,29 (C-5'); 69,01 (C-4'); 69,55 (C-3'); 74,48 (C-2); 97,55 (C-2'); 117,85 (C-10); 132,43 (C-9), 135,24 (C-11); 175,38 (C-1); 177,56 (C-6). **Gehalt<sup>b</sup>**: 84,1% (CLND). **Ausbeute<sup>c</sup>**: 132,4 mg; leicht bräunlicher Feststoff.

**Fructosylvalylserin 4 (Fru-Val-Ser)**. **ESI-MS<sup>a</sup>**:  $m/z = 367$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ). **Gehalt<sup>b</sup>**: 78,0% (CLND). **Auswaage<sup>c</sup>**: 32,1 mg; leicht bräunlicher Feststoff.

**Fructosylvalyltyrosin 4 (Fru-Val-Tyr)**. **ESI-MS<sup>a</sup>**:  $m/z = 443$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ). **Gehalt<sup>b</sup>**: 35,2% (CLND). **Auswaage<sup>c</sup>**: 17,8 mg; leicht bräunlicher Feststoff.

**Fructosylvalylglutaminsäure 4 (Fru-Val-Glu)**. **ESI-MS<sup>a</sup>**:  $m/z = 409$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ). **Gehalt<sup>b</sup>**: 31,1% (CLND). **Auswaage<sup>c</sup>**: 11,9 mg; leicht bräunlicher Feststoff.

<sup>a</sup> Überprüfung der Identität zusätzlich über Fragmentierungsmuster mittels ESI-MS/MS (Abschnitt 4.1.1); <sup>b</sup> Bestimmt mittels CLND (Abschnitt 3.3.8); <sup>c</sup> inklusive Verunreinigung durch Dipeptid

### 3.2.2 Synthese von Furoylmethylvalin (FM-Val)

#### Synthese von *N*- $\alpha$ -Furoylmethylvalin (FM-Val)

Für die Synthese von FM-Val wurde als Vorstufe die Synthese für Fru-Val angewendet. Dazu wurden 234,2 mg (2,00 mmol) L-Valin mit 2,1647 g (12 mmol) D-Glucose in 200 mL Methanol für 3 h bei 90 °C unter Rückfluss umgesetzt. Das Methanol wurde am Vakuum entfernt, der Rückstand in 20 mL Reinstwasser aufgenommen und die Lösung direkt zur Umsetzung des Fru-Val zu FM-Val in 8 M Salzsäure verwendet. Nach Zusatz von 40 mL 12 M Salzsäure wurde die Mischung für 23 h bei 110 °C unter Rückfluss erhitzt. Bei der Umsetzung sind erhebliche Mengen schwarzer Feststoff entstanden, der über einen Faltenfilter abgetrennt wurde. Das Retentat wurde an der Wasserstrahlpumpe unter mehrmaligem Aufnehmen des Rückstands zur Trockne eingeengt, um die Salzsäure quantitativ zu entfernen. Nach aufnehmen in Reinstwasser und Membranfiltration wurde FM-Val mittels semipräparativer RP-HPLC (3.4.3) isoliert. Als Fließmittel wurden 0,5% Ameisensäure in Wasser und 0,5% Ameisensäure in Methanol verwendet. Der Gradient ist in Tabelle 3-5 dokumentiert.

Tabelle 3-5: Parameter semipräparative RP-HPLC zur Isolierung von FM-Val

Präparat	Fluss [mL/min]	Gradient <sup>a</sup>								UV	Elutionszeit
										[nm] <sup>b</sup>	[min]
FM-Val	4,0	Zeit [min]	0	24	25	33	34	40	280	16,3-20,8	
		Anteil FM B [%]	05	16	95	95	05	05			

<sup>a</sup> FM = Fließmittel A: 0,5% Ameisensäure in Wasser, Fließmittel B: 0,5% Ameisensäure in Methanol; <sup>b</sup> Detektionswellenlänge.

## Analytische Daten

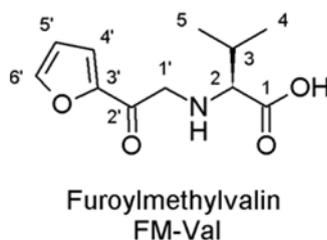


Abbildung 3-2: Struktur von FM-Val.

**Furoylmethylvalin 2 (FM-Val).** (Abbildung 3-1) **ESI-MS:**  $m/z = 226,1$  ( $[M+H]^+$ ).  **$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 0,98 (3H, d,  $^3J = 7,0$  Hz, H-4); 0,98 (3H, dd,  $^3J = 6,9$  Hz, H-5); 2,24 (1H, o,  $^3J = 2,8$  Hz,  $^3J = 7,0$  Hz, H-3); 3,51 (1H, d,  $^3J = 4,2$ , H-2); 4,52 (1H, d,  $^2J = 17,8$  Hz, H-1'A); 4,47 (1H, d,  $^2J = 17,8$  Hz, H-1'B); 6,63 (1H, dd,  $^3J = 1,7$  Hz,  $^3J = 3,8$  Hz, H-5'); 7,45 (1H, d,  $^3J = 3,7$  Hz, H-4'); 7,77 (1H, d,  $^3J = 1,4$  Hz, H-6').  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 17,31 (C-4); 17,76 (C-5); 29,16 (C-3); 50,76 (C-1'); 68,43 (C-2); 113,13 (C-5'); 121,66 (C-4'); 148,90 (C-3'); 149,65 (C-6'); 172,24 (C-1); 180,56 (C-2'). **Elementaranalyse:**  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_4$  ( $M = 225,24$  g/mol) erfordert: C = 58,66%, H = 6,71%, N = 6,22%, C/N = 9,43; gefunden: C = 54,40%, H = 6,32%, N = 5,14%, C/N = 10,58. **Gehalt:** 82,6% (bezogen auf den Stickstoffgehalt). **RP-HPLC-UV:** chromatographische Reinheit > 99% (Methode für Modellbackwaren, Abschnitt 3.3.9). **Ausbeute:** 25,4 mg (5,64%); weißer Feststoff.

### 3.2.3 Synthese von 2(1H)-Pyrazinonen

#### Synthese der GO-Val-Leu- und GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinone

Die Synthese wurde von *Daniela Amon* in ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit in Anlehnung an die Methode nach *Krause et al. (2004)* durchgeführt (*Amon, 2010*). Für die Synthese des GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons wurden 533,7 mg (2,00 mmol) Val-Leu · HCl in 20 bis 25 mL 0,1 M Phosphat-Puffer (pH = 7,4) gelöst. Zu dieser Lösung wurden über 5 Tage zweimal täglich 23,9  $\mu\text{L}$  einer 40%igen Glyoxal-Lösung pipettiert, so dass am Ende ein molares Verhältnis von Val-Leu zu Glyoxal von 2 zu 2,1 vorlag. Der pH-Wert wurde täglich auf pH = 7,4 korrigiert. Die Reaktion wurde bei 37 °C für insgesamt 14 Tage durchgeführt. Am Ende der Reaktionszeit wurde das Volumen der Lösung am Vakuumrotationsverdampfer auf ca. 10 mL reduziert. Nach Zusatz von 1,0 mL Essigsäure und Filtration durch einen Spritzenvorsatzfilter wurde die aufkonzentrierte Lösung zur Isolierung des GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons mittels semipräparativer RP-HPLC eingesetzt.

Die Synthese des GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinons erfolgte in gleicher Weise, wobei 510,3 mg (2,01 mmol) Val-His eingesetzt wurden.

#### Synthese der MGO-Val-Leu- und MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinone

Die Synthese wurde von *Rico Losinski* in seiner wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt (*Losinski, 2012*). 1,25 g (4,7 mmol) Val-Leu · HCl wurden in 12,5 mL 0,2 M Borsäure-

Puffer (pH = 9) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 3,618 mL einer 40%igen Methylglyoxal-Lösung (23,5 mmol) pipettiert, so dass am Ende ein molares Verhältnis von Val-Leu zu Methylglyoxal von 1 zu 5 vorlag. Der pH-Wert wurde nochmals auf pH = 9,0 korrigiert und die Lösung auf 25 mL aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit 12,1 g mikrokristalliner Cellulose gemischt und lyophilisiert. Der Umsatz erfolgte bei 185 °C für 30 Minuten. Nachdem der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde dreifach mit 180 ml Reinstwasser extrahiert. Das Volumen der vereinten Extraktionslösungen wurde am Vakuumrotationsverdampfer auf ca. 100 mL eingengt. Die verbleibende Lösung wurde mit 6 M Salzsäure auf pH = 1,0 eingestellt und im Scheidetrichter viermal mit 150 mL Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden zur Trockne eingengt und der Rückstand zur weiteren Isolierung des Produktes mittels semipräparativer RP-HPLC in 20 mL Methanol/Wasser (50/50, v/v) aufgenommen.

Für die Synthese des MGO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons wurden die gleichen Arbeitsschritte durchgeführt. Abweichend wurden 438,3 mg (1,72 mmol) Val-His in 5 mL 0,2 M Borsäure-Puffer glöst und 1,35 mL der 40%igen Methylglyoxal-Lösung (8,61 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde mit 8 g Kieselgel vermischt und bei 190 °C für 10 Minuten erhitzt.

#### *Synthese der GO-Val-Ser-, GO-Val-Tyr- und GO-Val-Glu-2(1H)-Pyrazinone*

Die Synthese wurde von *Xiaofei Ren* in ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit in Anlehnung an die Methode nach *Krause et al. (2004)* durchgeführt (*Ren, 2011*). 408,44 mg (1,81 mmol) Val-Ser wurden in 20 bis 25 mL 0,1 M Phosphat-Puffer (pH = 7,4) gelöst. Zu dieser Lösung wurden über 5 Tage zweimal täglich 28,6 µL einer 40%igen Glyoxal-Lösung pipettiert, so dass am Ende ein molares Verhältnis von Val-Leu zu Glyoxal von etwa 1,8 zu 2,5 vorlag. Der pH-Wert wurde täglich auf pH = 7,4 korrigiert. Die Reaktion wurde bei 37 °C für insgesamt 14 Tage durchgeführt. Am Ende der Reaktionszeit wurde das Volumen der Lösung am Vakuumrotationsverdampfer auf ca. 12 mL reduziert und für die Isolierung des Produktes mittels semipräparativer HPLC verwendet.

Zur Synthese des GO-Val-Tyr-2(1*H*)-Pyrazinons wurden 560,64 mg (1,85 mmol) Val-Tyr eingesetzt und ansonsten das gleiche Verfahren genutzt.

Die Synthese des GO-Val-Glu-2(1*H*)-Pyrazinons wurde analog mit 492,52 mg (1,83 mmol) Val-Glu durchgeführt, aber die Isolierung des Reaktionsprodukts erfolgte mittels Anionenaustauscherchromatographie.

#### *Isolierung mittels semipräparativer HPLC*

Die Isolierung erfolgte mittels semipräparativer RP-HPLC mit den in Abschnitt 3.4.3 bzw. Tabelle 3-6 beschriebenen Parametern. Als Fraktion wurde der Peak aufgefangen, der sowohl bei 220 nm also auch 280 nm eine starke Absorption zeigt und es wurde darauf geachtet, dass keine Überschneidung mit dem Peak des Dipeptids vorlag. Nach der Fraktionierung wurden die vereinten Fraktionen des jeweiligen Präparats am Vakuum zur Trockne eingengt. Der trockene Rückstand wurde in Reinstwasser aufgenommen, auf Geruch nach Essigsäure

geprüft und erneut zur Trockne eingengt. Dieser Prozess wurde wiederholt, bis keine Essigsäure mehr wahrnehmbar war. Der Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Da nach der ersten Reinigung des GO-Val-Tyr-Präparats noch Nebenprodukte im ESI-TOF-MS erkennbar waren, wurde eine zweite Fraktionierung mit einem modifizierten Gradienten durchgeführt. Der trockene Rückstand nach der zweiten Fraktionierung war schlecht wasserlöslich und wurde deshalb in Ethanol aufgenommen. Die ethanolische Lösung wurde in ein Rollrandglas überführt, der Ethanol unter Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand für die Gefriertrocknung in Wasser suspendiert.

Tabelle 3-6: Parameter semipräparative RP-HPLC zur Isolierung von 2(1H)-Pyrazinonen

Präparat	Fluss [ml/min]	Gradient <sup>a</sup>	UV [nm] <sup>b</sup>	Elutionszeit [min]
GO-Val-Leu-Pyrazinon	6,0	isokratisch, 55% FM B, ohne Spülschritt	320	11,9 bis 15,2
GO-Val-His-Pyrazinon	3,5	Zeit [min]      0   15   17   18   30 Anteil FM B [%]   5   50   50   5   5	320	12,6 bis 14,9
MGO-Val-Leu-Pyrazinon	4,0	Zeit [min]      0   50   51   65   66   75 Anteil FM B [%] <sup>c</sup> 65   65   95   95   65   65	220	31 bis 35
MGO-Val-His-Pyrazinon	3,5	Zeit [min]      0   40   41   51   52   65 Anteil FM B [%]   10   40   90   90   10   10	220	25 bis 29
GO-Val-Ser-Pyrazinon	3,5	Zeit [min]      0   30   31   36   37   45 Anteil FM B [%]   10   33   95   95   10   10	320	8,5 bis 15
GO-Val-Tyr-Pyrazinon	3,5	Zeit [min] <sup>d</sup> 0   30   31   32   39 Anteil FM B [%]   30   70   80   30   30	320	25 bis 32
	3,5	Zeit [min] <sup>e</sup> 0   20   21   22   23   29 Anteil FM B [%]   50   70   80   80   50   50	320	

<sup>a</sup> FM = Fließmittel; <sup>b</sup> Detektionswellenlänge; <sup>c</sup> isokratische Elution mit angeschlossenen Spülschritt; <sup>d</sup> Fraktionierung 1; <sup>e</sup> Fraktionierung 2 (nur GO-Val-Tyr-2(1H)-Pyrazinon).

### Isolierung des GO-Val-Glu-Pyrazinons mittels IEC

Die Isolierung des GO-Val-Glu-2(1H)-Pyrazinons wurde in Anlehnung an Van Chuyen *et al.* (1973c) mittels IEC, wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, durchgeführt. Die Elution erfolgte mit einem Acetat-Gradienten (Essigsäure) der Konzentrationen 0,5 M, 1,0 M, 1,5 M und 2,0 M. Val-Glu eluierte mit 0,5 M Essigsäure. Zur Identifizierung der Fraktionen wurde der Tüpfeltest (Abschnitt 3.3.5) verwendet und unter einer UV-Lampe mit der Anregungswellenlänge 366 nm detektiert. Zur Bestätigung wurden ausgewählte Fraktionen mittels direkter Massenspektrometrie untersucht (3.3.3). Da das GO-Val-Glu-2(1H)-Pyrazinon noch nicht eluiert war, wurde mit 4,0 M, 5,0 M Essigsäure, 5,0 M Essigsäure mit 3% Ethanol, 6,0 M Essigsäure mit 8% Ethanol und schließlich 6,0 M Essigsäure mit 20% Ethanol weiter eluiert. Mit dem letzten Elutionsmittel eluierte das GO-Val-Glu-2(1H)-Pyrazinon. Fraktionen die ausschließlich das gesuchte Reaktionsprodukt enthielten wurden vereint und am Vakuum mehrfach eingengt und in Wasser aufgenommen, bis der Geruch nach Essig nicht mehr

erkennbar war. Anschließend wurde der Rückstand in wenig Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Die pulvrige, weiße Substanz wurde zur weiteren Charakterisierung verwendet.

#### Analytische Daten

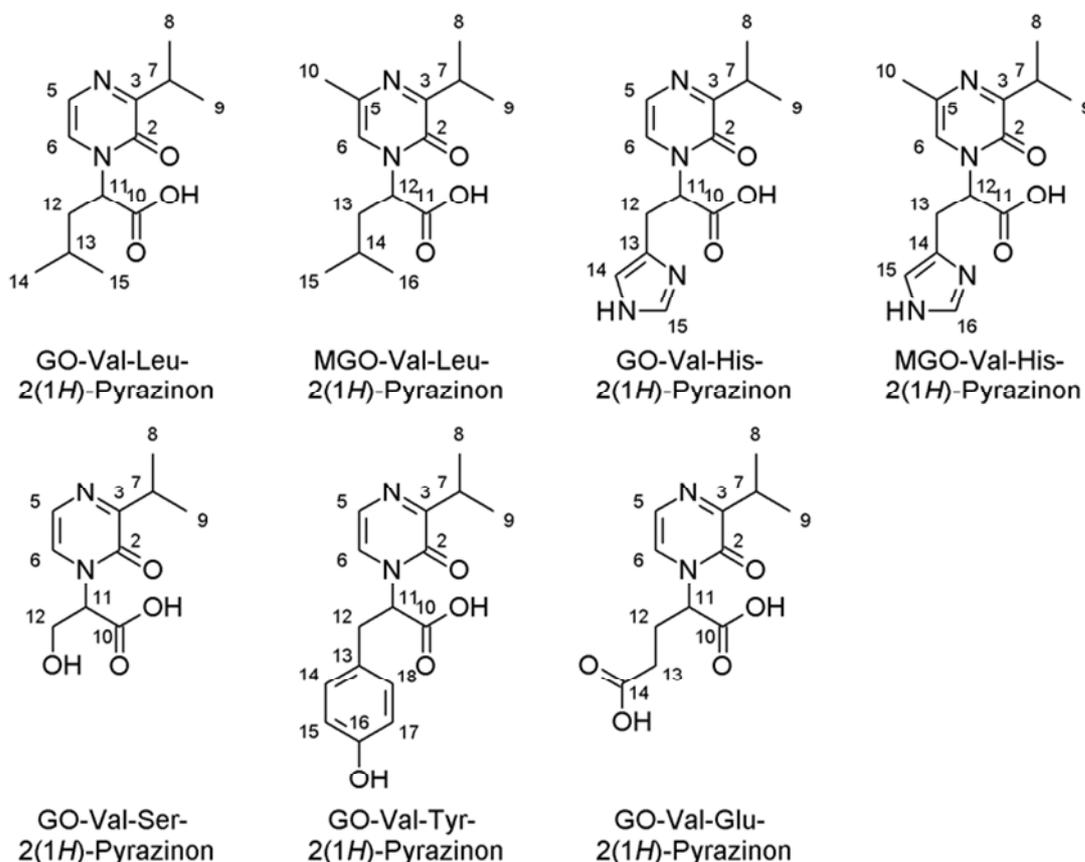


Abbildung 3-3: Strukturen der 2(1H)-Pyrazinone abgeleitet von Glyoxal bzw. Methylglyoxal und Dipeptiden der Struktur Val-Xaa.

**3-(4-Methyl-2-[2-oxo-3-(propan-2-yl)pyrazin-1(2H)-yl]pentansäure (GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon).** ESI-MS:  $m/z = 253,1$  ( $[M+H]^+$ ).  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 0,77 (3H, d,  $^3J = 6,4$  Hz, H-14); 0,79 (3H, d,  $^3J = 6,6$  Hz, H-15); 1,09 (3H, d,  $^3J = 7,1$  Hz, H-8); 1,05 (3H, d,  $^3J = 7,1$  Hz, H-9); 1,58 (1H, m, H-13); 1,88 (1H, m, H-12A); 1,93 (1H; dd,  $^2J = 11,3$  Hz,  $^3J = 4,8$  Hz, H-12B); 3,31 (1H, m, H-7); 5,23 (1H; dd,  $^3J = 11,1$  Hz,  $^3J = 4,8$  Hz, H-11); 7,31 (1H, d,  $^3J = 4,6$  Hz, H-5), 7,39 (1H, d,  $^3J = 4,6$  Hz, H-6).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 17,18 (C-8); 19,24 (C-9); 20,15 (C-14); 22,07 (C-15); 24,13 (C-13); 29,88 (C-7); 38,23 (C-12); 65,54 (C-11); 123,32 (C-5); 126,43 (C-6); 156,54 (C-3); 164,14 (C-2); 176,14 (C-10).  
**Elementaranalyse:**  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$  ( $M = 252,31$  g/mol) erfordert: C = 61,88%, H = 7,99%, N = 11,10%, C/N = 5,57; gefunden: C = 56,46%, H = 7,98%, N = 10,57%, C/N = 5,34. **Gehalt:** 95,2% (bezogen auf den Stickstoffgehalt). **RP-HPLC-UV/FLD:** chromatographische Reinheit > 99% (Abschnitt 3.3.10). **Ausbeute:** 46,9 mg (9,3%); weißer Feststoff.

**4-Methyl-2-[5-methyl-2-oxo-3-(propan-2-yl)pyrazin-1(2H)-yl]pentansäure (MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon).** ESI-MS:  $m/z = 267,2$  ( $[M+H]^+$ ).  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 0,71 (3H, d,  $^3J = 6,6$  Hz, H-15); 0,82 (3H, d,  $^3J = 6,6$  Hz, H-16); 1,04 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-

8); 1,05 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-9); 1,41 (1H, n,  $^3J = 6,6$  Hz, H-14); 1,79 (1H, dt<sup>a</sup>,  $^2J = 14,6$  Hz, H-13A); 2,09 (1H, dt<sup>a</sup>,  $^2J = 14,5$  Hz, H-13B); 2,31 (3H, s, H-10); 3,22 (1H, septett,  $^3J = 6,9$  Hz, H-7); 4,70-4,74<sup>b</sup> (H-12); 7,18 (1H, s, H-6). **Elementaranalyse:** C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M = 266,34 g/mol) erfordert: C = 63,13%, H = 8,33%, N = 10,52%, C/N = 6,00; gefunden: C = 60,92%, H = 8,21%, N = 8,87%, C/N = 6,87. **Gehalt:** 84,3% (bezogen auf den Stickstoffgehalt). **RP-HPLC-UV/FLD:** chromatographische Reinheit > 99% (Abschnitt 3.3.10). **Ausbeute:** 31,2 mg (2,5%); weißer Feststoff.

<sup>a</sup> Zwei überlagerte Triplets (nicht ausreichend aufgelöst, um  $^3J$  zu bestimmen); <sup>b</sup> vermutlich überlagert mit dem Signal für Wasser.

**3-(1H-Imidazol-4-yl)-2-[2-oxo-3-(propan-2-yl)pyrazin-1(2H)-yl]-propansäure (GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon).** **ESI-MS:** m/z = 277,1 ([M + H]<sup>+</sup>). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 0,96 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-8); 1,04 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-9); 3,20 (1H, septett,  $^3J = 6,9$  Hz, H-7); 3,31 (1H, dd,  $^2J = 14,8$  Hz,  $^3J = 5,2$  Hz, H-12A); 3,54 (1H, dd,  $^2J = 14,4$  Hz,  $^3J = 10,6$  Hz, H-12B); 5,34 (1H, dd,  $^3J = 10,4$  Hz,  $^3J = 5,2$  Hz, H-11); 6,95 (1H, s, H-14); 7,22 (1H, d,  $^3J = 4,6$  Hz, H-5), 7,24 (1H, d,  $^3J = 4,6$  Hz, H-6), 8,45 (1H, s, H-15). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 18,92 (C-8); 19,23 (C-9); 26,08 (C-12); 29,97 (C-7); 61,28 (C-11); 116,66 (C-14); 123,24 (C-5); 126,56 (C-6); 129,03 (C-13); 133,32 (C-15); 155,92 (C-3); 164,38 (C-2); 172,87 (C-10). **Elementaranalyse:** C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (M = 276,29 g/mol) erfordert: C = 56,51%, H = 5,84%, N = 20,28%, C/N = 2,79; gefunden: C = 52,76%, H = 6,03%, N = 18,44%, C/N = 2,86. **Gehalt:** 90,9% (bezogen auf den Stickstoffgehalt). **RP-HPLC-UV/FLD:** chromatographische Reinheit > 99% (Abschnitt 3.3.10). **Ausbeute:** 132,9 mg (24,1%); weißer Feststoff.

**3-(1H-imidazol-4-yl)-2-[5-methyl-2-oxo-3-(propan-2-yl)pyrazin-1(2H)-yl]propansäure (MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon).** **ESI-MS:** m/z = 291,1 ([M + H]<sup>+</sup>). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 0,92 (3H, d,  $^3J = 7,0$  Hz, H-8); 0,96 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-9); 3,03 (1H, dd,  $^2J = 15,4$  Hz,  $^3J = 9,1$  Hz, H-13A); 3,23 (2H, m, H-7 und H-13B); 3,54 (3H, s, H-10); 4,43 (1H,  $^3J = 9,0$  Hz,  $^3J = 4,8$  Hz, H-12); 7,03 (1H, s, H-6); 7,16 (1H, m, H-15); 8,48 (1H, m, H-16). **Elementaranalyse:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (M = 290,32 g/mol) erfordert: C = 57,92%, H = 6,25%, N = 19,30%, C/N = 3,00; gefunden: C = 49,41%, H = 5,68%, N = 15,11%, C/N = 3,27. **Gehalt:** 78,3% (bezogen auf den Stickstoffgehalt). **RP-HPLC-UV/FLD:** chromatographische Reinheit > 99% (Abschnitt 3.3.10). **Ausbeute:** 64,0 mg (12,8%); weißer Feststoff.

**3-hydroxy-2-[2-oxo-3-(propan-2-yl)pyrazin-1(2H)-yl]propansäure (GO-Val-Ser-2(1H)-Pyrazinon).** **ESI-MS:** m/z = 227,1 ([M + H]<sup>+</sup>). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 1,08 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-8); 1,09 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-9); 3,31 (1H, septett,  $^3J = 6,9$  Hz, H-7); 4,08 (1H, d,  $^3J = 5,6$  Hz, H-12A); 4,09 (1H, d,  $^3J = 7,3$  Hz, H-12B); 5,13 (1H, dd,  $^3J = 7,1$  Hz,  $^3J = 5,7$  Hz, H-11); 7,28 (1H, d,  $^3J = 4,6$  Hz, H-5); 7,41 (1H, d,  $^3J = 4,6$  Hz, H-6). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 21,83 (C-8); 21,87 (C-9); 32,39 (C-7); 62,43 (C-12); 66,74 (C-11); 125,56 (C-5); 129,93 (C-6); 159,23 (C-3); 166,74 (C-2); 174,94 (C-10). **Elementaranalyse:** C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = 226,23 g/mol) erfordert: C = 53,09%, H = 6,24%, N = 12,38%, C/N = 4,29; gefunden: C = 43,40%, H = 4,99%, N = 11,73%, C/N = 3,70. **Gehalt:** 94,7% (bezogen

auf den Stickstoffgehalt). **RP-HPLC-UV/FLD:** chromatographische Reinheit > 99% (Abschnitt 3.3.10). **Ausbeute:** 112,0 mg (24,8%); weißer Feststoff.

**3-(4-hydroxyphenyl)-2-[2-oxo-3-(propan-2-yl)pyrazin-1(2H)-yl]propansäure (GO-Val-Tyr-2(1H)-Pyrazinon).** **ESI-MS:**  $m/z = 303,1$  ( $[M + H]^+$ ). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 1,02 (3H, d,  $^3J = 6,8$  Hz, H-8); 1,08 (3H, d,  $^3J = 6,8$  Hz, H-9); 3,25 (1H, septett<sup>a</sup>,  $^3J = 6,8$  Hz, H-7); 3,25-3,50<sup>b</sup> (2H, m, H-12); 5,28 (1H, dd,  $^3J = 11,0$  Hz,  $^3J = 5,5$  Hz, H-11); 6,54 (2H, d,  $^3J = 8,5$  Hz, H-15 + H-17); 6,84 (2H, d,  $^3J = 8,5$  Hz, H-14 + H-18); 7,08 (1H, d,  $^3J = 4,4$  Hz, H-5); 7,27 (1H, d,  $^3J = 4,5$  Hz, H-6); 9,21 (1H, s, C(16)-OH). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm): 19,82 (C-8); 20,00 (C-9); 29,86 (C-7); 33,25 (C-12); 61,67 (C-11); 115,11 (C-15 + C-17); 121,04 (C-5); 126,48 (C-13); 127,60 (C-6); 129,69 (C-14 + C-18); 154,33 (C-16); 155,93 (C-3); 162,82 (C-2); 170,00 (C-10). **RP-HPLC-UV/FLD:** chromatographische Reinheit > 99% (Abschnitt 3.3.10). ( $M = 302,33$  g/mol)<sup>c</sup>. **Ausbeute:** 21,4 mg (3,5%); weißer Feststoff.

<sup>a</sup> z.T. überlagert mit dem Signal für Wasser; <sup>b</sup> vermutlich überlagert mit dem Signal für Wasser; <sup>c</sup> wegen zu geringer Substanzmenge keine Elementaranalyse durchgeführt.

**2-[2-oxo-3-(propan-2-yl)pyrazin-1(2H)-yl]pentandisäure (GO-Val-Glu-2(1H)-Pyrazinon).** **ESI-MS:**  $m/z = 269,1$  ( $[M + H]^+$ ). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ /ppm: 1,07 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-8); 1,08 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-9); 2,29 (1H, m, H-12A); 2,33 (1H, m, H-13); 2,45 (1H, m, H-12B); 3,28 (1H, septett,  $^3J = 6,9$  Hz, H-7); 5,09 (1H, m, H-11); 7,29 (1H, d,  $^3J = 4,6$  Hz, H-5); 7,37 (1H, d,  $^3J = 4,6$  Hz, H-6). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ /ppm): 19,02 (C-8); 19,14 (C-9); 23,93 (C-12); 29,65 (C-7); 30,03 (C-13); 61,35 (C-11); 123,20 (C-5); 127,42 (C-6); 156,28 (C-3); 164,63 (C-2); 172,06 (C-10); 176,48 (C-14). **Elementaranalyse:** C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ( $M = 268,27$  g/mol) erfordert: C = 53,73%, H = 6,01%, N = 10,44%, C/N = 5,15; gefunden: C = 52,05%, H = 5,39%, N = 9,54%, C/N = 5,45. **Gehalt:** 91,4% (bezogen auf den Stickstoffgehalt). **RP-HPLC-UV/FLD:** chromatographische Reinheit 91% (Abschnitt 3.3.10). **Ausbeute:** 47,6 mg (7,4%); weißer Feststoff.

### 3.2.4 Synthese von Carboxyalkylderivaten

Die Synthese der Carboxyalkyl-Valin- bzw. Carboxyalkyl-Valyl-Dipeptidderivate wurde nach der Methode von *Liardon et al. (1987)* durchgeführt (*Liardon et al., 1987*). Es wurden Valin bzw. Valyl-Dipeptide mit Glyoxylsäure Monohydrat bzw. Brenztraubensäure im molaren Verhältnis 1 zu 1,5 in einen 50-mL-Weithalskolben eingewogen und in 3 bis 5 mL Reinstwasser gelöst. Die Einwaagen zu den einzelnen Synthesen sind in Tabelle 3-7 aufgelistet. Der pH-Wert wurde mit Natronlauge (3 M) auf 10 bis 11 eingestellt und es wurde Palladium auf Aktivkohle als Katalysator 50 mg hinzugefügt. Der Kolben wurde mit einem Dreivegehahn verschlossen, an einer Vakuumpumpe evakuiert und anschließend ein wasserstoffgefüllter Ballon angeschlossen. Der Reaktionsansatz wurde unter der Wasserstoffatmosphäre 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Belüften des Reaktionsgefäßes beendet.

Der Katalysator wurde mit einem Spritzenvorsatzfilter (0,45  $\mu\text{m}$ ) entfernt und die klare Lösung zur Isolierung von Reaktionsprodukten weiterverwendet.

Tabelle 3-7: Synthese von Carboxyalkylderivaten

Derivat	Aminosäure bzw. Dipeptid	Einwaage		Glyoxylsäure bzw. Brenz- traubensäure	Einwaage	
		[mg]	[mmol]		[mg]	[mmol]
Carboxymethyl-Valin (CM-Val)	Val	233,4	1,99	Glyoxylsäure Monohydrat	278,5	3,76
Carboxyethyl-Valin (CE-Val) <sup>a</sup>	Val	127,2	1,09	Brenztrauben- säure	132,1	1,50
Carboxymethyl-Valyl-Leucin (CM-Val-Leu)	Val-Leu · HCl	267,3	1,00	Glyoxylsäure Monohydrat	138,1	1,50
Carboxyethyl-Valyl-Leucin (CE-Val-Leu) <sup>b</sup>	Val-Leu · HCl	266,8	1,00	Brenztrauben- säure	132,1	1,50
Carboxymethyl-Valyl-Histidin (CM-Val-His)	Val-His	250,7	0,99	Glyoxylsäure Monohydrat	146,0	1,57
Carboxymethyl-Valyl-Serin (CM-Val-Ser) <sup>c</sup>	Val-Ser	204,2	1,00	Glyoxylsäure Monohydrat	139,2	1,51
Carboxymethyl-Valyl-Tyrosin (CM-Val-Tyr)	Val-Tyr	54,6	0,19	Glyoxylsäure Monohydrat	112,7	1,23
Carboxymethyl-Valyl- Glutaminsäure (CM-Val-Glu) <sup>c</sup>	Val-Glu	248,1	1,01	Glyoxylsäure Monohydrat	139,2	1,51

Synthese von: <sup>a</sup> *Rico Losinski (Losinski, 2012)*; <sup>b</sup> *Mario Nerlich (Nerlich, 2011)*; <sup>c</sup> *Xiaofei Ren (Ren, 2011)* in der wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

### Isolierung

Die Isolierung der Reaktionsprodukte wurde in Anlehnung an *Van Chuyen et al. (1973c)* mittels IEC, wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, durchgeführt. Die Elution erfolgte mit einem Acetat-Gradienten (Essigsäure). Die Daten zu den Konzentrationen der verwendeten Elutionslösungen und zur Elution der Edukte und Produkte sind in Tabelle 3-8 zusammengefasst. Zur Identifizierung der Fraktionen wurde der Tüpfeltest (Abschnitt 3.3.5) verwendet. Die Charakterisierung der relevanten Fraktionen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (Abschnitt 3.3.6) und Fließmittelsystem 3 (Tabelle 3-10). Zur Detektion nach dem Tüpfeln bzw. der Dünnschichtchromatographie wurden auf separat entwickelten Kieselgelplatten als Detektionsreagenzien Ninhydrin bzw. ergänzend die Anfärbung nach Chlorierung von Aminen nach *Reindel & Hoppe (1954)* und besprühen mit *o*-Dianisidin verwendet, wie in Abschnitt 3.3.5 und Tabelle 3-11 beschrieben. Zur Bestätigung wurden ausgewählte Fraktionen mittels direkter Massenspektrometrie untersucht (Abschnitt 3.3.3). Fraktionen die ausschließlich das gesuchte Reaktionsprodukt enthielten wurden vereint und am Vakuum mehrfach eingeeengt und in Wasser aufgenommen, bis der Geruch nach Essig nicht mehr erkennbar war. Anschließend wurde der Rückstand in wenig Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Die pulvrigen, weißen Substanzen wurden zur weiteren Charakterisierung verwendet.

Tabelle 3-8: Fraktionierung der Synthesansätze der Carboxyalkylderivate mittels IEC

Synthese	IEC – Konzentration der Essigsäure [mol/L]		R <sub>f</sub> -Wert bei Dünnschichtchromatographie <sup>c</sup>
	Gradient	Elution <sup>d</sup>	
Carboxymethyl-Valin (CM-Val)	0,5; 1,0; 1,5 und 2,0	0,5 (Val); 2,0 (CM-Val)	0,56 (Val); 0,76 (CM-Val)
Carboxyethyl-Valin (CE-Val) <sup>a</sup>	0,5; 1,0; 1,5 und 2,0	0,5 (Val); 2,0 (CE-Val)	0,56 (Val); 0,69 (CE-Val)
Carboxymethyl-Valyl-Leucin (CM-Val-Leu)	0,5; 1,0; 1,5 und 2,0	0,5 (Val-Leu); 1,0 (CM-Val-Leu)	0,77 (Val-Leu); 0,86 (CM-Val-Leu)
Carboxyethyl-Valyl-Leucin (CE-Val-Leu) <sup>b</sup>	0,1; 0,2; 0,3 und 0,4	0,1 (Val-Leu); 0,3 (CE-Val-Leu)	0,77 (Val-Leu); 0,84 (CE-Val-Leu)
Carboxymethyl-Valyl-Histidin (CM-Val-His)	0,2; 0,3; 0,4 und 0,5	0,2 (Val-His); 0,2 (CM-Val-His)	0,22 (Val-His); 0,42 (CM-Val-His)
Carboxymethyl-Valyl-Serin (CM-Val-Ser) <sup>c</sup>	0,5; 1,0; 1,5 und 2,0	0,5 (Val-Ser); 1,0 (CM-Val-Ser)	0,66 (Val-Ser); 0,73 (CM-Val-Ser)
Carboxymethyl-Valyl-Tyrosin (CM-Val-Tyr)	0,5; 1,0; 1,5 und 2,0	1,0 (Val-Tyr); 1,5 (CM-Val-Tyr)	0,76 (Val-Tyr); 0,90 (CM-Val-Tyr)
Carboxymethyl-Valyl-Glutaminsäure (CM-Val-Glu) <sup>c</sup>	0,5; 1,0; 1,5 und 2,0	0,5 (Val-Glu); 1,5 (CM-Val-Glu)	0,28 (Val-Glu); 0,23 (CM-Val-Glu)

Isolierung von <sup>a</sup> Rico Losinski (Losinski, 2012); <sup>b</sup> Mario Nerlich (Nerlich, 2011); <sup>c</sup> Xiaofei Ren (Ren, 2011) in der wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt. <sup>d</sup> Essigsäure-Konzentration bei der das Edukt bzw. Produkt eluierte. <sup>e</sup> Fließmittelsystem 3 (Tabelle 3-10).

### Analytische Daten

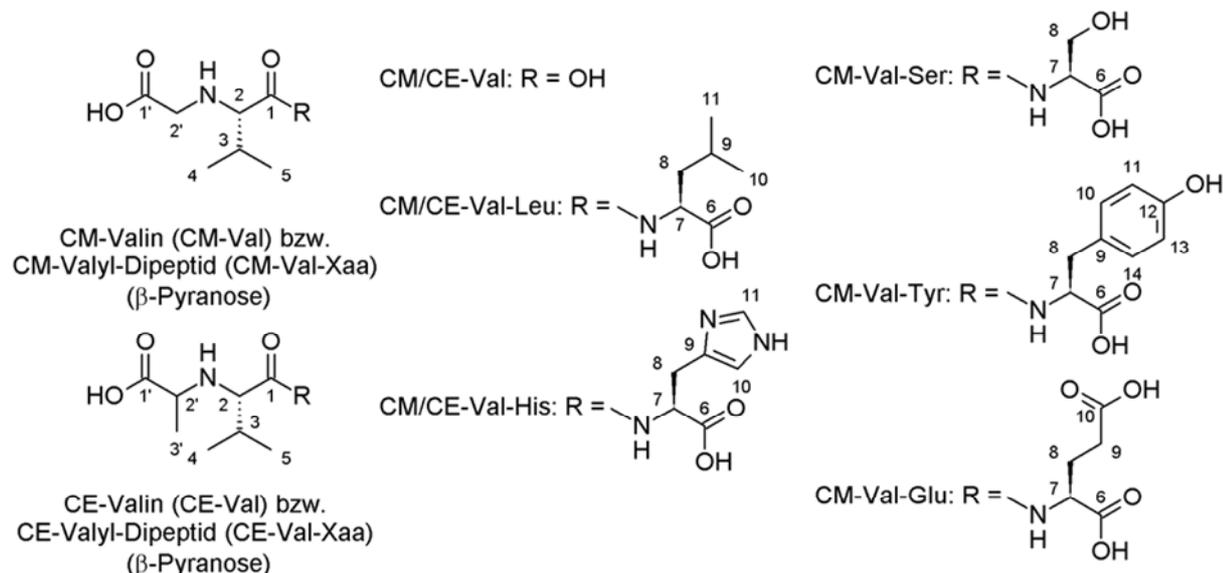


Abbildung 3-4: Struktur der Carboxyalkyl-Val-Derivate bzw. Carboxyalkyl-Val-Xaa-Dipeptide abgeleitet von Glyoxal bzw. Methylglyoxal und Valin bzw. Dipeptiden der Struktur Val-Xaa.

**Carboxymethylvalin 2 (CM-Val).** ESI-MS:  $m/z = 176,2$  ( $[M+H]^+$ ). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 0,96 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6,9 Hz, H-4); 0,97 (3H, dd, <sup>3</sup>J = 7,0 Hz, H-5); 2,24 (1H, o, <sup>3</sup>J = 2,8 Hz, <sup>3</sup>J = 7,0 Hz, H-3); 3,66 (1H, d, <sup>2</sup>J = 16,8 Hz, H-2'A); 3,67 (1H, d, <sup>3</sup>J = 4,2 Hz, H-2); 3,79 (1H, d, <sup>2</sup>J = 16,8 Hz, H-2'B). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 17,49 (C-4); 18,07 (C-

5); 29,52 (C-3); 48,02 (C-2'); 67,51 (C-2); 170,15 (C-1); 172,01 (C-1'). **Elementaranalyse:** C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub> (M = 175,18 g/mol) erfordert: C = 47,99%, H = 7,48%, N = 8,00%, C/N = 6,00; gefunden: C = 42,87%, H = 7,06%, N = 7,16%, C/N = 5,99. **Gehalt:** 89,5% (bezogen auf den Stickstoffgehalt). **Ausbeute:** 344,7 mg (98,7%); weißer Feststoff.

**Carboxyethylvalin 2 (CE-Val).** ESI-MS: m/z = 190,1 ([M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 0,96 (3H, d, <sup>3</sup>J = 7,2 Hz, H-4); 0,97 (3H, dd, <sup>3</sup>J = 7,1 Hz, H-5); 1,48 (3H, d, <sup>3</sup>J = 7,3 Hz, H-3'); 2,24 (1H, o, <sup>3</sup>J = 3,0 Hz, <sup>3</sup>J = 7,0 Hz, H-3); 3,61 (1H, d, <sup>3</sup>J = 4,0 Hz, H-2); 3,74 (1H, d, <sup>3</sup>J = 7,3 Hz, H-2'). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 15,58 (C-4); 17,29 (C-5); 17,48 (C-3'); 29,48 (C-3); 57,60 (C-2'); 67,26 (C-2); 171,81 (C-1); 173,17 (C-1'). **Elementaranalyse:** C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub> (M = 189,21 g/mol) erfordert: C = 50,78%, H = 7,99%, N = 7,40%, C/N = 6,86; gefunden: C = 49,31%, H = 8,07%, N = 7,33%, C/N = 6,73. **Gehalt:** 99,1% (bezogen auf den Stickstoffgehalt). **Ausbeute:** 25,1 mg (99,1%); weißer Feststoff.

**Carboxymethylvalylleucin 2 (CM-Val-Leu).** ESI-MS: m/z = 289,2 ([M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 0,80 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6,3 Hz, H-10); 0,83 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6,3 Hz, H-11); 0,95 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6,9 Hz, H-4); 1,01 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6,9 Hz, H-5); 1,54 (1H, n<sup>a</sup>, <sup>3</sup>J = 6,3 Hz, H-9); 1,56-1,60 (2H, m, H-8); 2,19 (1H, o, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, H-3); 3,32 (1H, d, <sup>2</sup>J = 16,5 Hz, H-2'A); 3,59 (1H, d, <sup>2</sup>J = 15,8 Hz, H-2'B); 3,79 (1H, d, <sup>3</sup>J = 6,1 Hz, H-2); 4,34 (1H, m, H-7). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 17,63 (C-4); 17,87 (C-5); 20,84 (C-10); 22,45 (C-11); 24,87 (C-9); 30,31 (C-3); 39,45 (C-8); 48,04 (C-2'); 52,34 (C-7); 65,99 (C-2); 168,16 (C-1), 170,35 (C-1'); 176,48 (C-6). **Elementaranalyse:** C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (M = 288,34 g/mol) erfordert: C = 54,15%, H = 8,39%, N = 9,72%, C/N = 5,57; gefunden: C = 51,55%, H = 7,53%, N = 9,22%, C/N = 5,59. **Gehalt:** 94,9% (bezogen auf den Stickstoffgehalt). **Ausbeute:** 208,3 mg (72,2%); weißer Feststoff.

a Teilweise überlagert.

**Carboxyethylvalylleucin 2 (CE-Val-Leu).** ESI-MS: m/z = 303,1 ([M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 0,80 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6,3 Hz, H-10); 0,83 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6,3 Hz, H-11); 0,96 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6,9 Hz, H-4); 1,01 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6,9 Hz, H-5); 1,42 (3H, d, <sup>3</sup>J = 7,2 Hz, H-3'); 1,52 (1H, n<sup>a</sup>, <sup>3</sup>J = 6,4 Hz, H-9); 1,55-1,60 (2H, m, H-8); 2,16 (1H, o, <sup>3</sup>J = 6,7 Hz, H-3); 3,36 (1H, d, <sup>3</sup>J = 7,2 Hz, H-2'); 3,72 (1H, d, <sup>3</sup>J = 6,1 Hz, H-2); 4,34 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 8,1 Hz, <sup>3</sup>J = 6,8, H-7). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 15,87 (C-4); 17,39 (C-5); 17,57 (C-3'); 20,37 (C-10); 22,04 (C-11); 24,04 (C-9); 30,11 (C-3); 39,02 (C-8); 51,85 (C-7); 57,89 (C-2'); 65,97 (C-2); 168,01 (C-1); 173,45 (C-1'); 175,95 (C-6). **Elementaranalyse:** C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub> (M = 302,37 g/mol) erfordert: C = 55,61%, H = 8,67%, N = 9,26%, C/N = 6,01; gefunden: C = 53,31%, H = 8,37%, N = 8,73%, C/N = 6,11. **Gehalt:** 94,3% (bezogen auf den Stickstoffgehalt). **Ausbeute:** 248,9 mg (82,3%); weißer Feststoff.

a Teilweise überlagert.

**Carboxymethylvalylhistidin 2 (CM-Val-His).** ESI-MS: m/z = 313,3 ([M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 0,92 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6,9 Hz, H-4); 0,96 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6,9 Hz, H-5); 2,15

(1H, o,  $^3J = 6,8$  Hz, H-3); 3,00 (1H, dd,  $^2J = 15,4$  Hz,  $^3J = 8,8$  Hz, H-8A); 3,11 (1H, d,  $^2J = 16,3$  Hz, H-2'A); 3,18 (1H, dd,  $^2J = 15,4$  Hz,  $^3J = 5,0$  Hz, H-8B); 3,38 (1H, d,  $^2J = 16,3$  Hz, H-2'B); 3,74 (1H, d,  $^3J = 5,7$  Hz, H-2); 4,46 (1H, dd,  $^3J = 8,8$  Hz,  $^3J = 5,1$  Hz, H-7); 7,17 (1H, d<sup>a</sup>,  $^3J = 0,5$  Hz, H-10); 8,48 (1H, d<sup>a</sup>,  $^3J = 1,3$  Hz, H-11). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 17,69 (C-4); 17,86 (C-5); 27,64 (C-8); 30,39 (C-3); 48,43 (C-2'); 54,78 (C-7); 66,27 (C-2); 117,12 (C-10); 130,02 (C-9); 133,80 (C-11); 167,72 (C-1); 170,73 (C-1'); 175,96 (C-6). **Elementaranalyse:** C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M = 312,32 g/mol) erfordert: C = 49,99%, H = 6,45%, N = 17,94%, C/N = 2,79; gefunden: C = 47,67%, H = 6,52%, N = 17,16%, C/N = 2,78. **Gehalt:** 95,7% (bezogen auf den Stickstoffgehalt). **Ausbeute:** 8,9 mg (2,3%; weißer Feststoff).  
a vermutlich Kopplung mit N-H.

**Carboxymethylvalylserin 2 (CM-Val-Ser).** **ESI-MS:** m/z = 263,1 ([M+H]<sup>+</sup>). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 0,93 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-4); 0,97 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-5); 2,19 (1H, o,  $^3J = 6,9$  Hz, H-3); 3,39 (1H, d,  $^2J = 16,5$  Hz, H-2'A); 3,58 (1H, d,  $^2J = 16,5$  Hz, H-2'B); 3,77 (1H, dd,  $^2J = 11,7$  Hz,  $^3J = 4,1$  Hz, H-8A); 3,81 (1H, d,  $^3J = 5,5$  Hz, H-2); 3,82 (1H, dd,  $^2J = 11,8$  Hz,  $^3J = 5,2$  Hz, H-8B); 4,42 (1H, dd,  $^3J = 5,2$  Hz,  $^3J = 4,1$  Hz, H-7). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 17,12 (C-4); 17,29 (C-5); 29,82 (C-3); 47,70 (C-2'); 55,36 (C-7); 60,85 (C-8); 65,61 (C-2); 167,85 (C-1); 170,14 (C-1'); 173,06 (C-6). **Elementaranalyse:** C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (M = 262,26 g/mol) erfordert: C = 45,80%, H = 6,92%, N = 10,68%, C/N = 4,29; gefunden: C = 42,87%, H = 5,03%, N = 9,77%, C/N = 4,39. **Gehalt:** 91,5% (bezogen auf den Stickstoffgehalt). **Ausbeute:** 68,2 mg (26,0%); weißer Feststoff.

**Carboxymethylvalyltyrosin 2 (CM-Val-Tyr).** **ESI-MS:** m/z = 339,2 ([M+H]<sup>+</sup>). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 0,89 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-4); 0,93 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-5); 2,11 (1H, o,  $^3J = 6,7$  Hz, H-3); 2,75 (1H, dd,  $^2J = 14,1$  Hz,  $^3J = 10,4$  Hz, H-8A); 2,86 (1H, d,  $^2J = 16,6$  Hz, H-2'A); 3,15 (1H, dd,  $^2J = 14,1$  Hz,  $^3J = 4,9$  Hz, H-8B); 3,19 (1H, d,  $^2J = 16,5$  Hz, H-2'B); 3,67 (1H, d,  $^3J = 5,7$  Hz, H-2); 4,64 (1H, dd,  $^3J = 10,4$  Hz,  $^3J = 4,9$  Hz, H-7); 6,74 (2H, d,  $^3J = 8,5$  Hz, H-11 + H-13); 7,05 (2H, d,  $^3J = 8,5$  Hz, H-10 + H-14). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 17,10 (C-4); 17,39 (C-5); 29,90 (C-3); 36,08 (C-8); 47,28 (C-2'); 54,47 (C-7); 65,62 (C-2); 115,44 (C-11 + C-13); 128,48 (C-9); 130,38 (C-10 + C-14); 154,31 (C-12); 166,93 (C-1); 169,66 (C-1'); 174,61 (C-6). **Elementaranalyse:** C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (M = 338,36 g/mol) erfordert: C = 56,80%, H = 6,55%, N = 8,28%, C/N = 6,86; gefunden: C = 51,63%, H = 5,69%, N = 7,28%, C/N = 7,09. **Gehalt:** 87,9% (bezogen auf den Stickstoffgehalt). **Ausbeute:** 89,8 mg (66,0%); weißer Feststoff.

**Carboxymethylvalylglutaminsäure 2 (CM-Val-Glu).** **ESI-MS:** m/z = 305,1 ([M+H]<sup>+</sup>). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 0,95 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-4); 1,00 (3H, d,  $^3J = 6,9$  Hz, H-5); 1,93 (1H, m, H-8A); 2,12 (1H, m, H-8B); 2,20 (1H, o,  $^3J = 6,9$  Hz, H-3); 2,39 (2H, t,  $^3J = 7,3$  Hz,  $^3J = 2,8$  Hz, H-9); 3,40 (1H, d,  $^2J = 16,5$  Hz, H-2'A); 3,62 (1H, d,  $^2J = 16,5$  Hz, H-2'B); 3,80 (1H, d,  $^3J = 5,6$  Hz, H-2); 4,46 (1H, dd,  $^3J = 9,0$  Hz,  $^3J = 5,4$  Hz, H-7). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ppm: 17,10 (C-4); 17,34 (C-5); 25,48 (C-8); 29,89 (C-3); 30,01 (C-9); 47,68 (C-2'); 52,57 (C-7); 65,58 (C-2); 167,78 (C-1); 170,04 (C-1'); 174,66 (C-6); 176,91 (C-10).

**Elementaranalyse:**  $C_{12}H_{20}N_2O_7$  ( $M = 304,30 \text{ g/mol}$ ) erfordert: C = 47,36%, H = 6,62%, N = 9,21%, C/N = 5,14; gefunden: C = 44,51%, H = 6,71%, N = 7,97%, C/N = 5,58. **Gehalt:** 86,5% (bezogen auf den Stickstoffgehalt). **Ausbeute:** 127,1 mg (41,4%); weißer Feststoff.

### 3.3 Analytische Methoden

#### 3.3.1 pH-Wert Bestimmung von Backwaren

Die Bestimmung von pH-Werten in handelsüblichen Backwaren wurden von *Franziska Werner (2011)* in ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt. 5 g Probe wurden dazu mit 15 mL Wasser versetzt und mit einem Glasstab homogenisiert. Die Mischung wurde nach einer Stunde aufgeschlämmt und der pH-Wert mit einer pH-sensitiven Elektrode bestimmt. Die pH-Werte sind in Tabelle 3-9 aufgelistet. Bei Weizenbrötchen und Laugenbrötchen wurden bei der Probenvorbereitung Kruste und Krume getrennt, da insbesondere bei Laugenbackwaren deutlich unterschiedliche pH-Werte zwischen Kruste und Krume zu erwarten sind. In den untersuchten Proben wurde der geringste pH-Wert von 5,8 für Weizenbrötchen bestimmt. In Sauerteigen kann der pH-Wert allerdings auf noch deutlich geringere Werte bis ca.  $\text{pH} = 4$  absinken (*Belitz et al., 2008*).

Tabelle 3-9: pH-Werte in Backwaren

Backware	pH-Wert
Weizenbrötchen, Kruste	5,9
Weizenbrötchen, Krume	5,8
Laugenzettel, Kruste	8,8
Laugenzettel, Krume	6,1
Salzgebäck, Zettel	7,9
Amerikaner	7,5
Cookie	7,1
Sandtaler	6,5

#### 3.3.2 Elementaranalyse

Zur Ermittlung des Gehalts der Präparate wurde die elementare Zusammensetzung mittels Elementaranalyse am Institut für Organische Chemie der TU Dresden durch Frau Anke Peritz bestimmt. Mit 5 mg Substanz wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Messungen erfolgten an einem CHNS-O-Elementaranalysator EA 3000 (EuroVector, Mailand) bei einer Ofentemperatur von  $1100 \text{ }^\circ\text{C}$ . Der Gehalt der Präparate wurde aus dem Verhältnis von gemessenem zu theoretischem Stickstoffgehalt (in %) ermittelt.

### 3.3.3 Direkte ESI-TOF-MS für Massengenauigkeit

Die Bestimmung der Molekularmasse von Syntheseprodukten erfolgte am Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden durch Dr. Uwe Schwarzenbolz. 1 mg der jeweiligen Substanz wurde in 1 mL Reinstwasser gelöst und 1:1000 bis 1:100 000 mit einer Mischung aus Methanol, Reinstwasser und Ameisensäure (50/50/1, v/v/v) verdünnt. Nach Zentrifugation bei 10 000 U/min für 10 min wurden die Lösungen direkt zur Messung eingesetzt. Die Massengenauigkeit beträgt  $m/z = \pm 0,05$ .

#### Geräteparameter

Gerät	Mariner, PerSeptive Biosystems
Injektion	direkt, Spritzenport mit Spritzenpumpe, $v = 5\text{--}10 \mu\text{L}/\text{min}$
Ionisations- und Detektionsparameter	Spray tip potential: 4812,3 V, Nozzle potential: 80 V, Quadrupol RF voltage: 1000 V, Detector voltage: 2400 V
Aufnahmebereich	$m/z = 100\text{--}1000$
Kalibrierung	Mischung aus Bradykinin, Neurotensin, Angiotensin I; zur Kontrolle auch ubiquitär vorhandene Phthalate

### 3.3.4 NMR-Spektroskopie

Zur Strukturaufklärung bzw. -bestätigung wurden  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experimente am Institut für Organische Chemie der TU Dresden durch Frau Dr. Margit Gruner und Frau Anett Rudolph durchgeführt. Die Messungen wurden an einem DRX 500 Spektrometer (Bruker, Rheinstetten) bei 500,13 MHz bzw. 125,75 MHz aufgenommen. Von den zu untersuchenden Substanzen wurden 5 mg eingewogen und in 750  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  oder  $\text{DMSO-d}_6$  gelöst.

### 3.3.5 Tüpfeltest

Der Tüpfeltest dient nach IEC bzw. Flash-Chromatographie zur Identifizierung von Fraktionen, die Edukte bzw. Produkte eines Reaktionsansatzes enthalten. Für den Tüpfeltest wurde eine Fertigplatte für die Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60) mit einem Raster mit der Kantenlänge 0,5 cm vorbereitet und je ein Aliquot jeder Fraktion (1  $\mu\text{L}$ ) in ein Kästchen aufgetragen. Nach Trocknung im Abzug bei Raumtemperatur wurden die Fraktionen mittels geeigneter Sprühreagenzien (Tabelle 3-11) angefärbt.

### 3.3.6 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Fertigplatten mit Kieselgel 60 auf Aluminium verwendet. Das Auftragsvolumen betrug meist 1 bis 2  $\mu\text{L}$  und Vergleichsstandards wurden in der Konzentration 1 mg/mL eingesetzt. Die Entwicklungen wurden nach Kammersättigung durchgeführt (min. 20 Minuten), um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. In Tabelle 3-10 sind die verwendeten Fließmittelsysteme aufgelistet. Nach der Chromatographie wurde das

Fließmittel unter Kaltluftstrom bzw. im Abzug abgedampft bevor die Detektion mittels Sprühreagenzien erfolgte.

### Trennsysteme

Tabelle 3-10: Fließmittelsysteme der Dünnschichtchromatographie

Fließmittelsystem	Zusammensetzung
1	1-Butanol/Ameisensäure/Wasser (75/15/10, v/v/v) <sup>a</sup>
2	Acetonitril/Methanol/Wasser (70/30/20, v/v/v)
3	Methanol/Acetonitril/Wasser (60/40/20, v/v/v)

<sup>a</sup> (Theis et al., 2008)

### Detektionsreagenzien

Tabelle 3-11: Detektionsreagenzien für Dünnschichtchromatographie und Tüpfeltest

Reagenz	Verwendungszweck	Zusammensetzung/Vorschrift
Ninhydrin	primäre und sekundäre Amine	0,1 % Ninhydrin in Ethanol und 3 % Essigsäure (w/v/v): 100 mg Ninhydrin in 97 mL Ethanol lösen und 3 mL Eisessig dazugeben (Im Kühlschrank einige Wochen haltbar.); Nach Sprühen Anfärbung bei Raumtemperatur (langsam) oder bei 90 °C (wenige Minuten), Aminosäuren rosarot bis tief violett. Amadori-Produkte orange, rosarot bis violett
Reindel-Hoppe-Reagenz <sup>a</sup>	primäre, sekundäre und tertiäre Amine, hohe Empfindlichkeit	(1) Chlorierung: 0,5 g Kaliumpermanganat in Doppeltrögkammer mit 6 M Salzsäure versetzen. Kammer schließen. 5 bis 10 Minuten zur Sättigung der Atmosphäre mit Chlorgas warten. DC-Platte in die trockene Seite der Kammer stellen und 30 Minuten inkubieren. Platte nach Chlorierung mindestens 10 Minuten im Abzug belüften. (2) Dianisidin-Reagenz: 3,2 mg Dianisidin in 0,6 mL Eisessig lösen, 20 mg Kaliumiodid hinzufügen und in einem Maßkolben auf 10 ml auffüllen. Besprühen der Dianisidin-Reagenz und bei Raumtemperatur warten bis Flecken sichtbar. Amine grau bis schwarz.
TTC	Amadori-Produkte, reduzierende Zucker	2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid (TTC)-Lösung 1%ig: 100 mg TTC in 10 mL 1 M Natronlauge lösen. Für Anfärbung im dunkel aufbewahren (einige Minuten) oder bei 50 °C im Trockenschrank (schnell). Amadori-Produkte orang bis rot.
ethanolische Schwefelsäure	Kohlenhydrate, Amadori-Produkte (bei längerer Erhitzung)	ethanolische Schwefelsäure 10%ig: 90 mL Ethanol vorlegen, 10 mL konzentrierte Schwefelsäure untermischen. Nach Sprühen Ethanol abdampfen lassen. Bei 120 °C im Trockenschrank anfärben. Zucker schwarz.

<sup>a</sup> (Reindel and Hoppe, 1954).

### Berechnung $R_F$ -Wert

Der  $R_F$ -Wert wurde als Quotient aus dem Abstand des jeweiligen Substanzflecks von der Auftragshöhe und der Entfernung der Fließmittelfront von der Auftragshöhe berechnet:

$$R_f = \frac{d_{\text{Substanz}}}{d_{\text{Fließmittelfront}}}$$

### 3.3.7 LC-MS/MS zur Identifizierung der N- $\alpha$ -Fructosylderivate von Dipeptiden über charakteristische Fragmentierung

Zur Bestätigung der Identität der synthetisierten Amadori-Produkte von Dipeptiden wurden die Fragmentierungsmuster mittels LC-MS/MS bestimmt. Mittels Chromatographie wurden die Dipeptidverunreinigungen aus dem Präparat von den Amadori-Produkten getrennt. Anschließend wurden zur Identifizierung im Massenspektrometer die Massenübergänge der spezifischen Molekülonen  $[M+H^+]$  zu charakteristischen Fragmenten genutzt. Die Bedingungen der Elution und der Detektion sind in Tabelle 3-12 angegeben. Die Fragmentierung ist in Abschnitt 4.1.1 (Tabelle 4-1) beschrieben.

#### Messsystem

Anlage	Agilent 1200 Series
Säule	Thermo Hypercarb 2,1 mm x 150 mm, Partikelgröße 5 $\mu\text{m}$ , Thermo Scientific
Injektionsvolumen	1 $\mu\text{L}$
Eluenten	FM A: Wasser, bidestilliert FM B: Methanol
Fluss	0,2 mL/min
Eluentenprogramm	Tabelle 3-12
Detektion	ESI-MS/MS
Auswertung	MassHunter, Agilent Technologies

Tabelle 3-12: Elutionsbedingungen bei LC-MS/MS zur Identifizierung der Amadori-Produkte

Amadori-Produkt <sup>a</sup>	Gradient	Fragmentorspannung [V] <sup>b</sup>
Fru-Val	isokratisch, 10% FM B	95
Fru-Val-Leu	isokratisch, 15% FM B	110
Fru-Val-His	isokratisch, 10% FM B	135
Fru-Val-Ser	isokratisch, 10% FM B	135
Fru-Val-Tyr	Zeit [min]	0 10 19 20 32
	Anteil FM B [%]	10 95 95 10 10
Fru-Val-Glu	Zeit [min]	0 10 19 20 32
	Anteil FM B [%]	10 95 95 10 10

<sup>a</sup> Synthese der Präparate in Abschnitt 3.2.1; <sup>b</sup> Für alle Präparate wurden Spektren bei Kollisionsenergien von 5, 10, 20 sowie 40 eV aufgezeichnet.

### 3.3.8 RP-HPLC-CLND zur Bestimmung der Gehalte von Amadori-Produkt-Präparaten

Die RP-HPLC-CLND wurde angewendet um den absoluten Gehalt von Amadori-Produkten zu bestimmen, die in Präparaten mit dem zugehörigen Dipeptid als Verunreinigung vorliegen. Der Chemilumineszenzdetektor (CLND) in Kombination mit einer chromatographischen Trennung ist geeignet, um stickstoffhaltige Einzelsubstanzen in Gemischen zu quantifizieren. Nach der chromatographischen Trennung erfolgte die absolute Quantifizierung über die detektierte Intensität von Stickstoffmonoxid. Dieses entsteht durch Oxidation der Stickstoffatome im Molekül mittels Ozon. Die detektierte Intensität verhält sich linear zur Anzahl der Stickstoffatome eines Moleküls solange keine N–N- oder N=N-Bindungen vorliegen. Diese können vollständig oder zum Teil zu N<sub>2</sub> reagieren, das keine Chemilumineszenz erzeugt und deshalb nicht detektiert wird. Moleküle ohne direkt benachbarte Stickstoffatome ergeben weitestgehend lineare Signalintensitäten in Abhängigkeit von der Anzahl der Stickstoffatome pro Molekül. Es ist bekannt, dass geringe Abweichungen im Bereich von 5% bis 20% in Abhängigkeit von der Molekülstruktur auftreten können (Corens *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2007). Deshalb wurden die Dipeptide bzw. Valin zur Kalibrierung der entsprechend abgeleiteten Amadori-Produkte verwendet. Aus der Intensität des Detektorsignals erfolgte die Berechnung der Konzentration unter Berücksichtigung des theoretischen Stickstoffgehalts des jeweiligen Moleküls.

Die Dipeptide (Val-Leu, Val-His, Val-Ser, Val-Tyr, Val-Glu; Bachem) und das Valin (Merck) waren von hoher Reinheit und wurden direkt zur Kalibrierung eingesetzt. Die Messlösungen der Kalibrierstandards und der Amadori-Produkt-Präparate wurden so hergestellt, dass die Stickstoffkonzentration zwischen 0,5 und 10 mg N/L und somit bei einem Injektionsvolumen von 10 µL im Messbereich des Detektors lag. Die Elutionsbedingungen zu den einzelnen Amadori-Produkten sind in Tabelle 3-13 angegeben. Für alle Amadori-Produkt-Dipeptid-Systeme wurde eine ausreichende chromatographische Trennung erreicht. Die Bestimmung des Gehalts der Amadori-Produkt-Präparate wurde jeweils dreifach durchgeführt. Der Gehalt eines Amadori-Produkts im Gesamtpräparat wurde aus dem Verhältnis der experimentell bestimmten Konzentration bezogen auf die Einwaage berechnet. Die Ergebnisse sind bei der Charakterisierung der Präparate in Abschnitt 3.2.1 angeben.

#### Messsystem

Anlage	Agilent 1100 Series
Säule	1 – Thermo Hypercarb 2,1 mm x 150 mm, Partikelgröße 5 µm, Thermo Scientific 2 – Multospher 120 RP18 HP, 250 mm x 2 mm, Partikelgröße 5 µm, CS-Chromatographie
Injektionsvolumen	10 µL
Eluenten	FM A: Wasser, bidestilliert

	FM B: Methanol
Fluss	0,2 mL/min
Eluentenprogramm	Tabelle 3-13
Detektion	UV ( $\lambda_1 = 210$ nm, $\lambda_2 = 280$ nm), CLND
Kalibrierbereich	0,5 bis 10 mg N/L
Auswertung	Chemstation, Agilent Technologies

Tabelle 3-13: Elutionsbedingungen bei RP-HPLC-CLND zur Gehaltsbestimmung für Amadori-Produkte

Amadori-Produkt <sup>a</sup>	Säule <sup>b</sup>	Gradient	Elutionszeit [min]	
			Amadori-Produkt	Aminosäure, Peptid
Fru-Val	1	isokratisch, 10% FM B	5,6	3,0
Fru-Val-Leu	1	Zeit [min]            0   15   17   18   35 Anteil FM B [%]    10   95   95   90   10	11,7	5,2
Fru-Val-His	1	isokratisch, 10% FM B	9,6	4,5
Fru-Val-Ser	1	isokratisch, 10% FM B	8,7	2,9
Fru-Val-Tyr	2	Zeit [min]            0   10   24   25   45 Anteil FM B [%]    10   95   95   10   10	13,4	12,3
Fru-Val-Glu	1	isokratisch, 10% FM B	21,5	7,5

<sup>a</sup> Synthese der Präparate in Abschnitt 3.2.1; <sup>b</sup> 1-Hypercarb (Thermo Scientific), 2-RP-C18 (Chromatographie Service).

### 3.3.9 Quantifizierung von FM-Val nach saurer Hydrolyse in physiologischen Inkubationen und Modellbackwaren

#### *Bestimmung der Umsatzrate der Fructosylvalyl-Amadori-Produkte zu FM-Val bei der Hydrolyse in 6 M bzw. 8 M Salzsäure*

Wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben lassen sich Fructosyl-Amadori-Produkte unter Hydrolysebedingungen in die stabilen und analytisch gut erfassbaren Furoylmethylaminosäuren überführen. Unter definierten Bedingungen der Hydrolyse resultiert ein reproduzierbarer Umsatz des Fructosylderivats zum entsprechenden Furoylmethylderivat. Diese Umsatzrate zu FM-Val wurde für Fru-Val, Fru-Val-Leu, Fru-Val-His, Fru-Val-Ser, Fru-Val-Tyr sowie Fru-Val-Glu bestimmt.

Die auf Fructosylvalyl-Amadori-Produkt zu prüfende wässrige Lösung wurde in einem verschließbaren Glasgefäß mit Salzsäure (12 mol/L) im Verhältnis 1 + 1 oder 1 + 2 so versetzt, dass die Salzsäurekonzentration der Mischung 6 mol/L bzw. 8 mol/L betrug. Die Konzentration der Amadori-Produkte in den zur Hydrolyse eingesetzten Lösungen lag im Bereich von 10 bis 80  $\mu$ mol/L.

Das dicht verschlossene Hydrolysegefäß wurde nach Spülen des Luftraums über der Probe mit Stickstoff (1 Minute) für 23 Stunden bei 110 °C erhitzt. Das Spülen des Luftraums über der Probe sollte den Luftsauerstoff verdrängen, um oxidative Reaktionen zu vermindern. Krause et al. (2003) stellten allerdings für die Bildung von Furosin aus Fru-Lys fest, dass das

Spülen mit Stickstoff keinen Einfluss auf den Umsatz hatte. Im Anschluss an die Hydrolyse wurde die Salzsäure in einem Vakuumkonzentrator mit Kühlfalle entfernt.

Da FM-Val ein guter Chromophor ist, konnte die Quantifizierung teilweise über das UV-Signal bei 280 nm erfolgen. Bei geringeren Intensitäten wurde der Massenübergang 226 auf 180 Da verwendet. Die chromatographischen Bedingungen entsprechen den Angaben für die Inkubationen unter physiologischen Bedingungen. FM-Val verfügt über eine deutlich bessere Stabilität als Amadori-Produkte und ermöglicht dadurch eine zuverlässigere und robustere Analytik.

#### *Inkubationen unter physiologischen Bedingungen – Hydrolyse*

1,5 mL der auf Fructosylvalyl-Amadori-Produkte zu prüfenden wässrigen Inkubationslösungen aus Abschnitt 3.6.1 wurden mit 1,5 mL 12 M Salzsäure versetzt, so dass die Salzsäurekonzentration der Mischung 6 mol/L betrug. Nach spülen des Luftraums über der Probe mit Stickstoff (1 Minute) wurde das Hydrolysegefäß dicht verschlossen und für 23 Stunden bei 110 °C erhitzt. Im Anschluss wurde die Salzsäure in einem Vakuumkonzentrator mit Kühlfalle entfernt. Der Rückstand wurde in einem definierten Volumen 0,1 M Salzsäure aufgenommen, durch einen Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,2 µm) filtriert und direkt zur Messung eingesetzt.

#### *Messsystem*

Anlage	Agilent 1200 Series
Säule	Thermo Hypercarb 2,1 mm x 150 mm, Partikelgröße 5 µm, Thermo Scientific
Injektionsvolumen	10 µL
Eluenten	FM A: 0,1% Essigsäure in Wasser, bidestilliert FM B: 0,1% Essigsäure in Methanol
Fluss	0,2 mL/min
Eluentenprogramm	Tabelle 3-14
Säulentemperatur	25 °C
Detektion	UV ( $\lambda_1 = 220$ nm; $\lambda_2 = 280$ nm) ESI-MS/MS (Detektionsbedingungen: Tabelle 3-14)
Kalibrierung	extern mit FM-Val (0,02 bis 1,34 µmol/L), Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,99$
Auswertung	MassHunter

Tabelle 3-14: Elutionsbedingungen und Parameter der Massendetektion zur Quantifizierung von FM-Val

Elutionsbedingungen							Massendetektion				
Zeit [min]	0	16	17	23	24	36	Fragmentorspannung [V]	80			
Anteil FM B [%]	10	90	95	95	10	10	Massenübergang <sup>a</sup> m/z [Da]	180	123	81	55
							Kollisionsenergie [eV]	7	15	30	37

a Ausgehend vom Molekülion für FM-Val m/z ( $[M+H]^+$ ) = 226 Da.

### Modellbackwaren – Hydrolyse

Die Extraktionslösungen nach Abschnitt 3.8.2 wurden bei 10 000 U/min für 10 min zentrifugiert. 1 mL des Überstands wurde entnommen und mit 2 mL konzentrierter Salzsäure (12 M) versetzt, so dass eine Hydrolyselösung in 8 M Salzsäure entstand. Die Hydrolyse wurde in dicht verschließbaren Gefäßen nach Spülen des Luftraums über der Probe mit Stickstoff (1 min) bei 110 °C für 23 Stunden durchgeführt. 2 mL der Hydrolyselösung wurden unter Vakuum eingengt und der Rückstand in 0,5 mL 0,01 M Salzsäure aufgenommen.

Aus diesen Probelösungen wurden geeignete Verdünnungen hergestellt, durch einen Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert und direkt zur Messung eingesetzt. Die Quantifizierung von FM-Val erfolgte über die Intensität des Signals (UV-Detektor) bei 280 nm. Zur Kalibrierung wurde ein FM-Val-Standard verwendet, der wie in Abschnitt 3.2.2 bzw. 4.1.2. hergestellt und charakterisiert wurde.

### Messsystem

Anlage	HPLC-UV, analytisch (Welchrom); Knauer GmbH, Berlin, Deutschland
Säule	Eurospher 100-5 C18 Vertex Column: 250 mm x 4,6 mm; Knauer, Berlin, Deutschland
Injektionsvolumen	20 µl
Eluenten	FM A: 0,1% Ameisensäure in Reinstwasser FM B: 0,1% Ameisensäure in Methanol
Fluss	0,7 mL/min
Eluentenprogramm	Tabelle 3-16
Säulentemperatur	25 °C
Detektion	UV ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ )
Kalibrierung	extern mit FM-Val (0,09 bis 9 µmol/L), Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,99$
Auswertung	Eurochrom

Tabelle 3-15: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung von FM-Val in Modellbackwaren

Elutionsbedingungen										
Zeit [min]	0	10	15	28	30	35	36	50	52	60
Anteil FM B [%]	1	1	10	17	18	80	95	95	1	1

### 3.3.10 Quantifizierung von 2(1H)-Pyrazinonen und Chinoxalin in physiologischen Modellinkubationen – RP-HPLC-UV-FLD

Aus Lösungen von Modellinkubationen wurden geeignete Verdünnungen hergestellt, durch einen Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert und direkt zur Messung eingesetzt. Die Quantifizierung von Pyrazinonen und Chinoxalin erfolgte über die Intensität des Signals

(UV-Detektor) bei 320 nm. Das Signal des Fluoreszenzdetektors wurde zur Absicherung der Peakzuordnung der 2(1*H*)-Pyrazinone aufgezeichnet. Zur Kalibrierung wurden für die 2(1*H*)-Pyrazinone die entsprechend präparativ gewonnenen Standards verwendet. Chinoxalin wurde über einen kommerziellen Standard kalibriert.

### Messsystem

Anlage	HPLC-UV/FD, analytisch (Wellchrom); Knauer GmbH, Berlin, Deutschland
Säule	Eurospher 100-5 C18 Vertex Column: 250 mm x 4,6 mm, Knauer
Injektionsvolumen	20 µL
Eluenten	FM A: 0,1% Ameisensäure in Reinstwasser FM B: 0,1% Ameisensäure in Methanol
Fluss	0,7 mL/min
Eluentenprogramm	Tabelle 3-16
Säulentemperatur	30 °C
Detektion	UV ( $\lambda_1 = 220$ nm; $\lambda_2 = 320$ nm) Fluoreszenzdetektor (FD) ( $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 400$ nm)
Kalibrierung	extern mit Standard des Glyoxal-Pyrazinons des jeweiligen Dipeptids (0,3 bis 420 µmol/L, Bereiche der Kalibrierungen ca. eine Zehnerpotenz), Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,99$
Auswertung	Eurochrom

Tabelle 3-16: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung von 2(1*H*)-Pyrazinonen in Modellinkubationen

Elutionsbedingungen					
Zeit [min]	0	45	50	52	60
Anteil FM B [%]	20	80	80	20	20

### 3.3.11 Quantifizierung von CM-Val-Xaa-Derivaten und GO-Val-Xaa-2(1*H*)-Pyrazinonen in Proben aus Inkubationsexperimenten mittels LC-MS/MS

Aus Modellinkubationen wurden geeignete Verdünnungen hergestellt, 10 min bei 10 000 U/min zentrifugiert und der Überstand nach Filtration (Porengröße 0,2 µm) direkt zur Messung eingesetzt. Den Proben der Inkubationsexperimente unter physiologischen Bedingungen wurde CE-Val-Leu als interner Standard zugesetzt. Den Inkubationsproben des Backmodells mit den Peptiden Val-Leu, Val-His, Val-Ser und Val-Glu wurde CM-Val-Tyr als Interner Standard zugesetzt. Bei den Inkubationsproben von Val-Tyr wurde CM-Val-Leu eingesetzt.

Die Quantifizierung der CM-Derivate in Inkubationsproben des physiologischen Modells erfolgt über externe Kalibrierungen. Zur Quantifizierung der CM-Val-Xaa und der GO-Val-Xaa-2(1*H*)-Pyrazinone in Inkubationsproben des Glucose-Peptid-Backmodells wurden Standardadditionskalibrierungen angefertigt um Matrixeffekte bei der Massendetektion zu

berücksichtigen. Alle Kalibrierungen wurden mit den entsprechenden Referenzstandards durchgeführt.

Abweichend wurde für die Quantifizierung von CM-Val-Leu und CE-Val-Leu in Proben des Stärke-Peptid-Backmodells für die Chromatographie eine RP-Phase der Firma Knauer (Eurospher 100-5 C18, 250 x 3,0 mm) und das Elutionssystem nach Tabelle 3-18 verwendet.

### Messsystem

Anlage	Agilent 1200 Series
Säule	Zorbax 300 SB-C8, Agilent
Injektionsvolumen	10 µL
Eluenten	FM A: 0,1% Essigsäure in Wasser, bidestilliert FM B: 0,1% Essigsäure in Methanol
Fluss	0,28 mL/min
Eluentenprogramm	Tabelle 3-17
Säulentemperatur	25 °C
Detektion	UV ( $\lambda_1 = 220 \text{ nm}$ ; $\lambda_2 = 280 \text{ nm}$ ) ESI-MS/MS (Detektionsbedingungen: Tabelle 3-19)
Kalibrierung	extern mit den jeweiligen CM-Val-Xaa-Dipeptiden (0,02 bis 2,9 µmol/L, Bereiche der Kalibrierungen ca. eine Zehnerpotenz), Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,99$
Auswertung	MassHunter

Tabelle 3-17: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung von CM-Val-Xaa-Dipeptiden in Modellinkubationen

Elutionsbedingungen						
Zeit [min]	0	10	18	28	29	39
Anteil FM B [%]	1	1	90	90	1	1

Tabelle 3-18: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung von CM- und CE-Val-Leu in Proben des Stärke-Peptid-Backmodells

Elutionsbedingungen					
Zeit [min]	0	45	50	52	60
Anteil FM B [%]	20	80	80	20	20

Tabelle 3-19: Parameter der Massendetektion zur Quantifizierung von CM-Val-Xaa-Dipeptiden in Modellinkubationen

Verbindung	Vorläufer-ion m/z [Da]	Fragment m/z [Da]	Verwendung	Fragmentor-spannung [V]	Kollisions-energie (eV)	Elutionszeit [min]*
GO-Val-Ser-	227	183	Quantifier	115	10	15,3
Pyrazinon	227	139	Qualifier	115	15	
GO-Val-Leu-	253	209	Qualifier	130	13	23,4
Pyrazinon	253	139	Quantifier	130	20	
CM-Val-Ser	263	130	Quantifier	120	12	7,4
	263	84	Qualifier	120	29	

Verbindung	Vorläufer- ion m/z [Da]	Fragment m/z [Da]	Verwendung	Fragmentor- spannung [V]	Kollisions- energie (eV)	Elutionszeit [min]*
GO-Val-Glu- Pyrazinon	269	225	Qualifier	110	14	18,1
	269	139	Quantifier	110	20	
GO-Val-His- Pyrazinon	277	233	Qualifier	115	8	14,2
	277	139	Qualifier	115	14	
	277	95	Quantifier	115	20	
CM-Val-Leu	289	130	Quantifier	120	10	17,2
	289	84	Qualifier	120	30	
CE-Val-Leu	303	144	Quantifier	120	12	17,8
	303	98	Qualifier	120	29	
GO-Val-Tyr- Pyrazinon	303	139	Qualifier	120	20	20,1
	303	69	Quantifier	120	39	
CM-Val-Glu	305	130	Quantifier	110	14	9,4
	305	84	Qualifier	110	34	
CM-Val-His	313	130	Quantifier	145	20	7,1
	313	110	Qualifier	145	30	
	313	84	Qualifier	145	36	
CM-Val-Tyr	339	130	Quantifier	115	13	15,5
	339	84	Qualifier	115	35	

\* bei Elutionsbedingungen nach Tabelle 3-17

### 3.3.12 Quantifizierung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Modellbackwaren nach Derivatisierung mit ortho-Phenylendiamin (OPD)

Die Quantifizierung von 1,2-Dicarbonylverbindungen erfolgte nach Derivatisierung mit ortho-Phenylendiamin. Die Probenvorbereitung ist Abschnitt 3.8.1 beschrieben. Detektiert wurden die entsprechenden Chinoxaline bei  $\lambda = 320$  nm. Zur externen Kalibrierung bzw. zu Standardadditionsexperimenten wurden die der jeweiligen 1,2-Dicarbonylverbindung entsprechenden Chinoxalinstandards verwendet.

#### Messsystem

Anlage	HPLC-UV, analytisch (Wellchrom); Knauer GmbH, Berlin, Deutschland
Säule	ProntoSil 60 Phenyl, 250 mm x 4,6 mm; Knauer
Injektionsvolumen	20 $\mu$ L
Eluenten	FM A: 0,075% Essigsäure in Reinstwasser FM B: 20% FM A plus 80% Methanol
Fluss	0,7 mL/min
Eluentenprogramm	Tabelle 3-16
Säulentemperatur	30 °C
Detektion	UV ( $\lambda = 320$ nm)
Kalibrierung	extern mit Chinoxalinstandards

Auswertung Eurochrom

Tabelle 3-20: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung von Chinoxalinen in Modellinkubationen

Elutionsbedingungen							
Zeit [min]	0	25	30	34	50	53	63
Anteil FM B [%]	10	50	50	70	70	10	10

### 3.3.13 Quantifizierung von 2(1H)-Pyrazinonen im Stärke-Peptid-Backmodell – RP-HPLC-UV-FLD

Die Quantifizierung des GO- und des MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons erfolgte über einen Standard des GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons in einer externen Kalibrierung. Die Probenvorbereitung wurde, wie in Abschnitt 3.8.1 beschrieben, durchgeführt.

#### Messsystem

Anlage	HPLC-UV/FD, analytisch (Wellchrom); Knauer GmbH, Berlin, Deutschland
Säule	Eurospher 100-5 C18 Vertex Column: 250 mm x 3,0 mm, Knauer
Injektionsvolumen	20 µL
Eluenten	FM A: 0,1% Essigsäure in Reinstwasser FM B: 0,1% Essigsäure in Methanol
Fluss	0,4 mL/min
Eluentenprogramm	Tabelle 3-16
Säulentemperatur	30 °C
Detektion	UV ( $\lambda_1 = 220$ nm; $\lambda_2 = 320$ nm) Fluoreszenzdetektor (FD) ( $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 400$ nm)
Kalibrierung	extern mit GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon (1,5 bis 15,3 µmol/L), Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,99$
Auswertung	Eurochrom

Tabelle 3-21: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung des GO- und des MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons in Inkubationsproben des Stärke-Peptid-Backmodells

Elutionsbedingungen					
Zeit [min]	0	45	50	52	60
Anteil FM B [%]	20	80	80	20	20

### 3.3.14 Quantifizierung N-terminaler MRPs in humanem Hämoglobin nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure

Die analytische Methode wurde verwendet um N-terminale MRPs in Hämoglobin zu quantifizieren, das mittels 6 M Salzsäure hydrolysiert wurde (Abschnitt 3.7.6). Um eine bessere chromatographische Trennung strukturell sehr ähnlicher Analyten zu erzielen und Matrixef-

fekte zu verringern, wurden zwei HPLC-Säulen gekoppelt. Die chromatographischen Bedingungen sind unter Messsystem aufgelistet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor und Massenspektrometer. Die Parameter für die Massendetektion sind in Tabelle 3-23 zusammengefasst.

Als interner Standard, der alle Aufarbeitungsschritte durchläuft, wurde das Phenylalanin aus dem Hämoglobin verwendet. Die  $\alpha$ -Kette des Hämoglobins enthält 7 mal und die  $\beta$ -Kette des Hämoglobins 8 mal Phenylalanin. Damit sind in einem mol Hämoglobintetramer 30 mol Phenylalanin enthalten (Tabelle 2-7). Das Phenylalanin in den Messproben wurde über die Peakfläche im UV bei  $\lambda = 269$  nm quantifiziert. Die Peakflächen im UV-Chromatogramm waren ausreichend groß für eine Quantifizierung und die bessere Signalstabilität im Vergleich zum Signal des Massendetektors ermöglichten eine reproduzierbarere Auswertung. Wegen des bekannten Gehalts von Phenylalanin im Hämoglobin konnte aus dem Gehalt des Phenylalanins in den einzelnen Proben auf den Hämoglobingehalt geschlossen werden.

Um Matrixeffekte bei der Massendetektion (Signalsuppressionen bzw. -verstärkungen) berücksichtigen zu können, wurde für jeden Analyten eine Standardadditionskalibrierung mittels Referenzstandard angefertigt. Dazu wurde ein Matrixmix aus Hämoglobinhydrolysaten fünf unterschiedlicher Probanden hergestellt. Diesem Matrixmix wurden fünf Kalibrierstufen eines Standardmixes zuaddiert. Der Standardmix war so abgestimmt, dass für alle Analyten Kalibrierbereiche in sinnvollen Größenordnungen resultierten.

Zur Kompensation von Schwankungen des Massensignals wurde jeder Messprobe als interner Messstandard der gleiche Gehalt des internen Standards CM-Val-Tyr zugesetzt. Sowohl bei den Kalibrierproben als auch bei den Hämoglobinproben wurde nicht die Signalintensität der einzelnen Analyten, sondern das Peakflächenverhältnis zur Signalintensität von CM-Val-Tyr verwendet. Zur Berechnung der Gehalte der N-terminalen MRPs in den Proben wurde das Peakflächenverhältnis des jeweiligen Analyten zum internen Messstandard CM-Val-Tyr durch den Anstieg der Kalibriergeraden der Standardadditionskalibrierung dividiert.

### *Probenvorbereitung*

Die trockenen Rückstände der Hydrolysate nach Entfernung der Salzsäure wurden in 1 mL Fließmittel A (FM A) resolubilisiert. Dazu wurden die Proben zur Erleichterung des Lösungsprozesses nach Zugabe des Lösungsmittels 10 Minuten im Ultraschallbad belassen. Zur Abtrennung eventuell vorhandener unlöslicher Rückstände wurden die Proben vor der weiteren Verwendung bei 10 000 U/min zentrifugiert. Die Konzentration entsprach 1 mg Proteinhydrolysat/mL. Zur Herstellung der Messproben wurden Aliquote der resolubilisierten Hydrolysate verwendet und mit dem internen Standard CM-Val-Tyr versetzt. Die resultierende Konzentration entsprach ca. 0,2 mg Proteinhydrolysat/mL Messlösung.

### *Messsystem*

Anlage

Agilent 1200 Series mit Triple Quad LC/MS 6410

Säule	Zorbax 300 SB-C8: 4,6 mm x 150 mm, Porengröße 300 Å, Partikelgröße 3,5 µm, Agilent gekoppelt mit Zorbax Eclipse XDB-C8: 4,6 mm x 150 mm, Porengröße 80 Å, Partikelgröße 5,0 µm, Agilent
Injektionsvolumen	80 µL
Eluenten	FM A: 0,1% Essigsäure in Wasser, bidestilliert FM B: 0,1% Essigsäure in Methanol
Fluss	0,4 mL/min
Eluentenprogramm	Tabelle 3-22
Säulentemperatur	25 °C
Detektion	UV ( $\lambda = 269$ nm) ESI-MS/MS (Detektionsbedingungen: Tabelle 3-23)
Kalibrierung	Standardaddition der Referenzstandards als Standardmix zu einem Matrixmix aus fünf Einzelproben, Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,9$
Auswertung	MassHunter

Tabelle 3-22: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung N-terminaler MRPs in Hämoglobin nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure

Elutionsbedingungen						
Zeit [min]	0	15	45	65	66	81
Anteil FM B [%]	1	1	90	90	1	1

Tabelle 3-23: Parameter der Massendetektion zur Quantifizierung N-terminaler MRPs in Hämoglobin nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure

Verbindung	Vorläufer- ion m/z [Da]	Fragment m/z [Da]	Verwendung	Fragmentor- spannung [V]	Kollisions- energie (eV)	Elutions- zeit [min]
Phenylalanin (Phe)	168	122	Quantifier	80	1	26,1
		105	Qualifier		40	
CM-Val	176	130	Quantifier	90	10	9,8
		84	Qualifier		21	
CE-Val	190	144	Qualifier	95	7	9,7
		98	Quantifier		18	
FM-Val	226	180	Quantifier	95	7	25,7
		123	Qualifier		15	
GO-Val-Leu- 2(1H)-Pyrazinon	253	209	Qualifier	115	13	51,4
		139	Quantifier		20	
MGO-Val-Leu- 2(1H)-Pyrazinon	267	223	Qualifier	135	12	51,7
		153	Quantifier		19	
		83	Qualifier		34	
GO-Val-His- 2(1H)-Pyrazinon	277	233	Qualifier	125	8	31,9
		139	Qualifier		14	
		95	Quantifier		20	

Verbindung	Vorläufer- ion m/z [Da]	Fragment m/z [Da]	Verwendung	Fragmentor- spannung [V]	Kollisions- energie (eV)	Elutions- zeit [min]
MGO-Val-His- 2(1H)-Pyrazinon	291	247	Qualifier	110	9	33,1
		153	Qualifier		19	
		95	Quantifier		25	
CM-Val-Tyr	339	130	Quantifier	115	13	34,2
		84	Qualifier		35	

### Detektionsgrenzen

Die Ermittlung der Detektionsgrenzen erfolgte mittels Schnellschätzung aus dem Signal/Rausch-Verhältnis nach DIN 32645 (1994). Die Werte für die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der einzelnen N-terminalen Analyten in Hämoglobinproben nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure sind in Tabelle 3-24 zusammengefasst.

Da kein Maillard-Produkt-freies Hämoglobin verfügbar war, konnte die Leerwertmethode nicht verwendet werden. Die Intensität des Rauschens wurde durch Ausmessen der „Signalhöhe“ im Chromatogramm in direkter Umgebung des Analytsignals bestimmt und auf die Signalthöhe (Peakhöhe) des Analyten bezogen. Die Berechnung der Nachweisgrenze (NG) wurde mittels Signal/Rausch-Verhältnis, der Konzentration des Analyten in der entsprechenden Messprobe und dem Faktor 3 durchgeführt. Die Nachweisgrenze wurde in einer Dreifachbestimmung ermittelt. Die Berechnung der Bestimmungsgrenze (BG) erfolgte durch Multiplikation der Nachweisgrenze mit dem Faktor 3.

$$c_{\text{NG}} = 3 \times \frac{R}{H} \times c_{\text{Analyt}} \qquad c_{\text{BG}} = 3 \times c_{\text{NG}}$$

R	...	Signalintensität des Rauschens des Messsignals
H	...	Signalintensität des Analyten (Peakhöhe)
$c_{\text{Analyt}}$	...	Konzentration des Analyten [mmol/mol Hämoglobin]
$c_{\text{NG}}$	...	Konzentration des Analyten an Konzentration der Nachweisgrenze [mmol/mol Hämoglobin]
$c_{\text{BG}}$	...	Konzentration des Analyten an der Bestimmungsgrenze [mmol/mol Hämoglobin]

Tabelle 3-24: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zur Quantifizierung N-terminaler MRPs in Hämoglobin nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure

Verbindung	Nachweisgrenze <sup>a</sup> [mmol/mol Hämoglobin]	Bestimmungsgrenze <sup>a</sup> [mmol/mol Hämoglobin]
CM-Val	0,07	0,20
CE-Val	0,0012	0,0035
Fru-Val (FM-Val) <sup>b</sup>	2,70 (0,12)	8,09 (0,35)
GO-Val-Leu-2(1H)- Pyrazinon	0,011	0,031
MGO-Val-Leu-2(1H)-	0,0028	0,0084

Verbindung	Nachweisgrenze <sup>a</sup> [mmol/mol Hämoglobin]	Bestimmungsgrenze <sup>a</sup> [mmol/mol Hämoglobin]
Pyrazinon		
GO-Val-His-2(1H)- Pyrazinon	0,0002	0,0005
MGO-Val-His-2(1H)- Pyrazinon	0,0059	0,0177

a bezogen auf den Quantifier in der Massendetektion (Tabelle 3-23); b Berechnung von Fru-Val aus dem Analyten FM-Val über den Korrekturfaktor 23,3 für Fru-Val-His (Abschnitt 4.1.2 bzw. Tabelle 4-2)

### 3.3.15 Quantifizierung der MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin nach enzymatischer Hydrolyse

Die Analysenmethode wurde von *Peßler (2013) (Betreuung durch Dr. Anne Hellwig)* nach Vorarbeiten von *Losinski (2012)* in ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit in Anlehnung an *Thornalley et al. (2003)* entwickelt (*Peßler, 2013*). Dabei wurde eine Hypercarb-Säule verwendet, da diese eine gute Trennung von Lysin und Argininderivaten ermöglicht. Damit konnten CML und CEL getrennt werden, obwohl sich diese sehr hydrophilen Lysinderivate nur in einer Methylgruppe unterscheiden. Um Phospholipide chromatographisch abzutrennen, wurde eine RP-C8-Phase vorgeschaltet. Dadurch sollte die Signalsuppression verringert werden.

Mit dieser Methode wurden MRPs der Seitenketten von Lysin (Fru-Lys, CML, CEL) und Arginin (MG-H) in enzymatischen Hydrolysaten von humanem Hämoglobin analysiert (Abschnitt 3.7.5). Als interne Standards wurden stabilisotopenmarkiertes D<sub>2</sub>-CML, <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-MG-H1 und <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Fru-Lys verwendet. Diese wurden als Aufarbeitungsstandards und als Bezugsstandards bei der Massendetektion verwendet. Da bereits im Enzymblindwert MRPs detektierbar waren, wurden die Gehalte im Enzymblindwert von den Gehalten in den Hämoglobinhydrolysaten abgezogen (*Thornalley et al., 2003*). Zur Kalibrierung wurde ein Matrixmix aus fünf verschiedenen Erythrozytenlysaten hergestellt und durch Dotierung verschiedener Konzentrationen der authentischen MRPs (CML, CEL, MG-H1, Fru-Lys) eine Standardadditionskalibrierung angefertigt.

Mit Hilfe der isotopenmarkierten, internen Standards und der Standardadditionskalibrierung sollten Matrixeffekte in der Chromatographie und der Massendetektion kompensiert werden. Zur Berechnung der MRP-Gehalte in den Kalibrierproben und den Hämoglobinhydrolysaten wurden die Peakflächen der Analyten auf die Peakflächen der entsprechenden internen Standards bezogen. Da für CEL kein isotopenmarkierter Standard verfügbar war, wurde CEL auf D<sub>2</sub>-CML bezogen. Die Gehalte der MRPs in den Hämoglobinhydrolysaten wurden berechnet indem das Peakflächenverhältnis in der Probe durch den Anstieg der Standardadditionskalibrierung dividiert wurde.

Als Bezugsgrößen wurden in jedem Hämoglobinhydrolysat die Gehalte der Aminosäuren Lysin und Arginin mittels Aminosäureanalyse quantifiziert (Abschnitt 3.3.16). So konnte der

Gehalt eines MRPs auf den Gehalt der entsprechenden freien Aminosäure bezogen und ein Derivatisierungsgrad berechnet werden. Da der Gehalt von Lysin (44 mol/mol Hämoglobin) und von Arginin (12 mol/mol Hämoglobin) in Hämoglobin bekannt ist (Tabelle 2-7), konnte auch der Gehalt der einzelnen MRPs pro mol Hämoglobin berechnet werden.

### Probenvorbereitung

Als Messproben wurden enzymatische Hämoglobinhydrolysate nach Abschnitt 3.7.5 verwendet. Vor der Messung wurden diese durch einen Spritzenvorsatzfilter mit der Porengröße 0,2 µm filtriert.

### Messsystem

Anlage	Agilent 1200 Series mit Triple Quad LC/MS 6410
Säule	Zorbax 300 SB-C8: 4,6 mm x 150 mm, Porengröße 300 Å, Partikelgröße 3,5 µm, Agilent gekoppelt mit Thermo Hypercarb 2,1 mm x 150 mm, Partikelgröße 5 µm, Thermo Scientific
Injektionsvolumen	10 µL
Eluenten	FM A: 0,05% (v/v) Essigsäure in Wasser, bidestilliert FM B: 0,05% (v/v) Essigsäure in Methanol/Wasser (95/5; v/v)
Fluss	0,2 mL/min
Eluentenprogramm	Tabelle 3-6
Säulentemperatur	20 °C
Detektion	ESI-MS/MS (Detektionsbedingungen: Tabelle 3-26)
Kalibrierung	Matrixkalibrierung mit Addition von Referenzstandards und unter Verwendung von isotoopenmarkierten Bezugsstandards, Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,99$
Auswertung	MassHunter

Tabelle 3-25: Elutionsbedingungen zur Quantifizierung von CM-Val-Xaa-Dipeptiden in Modellinkubationen

Elutionsbedingungen							
Zeit [min]	0	7	35	36	46	48	68
Anteil FM B [%]	1	1	35	90	90	1	1

Tabelle 3-26: Parameter der Massendetektion zur Quantifizierung der MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin in Hämoglobin nach enzymatischer Hydrolyse

Verbindung	Vorläufer-ion m/z [Da]	Fragment m/z [Da]	Verwendung	Fragmentor-spannung [V]	Kollisions-energie [eV]	Retentionszeit [min]
CML	205	130	Quantifier	100	9	11,2
		142	Qualifier			
D <sub>2</sub> -CML	207	130	Quantifier	80	12	11,2
		144	Qualifier			

Verbindung	Vorläufer- ion m/z [Da]	Fragment m/z [Da]	Verwendung	Fragmentor- spannung [V]	Kollisions- energie [eV]	Retentions- zeit [min]
CEL	219	130	Quantifier	120	7	12,0
		84	Qualifier		19	
MG-H	229	114	Quantifier	90	10	25,6/27,8
		166	Qualifier		10	
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -MG-H	235	121	Quantifier	100	12	25,6/27,8
		171	Qualifier		12	
Fru-Lys	309	128	Quantifier	110	15	11,0
		273	Qualifier		13	
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Fru- Lys	317	129	Quantifier	70	13	11,0
		233	Qualifier		15	

### Detektionsgrenzen

Die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurde in Abschnitt 3.3.14 beschrieben. Da in bereits im Enzymblindwert Maillard-Produkte detektierbar waren, wurde die Intensität des Rauschens wie in Abschnitt 3.3.14 in direkter Umgebung der Analytpeaks ausgemessen.

Tabelle 3-27: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zur Quantifizierung der MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin in humanem Hämoglobin nach enzymatischer Hydrolyse

Verbindung	Nachweisgrenze <sup>a</sup> [mmol/mol Hämoglobin]	Bestimmungsgrenze <sup>a</sup> [mmol/mol Hämoglobin]
CML	0,22	0,67
CEL	0,08	0,24
MG-H	0,34	1,02
Fru-Lys	0,54	1,61

<sup>a</sup> bezogen auf den Quantifier in der Massendetektion (Tabelle 3-23)

### 3.3.16 Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalysen wurden am Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden von Dipl.-Ing. Karla Schlosser durchgeführt.

#### Probenvorbereitung

Proben für die Aminosäureanalyse wurden nach Bedarf so mit Probenpuffer (Tabelle 3-28) verdünnt, dass die relevanten Analyten in einem sinnvollen Konzentrationsbereich für die Quantifizierung vorlagen.

Für die Quantifizierung von Dipeptiden in Inkubationslösungen (Abschnitt 3.6.2) wurden Kalibrierlösungen mit den authentischen Dipeptiden hergestellt.

Zur Analyse enzymatisch hydrolysierten Hämoglobins wurden 50 µL einer aufgetauten Hydrolyseprobe (Abschnitt 3.7.5) mit 100 µL oder 150 µL des Probenpuffers gemischt. Da in

den Proben nach einiger Zeit ein bräunlicher Niederschlag ausfällt, wurden die Proben nach Verdünnung mit Probenpuffer für 12 Stunden im Kühlschrank gelagert. Nach Zentrifugieren bei 10 000 U/min für 10 Minuten wurde der klare Überstand zur Analyse verwendet.

Die Quantifizierung von Aminosäuren erfolgte über Kalibrierlösungen der authentischen Aminosäuren.

### Messsystem

Anlage	Aminosäureanalysator S4300, Sykam, Fürstenfeldbruck
Säule	Kationenaustauschersäule LCA K07/Li, Sykam
Injektionsvolumen	10–100 µL
Eluenten	Tabelle 3-28
Fluss	0,45 mL/min
Eluentenprogramm	Tabelle 3-29
Detektion	Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin, Coil Temperatur: 130 °C, Messung bei $\lambda = 440$ nm und $\lambda = 570$ nm
Ninhydrinreagenz	Ninhydrin-Reagenz mit 1% (w/v) Ninhydrin und 0,1% Hydrindantin-Hydrat in 7/3 (v/v) Glycol/Acetatpuffer, Sykam, Fürstenfeldbruck
Fluss Ninhydrinreagenz	0,25 mL/min
Kalibrierbereich	2,5–25 nmol
Auswertung	Chromstar 6.3

Tabelle 3-28: Proben- und Elutionspuffer Aminosäureanalyse

Puffer <sup>a</sup>	Puffersalz	Konzentration (Li <sup>+</sup> ) [mol/L]	pH-Wert
Probenpuffer	Lithiumcitrat	0,12	2,20
Elutionspuffer 1	Lithiumcitrat	0,12	2,90
Elutionspuffer 2	Lithiumcitrat	0,30	4,20
Elutionspuffer 3	Lithiumcitrat/-borat	0,30	8,00
Elutionspuffer 4 (Regenerierung)	Lithiumhydroxid	0,50	

a – Puffer bezogen von Sykam, Fürstenfeldbruck

Tabelle 3-29: Elutionssystem Aminosäureanalyse

Zeit [min]	Puffer 1 [%] <sup>a</sup>	Puffer 2 [%] <sup>a</sup>	Puffer 3 [%] <sup>a</sup>	Puffer 4 [%] <sup>a</sup>	Säulentemperatur [°C] <sup>a</sup>
0,0	85	15	0	0	42
3,0	85	15	0	0	42
4,0	79	21	0	0	42
21,0	43	57	0	0	42
25,0	43	57	0	0	42
33,0	0	100	0	0	
39,0	0	0	100	0	
40,0 <sup>b</sup>					60

Zeit [min]	Puffer 1 [%] <sup>a</sup>	Puffer 2 [%] <sup>a</sup>	Puffer 3 [%] <sup>a</sup>	Puffer 4 [%] <sup>a</sup>	Säulentemperatur [°C] <sup>a</sup>
43,0	0	0	77	23	
46,0 <sup>b</sup>					74
61,0	0	0	77	23	74
61,1	0	0	0	100	
64,1	0	0	0	100	
64,2	85	15	0	0	
71,0 <sup>b</sup>					42
77,2	85	15	0	0	42

a – Kontinuierliche Gradienten. b – Nur Wechsel beim Temperaturgradienten.

## 3.4 Präparative Methoden

### 3.4.1 Säulenchromatographie mit Kieselgel (Flash-Chromatographie)

Zur Flash-Chromatographie wurden Glassäulen mit Fritte und einem Innendurchmesser von 3,0 cm verwendet. Als Trennmittel wurde Kieselgel 60 mit einer Partikelgröße von 0,2-0,063 mm genutzt. Die nötige Menge Kieselgel wurde in einem Becherglas im Elutionsmittel aufgeschlämmt und nach Vorlage von etwas Elutionsmittel mit Hilfe eines Trichters in einem Guss in die Säule eingefüllt, um ein homogenes Säulenbett zu erhalten. Die Vorbereitung der Säule erfolgte kurze Zeit vor der Verwendung.

Das zu trennende Material wurde in einem Spitzkolben am Vakuum eingeengt bis nahezu kein Lösungsmittel mehr enthalten war. Dieser Rückstand wurde mit Kieselgel so verrieben, dass eine streufähige Konsistenz entsteht. Das Elutionsmittel in der Chromatographiesäule wurde abgelassen bis nur noch ein geringer Überstand von wenigen Millimeter über dem Säulenbett vorhanden war. Anschließend wurde das mit Kieselgel verriebene Material gleichmäßig aufgetragen und mit einer dünnen Schicht Seesand überschichtet um Aufwirbelungen zu vermeiden. Die ersten Milliliter des Elutionsmittels wurden mit einer Pipette so aufgegeben, dass keine Verwirbelungen entstehen. Direkt nach der Auftragung wurde mit der Elution begonnen. Elutionen erfolgten stets isokratisch, mit vollständig geöffnetem Hahn und mit mindestens dem dreifachen Säulenvolumen. Die Fraktionen von ca. 10 mL wurden in Reagenzgläsern aufgefangen.

Weitere Details sind bei den jeweiligen Synthesen angegeben.

### 3.4.2 Semipräparative Ionenaustausch-Chromatographie (IEC)

Für die Durchführung der IEC wurden ausschließlich Säulen von BioRad (Econo Column) verwendet, die über ein Luer-Lock-System verfügen. Die Fraktionen wurden mittels Fraktionensammler aufgefangen und die Größe der Fraktionen wurde über die Tropfenzahl festgelegt. Als Triebkraft des Flusses wurden die Elutionsmittel in erhöht gelagerten Vorratsfla-



Säule	Knauer Vertex Column, 100 mm x 16 mm, Porengröße 100 Å, Partikelgröße 10 µm, Knauer
Injektionsvolumen	Bis 1000 µl
Elutionstemperatur	Raumtemperatur
Eluenten	FM A: 0,1% Essigsäure in Reinstwasser FM B: 0,1% Essigsäure in Methanol
Detektion	UV ( $\lambda_1 = 320$ nm)
Auswertung	Chromgate, Knauer, Berlin

### 3.5 pH-potentiometrische Titration

Die pH-potentiometrische Titration wurde am Institut für Anorganische Chemie der TU Dresden von *Amon (2010)* unter Anleitung von *DLC Katja Schreppel* durchgeführt (*Schreppel, 2007*). Mit dieser Methode wurden die  $pK_S$ -Werte ausgewählter Aminosäuren und Dipeptide bestimmt.

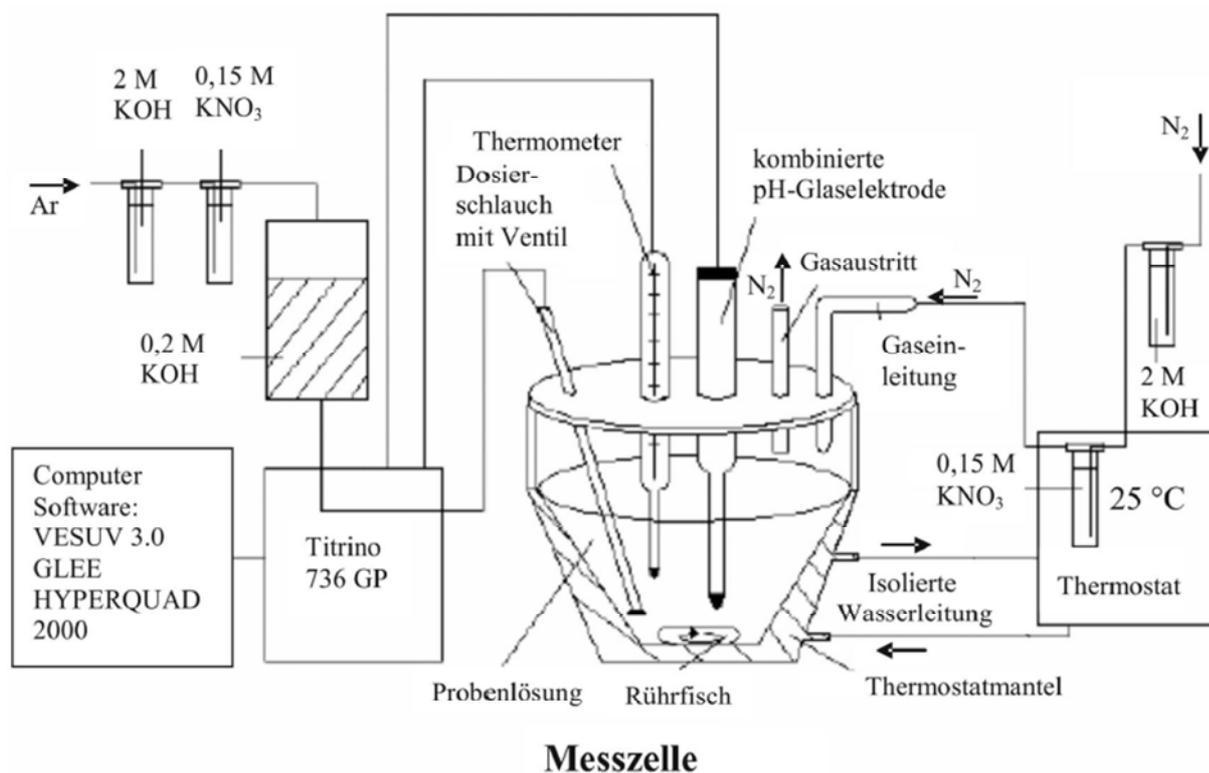


Abbildung 3-5: Aufbau pH-potentiometrische Titration (*Schreppel, 2007*).

Der Geräteaufbau (Abbildung 3-5) besteht aus einem Titrino 736 GP, einer pH-sensitiven Glaselektrode, Thermostat, Rührwerk und einem Auswertesystem (Software: VESUV 3.0, GLEE, HYPERQUAD 2000). Für die Bestimmung mussten alle Lösungen  $CO_2$ -frei sein, wozu Wasser abzukochen und mit Argon zu spülen war und die Atmosphäre im Versuchsaufbau mit Stickstoff gespült wurde. Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von  $(25,0 \pm 0,1) ^\circ C$  durchgeführt. Von den zu untersuchenden Aminosäuren bzw. Peptiden wurde eine 18

bis 20 mmol/L Stammlösung hergestellt. 1,5 mL der Aminosäure- bzw. Peptid-Lösung, 1,5 mL einer 0,1 mol/L Salpetersäure und 833  $\mu$ L einer 1,76 mol/L Kaliumnitrat-Lösung wurden in einem 10-mL-Maßkolben aufgefüllt, so dass eine Ionenstärke von 0,15 mol/L vorlag. Von dieser Lösung wurden 4,5 mL vorgelegt, auf 25 °C temperiert und mit 0,2 mol/L Kaliumhydroxid-Lösung titriert. Die Bestimmung wurde für jeden Analyten mindestens dreifach durchgeführt.

## 3.6 Inkubationsexperimente physiologisches Modell

### 3.6.1 Reaktivität von Valyldipeptiden gegenüber Glucose

#### *Inkubation und Hydrolyse*

Die Inkubationen der Dipeptide mit Glucose wurden in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) durchgeführt. Um die gewünschte Konzentration des PBS-Puffers in der Inkubationslösung zu erreichen wurde dieser mit 2-fach höherer Konzentration hergestellt. 0,25 mmol der Dipeptide wurden in 25 mL PBS-Puffer (2-fach) gelöst. Es wurden 10 mL einer 25 mM Glucoselösung (Glucose in Wasser) zugesetzt. Der pH-Wert wurde auf pH = 7,4 eingestellt und die Lösung anschließend auf 50 mL aufgefüllt. Die Konzentration des jeweiligen Dipeptids sowie der Glucose in der resultierenden Inkubationslösung betrug 5 mM in PBS-Puffer. Die Lösungen wurden nach Zusatz von je einem Kristall Thymol (antimikrobiell) für 14 Tage bei 37 °C erhitzt. Nach 0, 1, 2, 6 und 14 Tagen wurden aus jedem Reaktionsansatz drei Proben (je 1,5 mL) entnommen und zur Quantifizierung nach Abschnitt 3.3.9 eingesetzt.

#### *Lösungen*

PBS-Puffer (2-fach, pH = 7,4) auf 200 mL:	589,4 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, 93,8 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 3200,3 mg NaCl, 80,6 mg KCl
5 mM Glucoselösung (5-fach) auf 100 mL:	450,4 mg Glucose
5 mM Peptidlösungen (2-fach) in 25 mL PBS-Puffer (2-fach)	66,7 mg Val-Leu (Val-Leu · HCl) 63,6 mg Val-His 51,1 mg Val-Ser 70,1 mg Val-Tyr 61,5 mg Val-Glu
0,2 M Salzsäure auf 1 L	16,67 mL 12 M HCl

### 3.6.2 Reaktivität von Valyldipeptiden gegenüber Glyoxal

Die Inkubationsexperimente der Dipeptide mit Glyoxal wurden von *Mario Nerlich (2011)* in seiner wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt. Die Umsetzung der fünf Valyldipep-

tide (Val-His, Val-Leu, Val-Ser, Val-Tyr, Val-Glu) mit Glyoxal erfolgte in PBS-Puffer bei 37 °C und pH = 7,4 für 14 Tage. Die Inkubationslösungen wurden so hergestellt, dass eine äquimolare Konzentration des jeweiligen Peptids und des Glyoxals von 5 mM erreicht wurde. Die Zusammensetzung der Lösungen für die Inkubationsansätze ist im Folgenden aufgelistet. Zum Abstoppen der Reaktion wurden zu 500 µL Inkubationslösung 500 µL der 20 mM OPD-Lösung zupipettiert und die Lösung nach Durchmischen für 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gelagert. Die Konzentration der gebildeten AGEs wurde nach 0, 2, 6 und 14 Tagen bestimmt.

### Lösungen

PBS-Puffer (1,25-fach, pH = 7,4) auf 100 mL	184,2 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, 29,3 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1000,0 mg NaCl, 25,2 mg KCl
Glucoselösung (5-fach) auf 50 mL	191,2 µL Glyoxal-Lösung (40%)
5 mM Peptidlösungen (1,25-fach) in 10 mL	16,7 mg Val-Leu (Val-Leu · HCl)
PBS-Puffer (1,25-fach)	15,9 mg Val-His 12,8 mg Val-Ser 17,5 mg Val-Tyr 15,4 mg Val-Glu
20 mM ortho-Phenylendiamin-Lösung (OPD-Lösung) in 50 mL Reinstwasser	108,1 mg OPD

## 3.7 Aufarbeitung von humanem Hämoglobin

### 3.7.1 Humane Hämoglobinproben

Zur Untersuchung der Glykierung an humanem Hämoglobin standen Vollblutproben von Patienten des Dialysezentrums des Universitätsklinikums Carl-Gustav-Carus Dresden (Ethikvotum: EK 148052012) aus einer Kooperation mit der Abteilung Medizinische Klinik III Bereich Nephrologie unter Leitung von Prof. Hugo zur Verfügung. Die Blutentnahme erfolgte direkt vor der Durchführung der Hämodialyse. Die Entnahme der Blutproben von normoglykämischen Probanden ohne bekannte Einschränkungen der Nierenfunktion (Kontrollgruppe) erfolgte ebenfalls durch medizinisches Fachpersonal. Alle Probanden wurden über das Forschungsvorhaben aufgeklärt und unterzeichneten eine schriftliche Einwilligung.

Die Bestimmung des HbA<sub>1c</sub>-Werts in den Blutproben erfolgte im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Dresden (IKL Hämatologisches Labor). Die HbA<sub>1c</sub>-Werte der Patienten des Dialysezentrums (6 weiblich, 5 männlich) lagen im Bereich von 29 bis 61 mmol/mol (IFCC) (4,8 bis 7,7%). Die Probanden der Kon-

trollgruppe (4 weiblich, 5 männlich) wiesen HbA<sub>1c</sub>-Werte von 26 bis 33 mmol/mol (IFCC) (4,5 bis 5,2%) auf.

### 3.7.2 Isolierung von humanem Hämoglobin aus Blutproben

Die Vollblutproben wurden in Heparin-Röhrchen aufgefangen. Die Isolierung der Erythrozyten erfolgte wenige Minuten nach Verfügbarkeit der Blutproben in Anlehnung an *Cai & Hurst (1999)* bzw. *Thornalley et al. (2003)*. Dazu wurden die gefüllten Heparin-Röhrchen für 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Das Blutplasma wurde mit einer Pipette abgenommen. Die Erythrozyten wurden noch dreimal mit je 4 mL physiologischer Natriumchloridlösung (0,9%) gewaschen und die Waschlösung jeweils nach Zentrifugation abpipettiert. Die gewaschenen Erythrozyten wurden anschließend in 300 µL Portionen geteilt und bei -80 °C gelagert.

Zur Isolierung des Hämoglobins wurden die Erythrozyten hypotonisch lysiert, indem zu 300 µL Erythrozyten 1200 µL Reinswasser gegeben wurden. Die Mischung wurde nach 10 Minuten mittels Vortex homogenisiert und bei -21 °C eingefroren. Nach erneutem Auftauen wurde für 10 Minuten bei 4500 g zentrifugiert um nicht gelöste Zellbestandteile zu sedimentieren. Das klare Erythrozytenlysat im Überstand wurde zur Isolierung des Hämoglobins weiterverwendet.

In verschließbaren Gefäßen wurde das Erythrozytenlysat mit 20 mL salzsaurem eisgekühltem Aceton (2% konzentrierte Salzsäure) versetzt. Nach Homogenisierung mittels Vortex wurde die Mischung für 10 Minuten bei -21 °C gekühlt und anschließend für 15 Minuten bei -5 °C und 5000 U/min zentrifugiert. Der rötlich gefärbte klare Überstand wurde abgenommen. Der Rückstand wurde noch zweimal mit je 10 mL eisgekühltem Aceton (ohne Salzsäure) gewaschen und der Überstand nach Zentrifugieren entfernt. Um das restliche Aceton abzdampfen wurden die Proben über Nacht im Abzug stehen gelassen. Somit konnte das Globin als weißer Feststoff gewonnen werden. Gelagert wurde das Globin bei -80 °C.

### 3.7.3 Anreicherung von AGEs in humanem Hämoglobin und dem Tripeptid Val-Leu-Ser

Die Anreicherung von Globinproben mit Glyoxal bzw. Methylglyoxal wurde von *Diane Starke* in ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt (*Starke, 2013*). Von einem isolierten Globin wurden jeweils ca. 1 mg (16 nmol) eingewogen und in 500 µL einer 0,02 M Salzsäure gelöst. Dazu wurden 500 µL 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH = 7,4) und in etwa 5-fachem Überschuss zur Molarität des Globin-Tetramer Glyoxal bzw. Methylglyoxal (100 nmol) pipettiert. Die Lösung wurde für 48 Stunden bei 70 °C im Inkubationsschrank zur Reaktion gebracht. Im Anschluss wurde die Lösung eingefroren, lyophilisiert und der Rückstand in 100 µL Reinstwasser aufgenommen.

Um einen Vergleichsstandard für das mit Glyoxal-AGEs modifizierte N-terminal Tripeptid der  $\alpha$ -Kette des Hämoglobins zu erhalten wurde eine Lösung von Val-Leu-Ser (1 mg/mL bzw.

3,14  $\mu\text{mol/mL}$ ) mit 20  $\mu\text{mol}$  Glyoxal für 48 Stunden bei 70 °C umgesetzt. Die Inkubationslösung wurde gefriergetrocknet und der Rückstand für die weitere Verwendung in Reinstwasser aufgenommen.

### 3.7.4 Enzymatische Hydrolyse mit Pepsin und Carboxypeptidase Y zur Freisetzung N-terminaler AGEs bzw. AGE-Peptide aus humanem Hämoglobin

Die enzymatischen Hydrolysen zur Untersuchung der Abbaubarkeit des Hämoglobins bis zu kurzkettigen modifizierten N-terminalen Peptiden wurden von *Diane Starke* in ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt (*Starke, 2013*).

Im ersten Schritt erfolgte die Hydrolyse mit der Endopeptidase Pepsin. Dazu wurden 3 mg eines isolierten Globins bzw. eines mit Glyoxal oder Methylglyoxal inkubierten Globins in 1 mL 0,02 M Salzsäure gelöst und mit 50  $\mu\text{L}$  Pepsinlösung (2 mg Pepsin/mL 0,02 M Salzsäure) versetzt. Die Hydrolyse erfolgte für 12 Stunden bei 37 °C. Im zweiten Schritt wurden 250  $\mu\text{L}$  eines TRIS-Puffers (12,1g TRIS/50 mL Reinstwasser, pH = 7,4) und 10  $\mu\text{L}$  Carboxypeptidase Y (87 Units/mL) zupipettiert. Zum Abstoppen der Hydrolyse wurden die Proben bei -21 °C eingefroren. Vor den Messungen wurde die Lösung in einem 2-mL-Maßkolben aufgefüllt und durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,2  $\mu\text{m}$ ) filtriert.

Für Hydrolyseexperimente mit dem Tripeptid Val-Leu-Ser, den Dipeptiden Val-Leu und Val-His und deren Derivate Fru-Val-Leu, Fru-Val-His, CM-Val-Leu, CE-Val-Leu und CM-Val-His wurden 0,3 bis 0,8  $\mu\text{mol}$  in 1 mL Reinstwasser gelöst. Nach Zugabe von 250  $\mu\text{L}$  TRIS-Puffer (12,1g TRIS/50 mL Reinstwasser, pH = 7,4) und 10  $\mu\text{L}$  Carboxypeptidase Y (87 Units/mL) wurden die Lösungen für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

### 3.7.5 Enzymatische Totalhydrolyse von humanem Hämoglobin

Das Vorgehen bei der enzymatischen Totalhydrolyse zur vollständigen Zerlegung des Hämoglobins in die Aminosäuren und Aminosäurederivate wurde von *Henle et al. (1991)* bzw. *Ahmed et al. (2002)* adaptiert (*Ahmed et al., 2002; Henle et al., 1991*). Die konkrete Versuchsvorschrift wurde von *Peßler (2013)* (*Betreuung durch Dr. Anne Hellwig*) erstellt.

Der Vorteil der enzymatischen Hydrolyse im Vergleich zur Hydrolyse mit Salzsäure liegt darin, dass säurelabile Analyten wie Fru-Lys und MG-Hs (MG-H1, MG-H2, MG-H3) nicht abgebaut und Analyten wie CML nicht nachgebildet werden. Bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure fanden *Henle et al. (1994)* einen Abbau von MG-H1 von über 50% bzw. *Ahmed et al. (2002)* von über 90%. Fru-Lys wird bei der Hydrolyse mit Salzsäure vollständig zu Lysin, Furosin, Pyridosin und CML abgebaut (*Krause et al., 2003*). Je nach Salzsäurekonzentration konnten *Krause et al. (2003)* die Bildung von bis zu 6% CML aus Fru-Lys ermitteln. Bei der Durchführung der enzymatischen Hydrolyse kann davon ausgegangen werden, dass CML nur zu einem sehr geringen Anteil oxidativ aus Fru-Lys gebildet wird (*Hegele et al., 2008b*).

Als Proben für die enzymatische Hydrolyse wurden Erythrozytenlysate verwendet. Dafür wurde zu 100  $\mu\text{L}$  aus Vollblut isolierten Erythrozyten 400  $\mu\text{L}$  Reinstwasser pipettiert. Nach 10 Minuten wurde auf dem Vortex bei geringer Geschwindigkeit gemischt und die Probe bei  $-21\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Probe für 10 Minuten bei 4500 g zentrifugiert. 25  $\mu\text{L}$  des Überstands wurden für die enzymatische Hydrolyse verwendet. Für einen Enzymblindwert wurden statt 25  $\mu\text{L}$  Erythrozytenlysate 25  $\mu\text{L}$  Wasser eingesetzt.

### Lösungen

HCl (0,02 M)	5 mL HCl (1 M) mit Reinstwasser auf 250 mL auffüllen. Zugabe von einem Kristall Thymol zur Konservierung.
KOH (260 mM)	146 mg KOH mit Reinstwasser auf 10 mL auffüllen. Zugabe von einem Kristall Thymol zur Konservierung.
Kaliumphosphat-Puffer (0,5 M)	3,402 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ in Reinstwasser lösen, auf 50 mL auffüllen. 5,706 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ in Reinstwasser lösen, auf 50 mL auffüllen. Lösungen zusammen geben bis $\text{pH} = 7,4$ . Zugabe von einem Kristall Thymol zur Konservierung.
Pepsin-Lösung (20 FIP-U/mL)	2 mg Pepsin (10 FIP-U/mg Protein) in 1 mL 0,02 M HCl lösen. Lösung stets frisch herstellen.
Pronase-Lösung (8000 U/mL)	2 mg Pronase E (4000 PU/mg Protein) in 1 mL Kaliumphosphat-Puffer (0,5 M, $\text{pH} 7,4$ ) lösen. Lösung stets frisch herstellen.
Aminopeptidase-Lösung (60 U/mL)	Gebrauchsfertige Suspension von Aminopeptidase M (11 U/mg Protein; 60,6 U/mL).
Prolidase-Lösung (100 U/mL)	9,4 mg Prolidase (1000 U, 106 U/mg Protein) in 2 mL Reinstwasser lösen (Stammlösung 500 U/mL). 200 $\mu\text{L}$ der Stammlösung mit 800 $\mu\text{L}$ Reinstwasser verdünnen (Arbeitslösung, 100 U/mL). Lösungen im Tiefkühlschrank lagern.

### Durchführung

Tag 1	25 $\mu\text{L}$ Erythrozytenlysate 10 $\mu\text{L}$ interner Standard (Abschnitt 3.3.15), 0,5 mL 0,02 M HCl und 25 $\mu\text{L}$ Pepsin-Lösung (0,5 U) zugeben. 15 s mit eingetauchter Pipettenspitze (100-1000 $\mu\text{l}$ ), anschließend 10 Minuten den Gasraum mit Stickstoff Spülen (0,5 bar). 24 Stunden bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Trockenschrank inkubieren.
-------	---

- Tag 2      125  $\mu$ L Kaliumphosphat-Puffer (0,5 M, pH 7,4),  
25  $\mu$ L KOH (260 mM) und  
25  $\mu$ L Pronase E-Lösung (200 PU) zugeben.  
10 Minuten den Gasraum mit Stickstoff Spülen (0,5 bar).  
24 Stunden bei 37 °C im Trockenschrank inkubieren.
- Tag 3      4  $\mu$ L Aminopeptidase-Lösung (0,24 U) und  
5  $\mu$ L Prolidase-Lösung (0,5 U) zugeben.  
10 Minuten den Gasraum mit Stickstoff Spülen (0,5 bar).  
48 Stunden bei 37 °C im Trockenschrank inkubieren.
- Tag 5      Ansätze bei -80 °C einfrieren.

Vor der Analyse wurden die Hämoglobinhydrolysate aufgetaut und wie in Abschnitt 3.3.15 und 3.3.16 beschrieben weiter verwendet.

### 3.7.6 Totalhydrolyse von isoliertem humanem Hämoglobin mit 6 M Salzsäure

#### *Hydrolyse von isoliertem Globin (Hämoglobin) zur Quantifizierung N-terminaler Derivate*

Zur Hydrolyse von isoliertem Globin nach Abschnitt 3.7.2 mit 6 M Salzsäure wurden ca. 3 mg Globin eingewogen und so mit 6 M Salzsäure ergänzt, dass eine Konzentration von 1 mg Protein/mL resultierte. Die Lösung wurde in einem dicht verschließbaren Hydrolyseröhrchen hergestellt und nach spülen des Luftraums über der Probe mit Stickstoff (1 Minute) für 23 Stunden bei 110 °C im Sandbad erhitzt. Das Spülen des Luftraums über der Probe sollte den Luftsauerstoff verdrängen, um oxidative Reaktionen zu vermindern. Nach der Hydrolyse wurde ein Aliquot der Hydrolyselösung (1 mL) verwendet und die Salzsäure in einem Vakuumkonzentrator bei 40 °C entfernt. Der trockene Rückstand wurde für Analysen eingesetzt. Bei Bedarf wurden die trockenen Rückstände bis zur Analyse bei -18 °C gelagert.

### 3.7.7 Wiederfindung von 2(1H)-Pyrazinonen und Nachbildung N-terminaler AGEs bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure

#### 3.7.7.1 Stabilität von 2(1H)-Pyrazinonen – Wiederfindung

Ca. 2 mg eines isolierten Globins wurden in ein dicht verschließbares Hydrolysegefäß eingewogen. In unterschiedliche Ansätze wurden je 10  $\mu$ L einer verdünnten Lösung je eines der N-terminalen 2(1H)-Pyrazinone der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins (GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) zupipettiert, so dass die dotierte Stoffmenge 20 bis 30 pmol entsprach. Zusätzlich wurden Globinproben ohne Dotierung eingewogen, um die Pyrazinongehalte des Globins von den dotierten Gehalten abziehen zu können. Sowohl der Blindwert als auch die Globinproben mit Dotierung wurden jeweils als Dreifachbestimmung ausgeführt. Entsprechend der Globineinwaage wurde 6 M Salzsäure so zugegeben, dass eine Konzentration von 1

mg Protein/mL 6 M Salzsäure vorlag. Das weitere Vorgehen entsprach den Standardbedingungen zur sauren Hydrolyse (Abschnitt 3.7.6). Der trockene Rückstand der Hydrolysate wurde resolubilisiert und der Gehalt der Pyrazinone mit der in Abschnitt 3.3.14 beschriebenen Methode quantifiziert. Die Pyrazinongehalte in den Globinproben ohne Dotierung wurden von den Gehalten in den dotierten Proben abgezogen. Die Gehalte in den dotierten Proben lagen etwa 10-fach höher. Die Stabilität der Pyrazinone wurde als das Verhältnis der wiedergefundenen Stoffmenge eines Pyrazinons zu dessen eingesetzter Stoffmenge berechnet.

### 3.7.7.2 Nachbildung N-terminaler AGEs aus Fru-Val-His

Zur Untersuchung der Nachbildung N-terminaler AGEs aus den N-terminalen Amadori-Produkten wurde ein isoliertes Globin ohne Zusatz, das Globin nach Reduzierung bzw. mit Zusatz des N-terminalen Amadori-Produkt-Dipeptids der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins (Fru-Val-His) hydrolysiert.

Für das Experiment mit Reduzierung wurde analog zu *Hegele et al. (2008a)* vorgegangen. Ca. 6 mg eines isolierten Globins wurden eingewogen und in 3 mL eines 0,2 M Borax-Puffers (pH = 9,5) suspendiert. Dazu wurden 2 mL einer alkalischen 1 M Natriumborhydridlösung zupipettiert und homogenisiert. Zur Reduzierung wurde das Reaktionsgemisch über Nacht stehen gelassen. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 mL 1 M Salzsäure zugegeben. Nach Zusatz weiterer 5 mL 12 M Salzsäure resultierte eine Lösung mit einer 6 M Salzsäurekonzentration. Diese Lösung wurde zur Hydrolyse (23 Stunden, 110 °C) eingesetzt. Nach der Hydrolyse wurde zum Konzentrationsausgleich 1 mL Wasser zugeben, so dass sich eine Konzentration von 6 mg Protein/12 mL (0,5 mg Protein/mL) ergab. Da die Konzentration genau halb so groß war wie in den Hydrolysen ohne Reduzierung, wurden zur Aufkonzentrierung statt 1 mL des Hydrolysats 2 mL eingeengt. Der Rückstand wurde dann in dem gleichen Volumen wie die anderen Proben aufgenommen.

Zur Untersuchung der Nachbildung von 2(1*H*)-Pyrazinonen aus dem N-terminalen Amadori-Produkt wurden 6 mg Globin in 6 mL 6 M Salzsäure gelöst und 12  $\mu$ L einer Fru-Val-His-Lösung zugegeben, so dass die Dotierung 0,55  $\mu$ g (2,6 nmol) Fru-Val-His entsprach. Die Hydrolyse und die Entfernung der Salzsäure wurden wie in Abschnitt 3.7.6 durchgeführt.

Die Hydrolyse des Globins ohne Reduzierung und ohne Zusatz als Vergleichsprobe wurde wie in Abschnitt 3.7.6 angefertigt. Alle Einzelexperimente wurden als Dreifachbestimmung ausgeführt. Die Probenvorbereitung und die Analytik ist in Abschnitt 3.3.14 beschrieben.

#### *Lösungen für die Reduzierung*

HCl (0,02 M)	5 mL HCl (1 M) mit Reinstwasser auf 250 mL auffüllen. Zugabe von einem Kristall Thymol zur Konservierung.
Borax-Puffer (0,2 M)	7.629 g Borax (M = 381,44 g/mol) unter Erwärmung in Reinstwasser lösen und auf 100 mL auffüllen

Natronlauge (0,1 M)	4 g NaOH in Reinstwasser lösen und auf 100 mL auffüllen
alkalische Natriumborhydrid-Lösung (1 M)	3,783 g NaBH <sub>4</sub> in 0,1 M Natronlauge lösen und auf 100 mL auffüllen

### 3.7.8 Statistik

#### *Prüfung auf Unterscheidbarkeit von Probandengruppen*

Bei Prüfungen zweier Probandengruppen auf eine statistische Unterscheidbarkeit hinsichtlich des Gehalts eines MRPs (Mittelwertvergleich) wurde im ersten Schritt mit dem Test nach Shapiro-Wilk auf Normalverteilung geprüft. War die Normalverteilung in beiden Gruppen gegeben wurde der Student-t-Test verwendet. Lag für mindestens eine der Gruppen keine Normalverteilung vor wurde der Mann-Whitney-Test (nichtparametrisch) durchgeführt. Zwei Mittelwerte wurden als signifikant verschieden angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$  betrug.

#### *Prüfung auf Korrelation*

Die Prüfungen wurden mit Hilfe von Origin durchgeführt. Vor der Prüfung zweier Datenreihen auf Korrelation wurde ein Test auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) durchgeführt. Wenn Normalverteilung vorlag, konnte der Test auf Korrelation nach Pearson angewendet werden. Lag für mindestens einen Parameter keine Normalverteilung vor, wurde der Test nach Spearman verwendet. Als signifikant wurden Korrelationen angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$  betrug.

## 3.8 Inkubationsexperimente mit Modellbackwaren

### 3.8.1 Stärke-Peptid-Backmodell

Die Inkubationsexperimente am Stärke-Peptid-Modell wurden von *Franziska Werner (2011)* in ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt. Die Prüfung der verwendeten Weizenstärke auf ihren Stickstoffgehalt mittels Elementaranalyse (nach Abschnitt 3.3.2) ergab, dass diese frei von Stickstoffverbindungen war (*Werner, 2011*). Für die Modellinkubationen wurden 8 g Stärke in 7 mL 0,1 M Natriumphosphatpuffer mit voreingestellten pH-Werten von 5,6, 7,4 bzw. 8,2 suspendiert.

Für Experimente zur Ermittlung des Einflusses von Aminen auf die Bildung von Dicarbonylverbindungen bzw. der Bildung von AGEs wurden dem Phosphatpuffer 9,3 mg Val-Leu · HCl (35  $\mu$ mol) zugesetzt, so dass die Konzentration des Dipeptids in der Modellkruste dem Gehalt freier Aminosäuren in Mehl entspricht (*Werner, 2011*). Für die Erhitzungsexperimente wurden die Suspensionen in Aluminiumschalen so ausgestrichen, dass eine dünne Schicht entsteht. Die Erhitzung erfolgte für 20 min in den offenen Aluminiumschalen bei 220 °C im Inkubationsschrank (Umluft).

Nach dem Erhitzungsprozess wurden die dünnen, hart gebackenen Krusten zerkleinert, homogenisiert und 0,5 g in 5 mL 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 7,4) suspendiert und für 3 Stunden extrahiert. Anschließend wurde 10 Minuten bei 10 000 U/min zentrifugiert. Zu 1000  $\mu$ L des Überstandes wurden 200  $\mu$ l einer 50 mM OPD-Lösung gegeben und nach durchmischen im Dunkeln für 24 Stunden derivatisiert. Die Proben wurden nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 10 000 U/min zur Quantifizierung der Chinoxaline und der N-terminalen AGEs eingesetzt.

#### Lösungen

0,1 mM Phosphatpuffer (pH = 5,6 oder 7,4 oder 8,2) auf 50 mL      0,890 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

50 mM ortho-Phenylendiamin-Lösung (OPD-Lösung) in 10 mL Reinstwasser      54,0 mg OPD

### 3.8.2 Glucose-Peptid-Backmodell

Die Inkubationsexperimente mit den Glucose-Peptid-Backmodellen wurden von *Tina Müller (2012)* in ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt. Bei den Glucose-Peptid-Backmodellen wurde zwischen dem Krumenmodell und dem Krustenmodell unterschieden. Die Zusammensetzung der Teigansätze ist identisch, nur dass aus den Reaktionsansätze des Krustenmodells das Wasser vor der Inkubation durch Gefriertrocknung entfernt wurde. Neben dem Wassergehalt unterscheiden sich die Modelle hinsichtlich der Erhitzungstemperatur, die den realen Bedingungen des Backprozesses von Brötchen angepasst wurde. Das Krumenmodell wurde in einem abgeschlossenen Gefäß bei 100 °C erhitzt und das Krustenmodell in einem offenen Gefäß unter quasi wasserfreien Bedingungen bei 120 °C.

Ein Reaktionsansatz bestand aus 0,8 mL einer 6,25 mM Peptid-Lösung in 0,125 M Phosphatpuffer) und 0,2 mL einer 25 mM Glucose-Lösung, so dass 1 mL Lösung von 5  $\mu$ mol Peptid und 5  $\mu$ mol Glucose in 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 5,6) reslutierten. Dazu wurden 0,5 g mikrokristalline Cellulose eingerieselt, so dass eine homogen durchfeuchtete Masse mit einer ebenen Oberfläche entstand. Die Proben wurden für 40 Minuten in einem vorgeheizten Sandbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben des Krustenmodells mit 3 mL und die Proben des Krumenmodells mit 2 mL 0,01 M Salzsäure für eine Stunde extrahiert. Die Extraktionslösung wurde zur Hydrolyse mit 8 M Salzsäure verwendet. Nach der Hydrolyse wurde FM-Val quantifiziert (Abschnitt 3.3.9). Zur Quantifizierung der AGEs nach Abschnitt 3.3.11 wurde die Extraktionslösung direkt bzw. nach geeigneter Verdünnung ohne Hydrolyse eingesetzt.

#### Lösungen

0,1 mM Phosphatpuffer (1,25-fach, pH = 5,6) auf 250 mL      5,5622 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ,

---

5 mM Glucoselösung (5-fach) auf 25 mL:	112,5 mg Glucose
5 mM Peptidlösungen (1,25-fach) in 25 mL	41,7 mg Val-Leu (VL*HCl)
Phosphatpuffer (1,25-fach)	39,7 mg Val-His
	31,9 mg Val-Ser
	43,8 mg Val-Tyr
	38,5 mg Val-Glu

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Synthese und Charakterisierung N-terminaler Amadori-Produkte und AGEs

Die für die durchzuführenden Experimente und Analytik nötigen N- $\alpha$ -Fructosylderivate und N-terminalen AGEs sind nicht kommerziell erhältlich. Deshalb war es nötig die Substanzen selbst darzustellen. Zur Charakterisierung wurde die relative Molekülmasse mittels direkter ESI-TOF-MS (Abschnitt 3.3.3), die Identität mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie (Abschnitt 3.3.4) und die elementare Zusammensetzung mittels Elementaranalyse (Abschnitt 3.3.2) überprüft. Die Interpretation der NMR-Spektren erfolgte im Vergleich zu den Spektren des unmodifizierten Valins bzw. der unmodifizierten Peptide und im Vergleich der Präparate gleicher Modifizierungsart. Auf diese Weise konnte die Identität der Präparate zuverlässig belegt werden. Die Gehalte der Syntheseprodukte in den Präparaten wurden über den ermittelten Stickstoffanteil berechnet.

#### 4.1.1 Synthese und Charakterisierung von N- $\alpha$ -Fructosyl-Amadori-Produkten

##### 4.1.1.1 Synthese von N- $\alpha$ -Fructosylderivaten

Zur Darstellung von Fru-Val wurde die Erhitzung in methanolischer Lösung verwendet. Die Umsetzung zu den Fructosyldipeptiden erfolgte dagegen ohne Lösungsmittel. Die molaren Ausbeuten beider Methoden waren vergleichbar. Für Fru-Val und Fru-Val-Ser lagen die Ausbeuten beispielsweise bei etwa 25%. Ein Vorteil des Verfahrens mit trockener Erhitzung liegt in der kurzen Inkubationszeit von 20 Minuten. Im Vergleich musste der Reaktionsansatz in Methanol mehrere Stunden unter Rückfluss gekocht werden.

Die Amadori-Produkte Fru-Val und die Fructosyldipeptide wurden synthetisiert, um sie für die Bestimmung der Umsatzrate unter den Bedingungen der Hydrolyse in 6 M Salzsäure zu verwenden. Dafür ist es nicht notwendig die Präparate vollständig zu reinigen. Deshalb wurde bei der Isolierung der Amadori-Produkt-Präparate der Fokus auf die maximale Ausbeute gelegt. Da die Isolierungen für die einzelnen Präparate unterschiedlich effektiv waren, lagen die ermittelten Gehalte der Präparate zwischen 30% und 80%. Die Ausbeute bei den Synthesen von Fru-Val-Ser, Fru-Val-Tyr und Fru-Val-Glu war nur gering. Deshalb wurde auf die Analyse mittels NMR-Spektroskopie verzichtet. Die Struktur der Präparate konnte über die charakteristische Fragmentierung mittels LC-MS/MS belegt werden (Abschnitt 3.3.7).

#### 4.1.1.2 Charakterisierung der Fru-Val-Xaa-Derivate mittels Massenspektrometrie

Zur Bestätigung der Identität der synthetisierten Amadori-Produkte wurden die Fragmentierungsmuster systematisch analysiert. Es wurden Spektren bei den Kollisionsenergien von 5, 10, 20 und 40 eV aufgezeichnet. Bei der Interpretation der Fragmentspektren der untersuchten Amadori-Produkte können mehrere nebeneinander ablaufende Fragmentierungswege formuliert werden. An einigen Stellen kann der Zerfall eines Fragments zu verschiedenen Folgeprodukten führen. Exemplarisch sind einige Fragmentierungswege am Beispiel des Spektrums von Fru-Val-Leu in Abbildung 4-1 dargestellt.

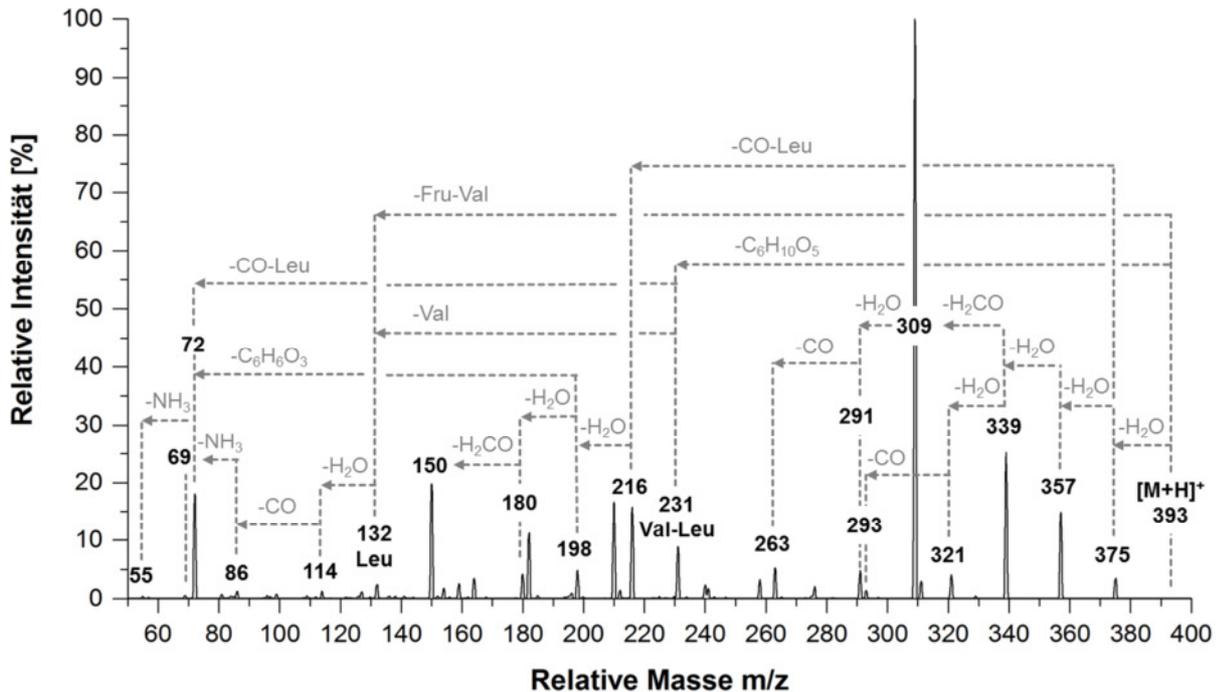


Abbildung 4-1: Fragmentierungsmuster Fru-Val-Leu bei einer Kollisionsenergie von 20 eV.

Der Vergleich der Fragmentierung von Fru-Val bzw. den Fru-Val-Xaa-Dipeptiden ergab ein sehr reproduzierbares Muster. Die Daten zu den charakteristischen Fragmentmassen der einzelnen Amadori-Produkte sind in Tabelle 4-1 angegeben. Bei Kollisionsenergien bis 10 eV dominierten die Abspaltung von ein bis drei Molekülen Wasser und der C-terminalen Carboxylgruppe. Insbesondere bei den Amadori-Produkten der Dipeptide war, nach Verlust von drei Molekülen Wasser, der Masseverlust von  $m/z = 30$  charakteristisch und kann durch die Abspaltung des C-6 des Zuckerrests als Formaldehyd erklärt werden (Abbildung 4-2).

Für alle untersuchten Amadori-Produkte konnten sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Kollisionsenergien die freien Dipeptide bzw. bei Fru-Val das freie Valin als charakteristische Fragmente detektiert werden. Für die Fragmentierung der Dipeptide konnten aus den Spektren zwei Wege abgeleitet werden. Es wurden sowohl die C-terminalen Aminosäuren als auch das N-terminale Fragment  $m/z = 72$  (Val - CO-Xaa) detektiert (Abbildung 4-3). Die freien Aminosäuren können unter Abspaltung von HCOOH ( $m/z = 46$ ) weiter fragmentieren. Aber nur bei Histidin hatte dieses Fragment ( $m/z = 110$ ) eine hohe relative Intensität (20 und 40

eV). Eine Ausnahme wurde für Fru-Val-Ser beobachtet. Freies Serin war nicht detektierbar. Möglicherweise wurde an der Seitenkette des Serins ein Molekül Wasser abgespalten. Die C-terminalen Aminosäuren könnten nach dem gleichen Prinzip auch direkt aus den Amadori-Produkt-Dipeptiden bzw. jedem Fragment mit intakter C-terminaler Aminosäure freigesetzt werden. Bei der Abspaltung von CO-Xaa an der Peptidbindung der Fru(-H<sub>2</sub>O)-Val-Xaa-Derivate kann das N-terminale Fragment  $m/z = 216$  (Fru(-H<sub>2</sub>O)-Val) erklärt werden. Dieses wurde ebenfalls nach Abspaltung der Carboxylgruppe aus Fru-Val beobachtet und die möglichen Fragmente wurden in den Spektren aller Amadori-Produkte detektiert.

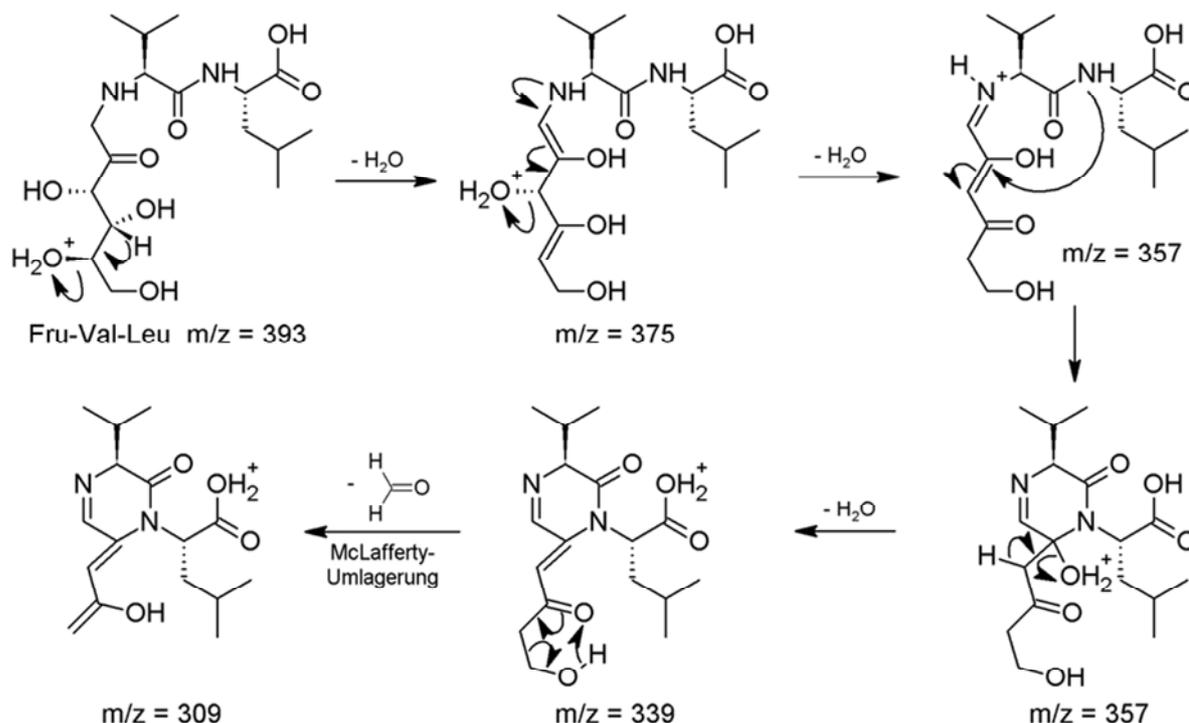


Abbildung 4-2: Fragmentierung von Fru-Val-Leu (offenkettige Form) bis zum Fragment  $m/z = 309$

Tabelle 4-1: Fragmentierung Fru-Val und Fructosyldipeptide

Amadori-Produkt	Precursorion $m/z$ ( $[M+H]^+$ )	Fragmentionen $m/z^a$
Fru-Val	280	262 ( $-H_2O$ ), 244 ( $-2H_2O$ ), 234 ( $-H_2O-CO$ ), 216 ( $-2H_2O, -CO$ ), 198 ( $-3H_2O, -CO$ ), 130 ( $H_2C=Val$ ), 118 (Val), 84 ( $130-H_2O, -CO$ ), 72 (Val - HCOOH)
Fru-Val-Leu	393	375 ( $-H_2O$ ), 357 ( $-2H_2O$ ), 339 ( $-3H_2O$ ), 309 ( $-3H_2O, -H_2CO$ ), 231 (Val-Leu), 216 ( $-CO-Leu$ ), 150 ( $216-2H_2O, -H_2CO$ ), 132 (Leu), 72 ( $231-CO-Leu$ )
Fru-Val-His	417	399 ( $-H_2O$ ), 381 ( $-2H_2O$ ), 363 ( $-3H_2O$ ), 333 ( $-3H_2O, -H_2CO$ ), 255 (Val-His), 216 ( $-CO-His$ ), 150 ( $216-2H_2O, -H_2CO$ ), 156 (His), 110 (His - $H_2O, -CO$ )
Fru-Val-Ser	367	349 ( $-H_2O$ ), 331 ( $-2H_2O$ ), 313 ( $-3H_2O$ ), 295 ( $-4H_2O$ ), 283 ( $-3H_2O, -H_2CO$ ), 205 (Val-Ser), 216 ( $-CO-Ser$ ), 150 ( $216-2H_2O, -H_2CO$ ), 72 ( $205-CO-Ser$ )
Fru-Val-Tyr	443	425 ( $-H_2O$ ), 407 ( $-2H_2O$ ), 389 ( $-3H_2O$ ), 359 ( $-3H_2O, -H_2CO$ ), 281

Amadori-Produkt	Precursorion m/z ([M+H] <sup>+</sup> )	Fragmentionen m/z <sup>a</sup>
Fru-Val	280	262 (- H <sub>2</sub> O), 244 (- 2 H <sub>2</sub> O), 234 (- H <sub>2</sub> O -CO), 216 (- 2 H <sub>2</sub> O, -CO), 198 (- 3H <sub>2</sub> O, -CO), 130 (H <sub>2</sub> C=Val), 118 (Val), 84 (130 - H <sub>2</sub> O, - CO), 72 (Val - HCOOH) (Val-Tyr), 216 (- CO-Tyr), 182 (Tyr), 150 (216 - 2 H <sub>2</sub> O, - H <sub>2</sub> CO), 72 (281 - CO-Tyr)
Fru-Val-Glu	409	391 (- H <sub>2</sub> O), 373 (- 2 H <sub>2</sub> O), 355 (- 3 H <sub>2</sub> O), 325 (- 3 H <sub>2</sub> O, - H <sub>2</sub> CO), 247 (Val-Glu), 216 (- CO-Glu), 150 (216 - 2 H <sub>2</sub> O, - H <sub>2</sub> CO), 148 (Glu), 72 (231 - CO-Glu)

<sup>a</sup> Charakteristische Fragmentationen gemessen im positiven Modus (Abbildung 4-1 zeigt am Beispiel von Fru-Val-Leu Fragmentierungswege für Amadori-Produkte der Form Fru-Xaa-Xaa).

Speziell bei Fru-Val trat ein Fragment auf, das durch die Spaltung zwischen C-1 und C-2 des Zuckerrests erklärt werden kann. Es entsteht das Fragmention m/z = 130 (Val + 12), wobei an das Stickstoffatom des Valins eine CH<sub>2</sub>-Gruppe gebunden ist. Dieses Fragment wurde bereits von *Hau et al. (2004)* und *Davidék et al. (2005)* bei der massenspektrometrischen Analyse von Fructosyl-Amadori-Produkten von Aminosäuren beschrieben (*Davidék et al., 2005; Hau et al., 2004*). In den Spektren der Fructosyldipeptide konnte das Fragment Val-Xaa + 12 nur in Spuren detektiert werden und könnte somit charakteristisch für Fructosylaminosäuren sein.

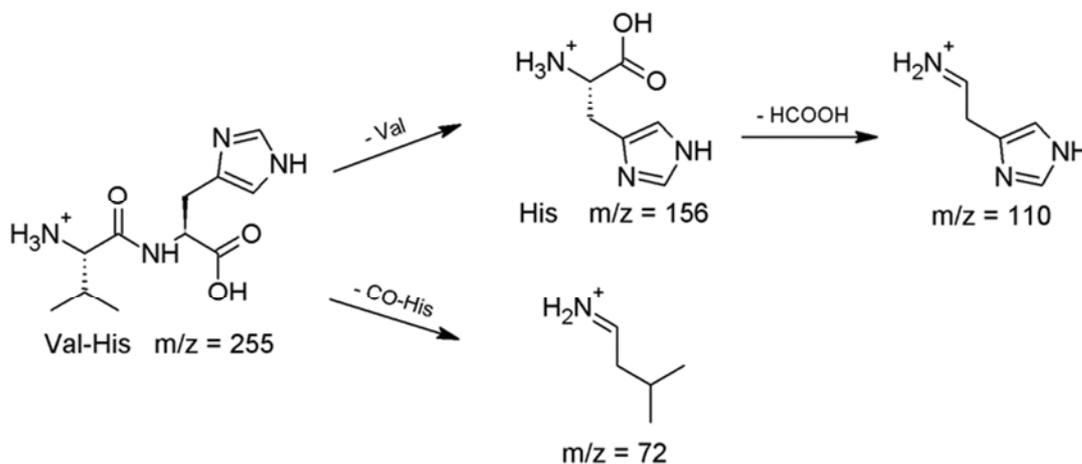


Abbildung 4-3: Fragmentierung von Val-Xaa am Beispiel von Val-His

#### 4.1.2 Umsatzrate von Amadori-Produkten bei der Hydrolyse mit Salzsäure

Das Experiment zur Bestimmung der Umsatzraten der Amadori-Produkte zu FM-Val ist in Abschnitt 3.3.9 beschrieben und die Ergebnisse in Tabelle 4-2 zusammengefasst. Über die Umsatzrate bei definierten Hydrolysebedingungen kann nach Quantifizierung von FM-Val auf die Konzentration des jeweiligen Amadori-Produkts vor der Hydrolyse geschlossen werden. Der entsprechende Korrekturfaktor ergibt sich aus dem Quotienten von 100% und der Umsatzrate in Prozent.

Tabelle 4-2: Umsatzraten von Fru-Val-Amadori-Produkten zu FM-Val nach Umsetzung in Salzsäure

Amadori-Produkt <sup>a</sup>	6 M Salzsäure		8 M Salzsäure	
	Umsatzrate <sup>b</sup> [%]	Korrekturfaktor <sup>b</sup>	Umsatzrate <sup>c</sup> [%]	Korrekturfaktor <sup>c</sup>
Fru-Val	6,0	16,7	8,5	11,7
Fru-Val-Leu	8,2	12,2	10,8	9,3
Fru-Val-His	4,3	23,3	5,2	19,1
Fru-Val-Ser	4,9	20,4	5,5	18,1
Fru-Val-Tyr	8,3	12,1	7,6	13,1
Fru-Val-Glu	7,9	12,6	8,2	12,2

a Synthese der Präparate in Abschnitt 3.2.1; b Hydrolyse: 6 M HCl, 110 °C, 23 h; c Hydrolyse: 8 M HCl, 110 °C, 23 h

Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 beschrieben haben *Penndorf et al. (2007)* und *Wellner et al. (2001)* festgestellt, dass die Umwandlung von N- $\alpha$ -Amadori-Produkten zu Furoylmethylaminosäuren bei der Hydrolyse mit Salzsäure von der N-terminalen Aminosäure beeinflusst wird und konnten individuelle Umsatzraten für eine Auswahl der Amadori-Produkte hydrophober Aminosäuren (Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin) und Lysin bestimmen. Die Spanne lag zwischen 4 und 18%, wobei höhere Ausbeuten bei der Hydrolyse mit 8 M als mit 6 M Salzsäure erzielt wurden (*Penndorf et al., 2007; Wellner, 2012*).

Das in Abschnitt 3.3.9 beschriebene Experiment zur Hydrolyse von Fru-Val und den 5 Fru-Val-Xaa-Dipeptiden hat Umsätze im Bereich von 4 bis 11% ergeben (Tabelle 4-2). Damit wurde gezeigt, dass nicht nur die N-terminale Aminosäure den Umsatz entscheidend beeinflusst sondern bei gleicher N-terminaler Aminosäure auch die zweite Aminosäure ausgehend vom N-Terminus.

*Penndorf et al. (2007)* ermittelten eine Umsatzrate für Lactulosylvalin nach Hydrolyse mit 8 M Salzsäure von 6,3% und *Wellner (2012)* für Fru-Val von 14,4% mit 8 M Salzsäure bzw. 9,3% mit 6 M Salzsäure. In dieser Arbeit wurde eine Umsatzrate für Fru-Val von 8,5% mit 8 M Salzsäure und 6,0% mit 6 M Salzsäure ermittelt. Somit hat *Wellner (2012)* jeweils einen um etwa den Faktor 1,5 höheren Wert erhalten. Der Einfluss des Zuckerrests, also des Lactulosylrests bei *Penndorf et al. (2007)* im Unterschied zum Fructosylrest in dieser Untersuchung, kann einen gewissen Einfluss haben, was *Krause et al. (2003)* am Beispiel von N- $\epsilon$ -Lactulosyllysin im Vergleich zu N- $\epsilon$ -Fructosyllysin zeigen konnten. Damit ist ein Unterschied von 2% möglicherweise erklärbar.

Ein möglicher Einfluss einer zweiten oder dritten Aminosäure eines Peptids bei gleich bleibender N-terminaler Aminosäure wurde von *Kunert (2009)* am Beispiel der Lactulosylderivate von Ala, Ala-Gly sowie Ala-Gly-Gly untersucht. Dabei konnten vergleichbare Umsatzraten der Amadori-Produkte zu FM-Ala ermittelt werden (*Kunert, 2009*). Für die untersuchten Valyl-Dipeptid-Amadori-Produkte wurden Umsatzraten zu FM-Val ermittelt, die sowohl unter als auch über der Umsatzrate für Fru-Val lagen (Tabelle 4-2). Somit kann die Übereinstimmung der Umsatzraten der Amadori-Produkte von Alanin bzw. den Alanylpeptiden bei *Kunert (2009)* zufällig aufgetreten sein.

### 4.1.3 N-terminale pK<sub>S</sub>-Werte von Valyl-Dipeptiden

Die pK<sub>S</sub>-Werte der protonierbaren funktionellen Gruppen von Valin und den Valyl-Peptiden wurden mit der in Abschnitt 3.5 beschriebenen Methode ermittelt (Tabelle 4-3). Der ermittelte Wert für den pK<sub>S</sub>-Wert der N-terminalen Aminogruppe des Valins beträgt 9,26 und liegt damit niedriger als der Literaturwert von 9,62 (*Belitz et al., 2008*). Die Deprotonierung der Carboxylgruppe des Valins konnte mit dem verwendeten Versuchsaufbau nicht empfindlich genug erfasst werden.

Aus den Werten in Tabelle 4-3 wird ersichtlich, dass sich die pK<sub>S</sub>-Werte der N-terminalen Aminogruppe der Valyl-Dipeptide in Abhängigkeit von der zweiten Aminosäure unterscheiden können. Für Val-Leu und Val-Ser wurde der gleiche pK<sub>S</sub>-Wert von 7,75 bestimmt. Der pK<sub>S</sub>-Wert der N-terminalen Aminogruppe von Val-Tyr liegt bei 7,61 und damit tiefer. Für Val-His wurde mit pK<sub>S</sub> = 7,96 annähernd der gleiche Wert bestimmt wie für Val-Glu mit pK<sub>S</sub> = 7,99.

Im Vergleich bestimmten *Hill und Davis (1967)* für Val-Leu mit einer potentiometrischen Methode den pK<sub>S</sub>-Wert 7,90. Dieser liegt nur 0,15 pH-Einheiten über dem ermittelten pK<sub>S</sub>-Wert von 7,75 (*Hill and Davis, 1967*). Grundsätzlich liegen die ermittelten pK<sub>S</sub>-Werte der N-terminalen Aminogruppen der Dipeptide in Tabelle 4-3 im Vergleich zu anderen Peptiden (7,7 bis 9,1) in einer sinnvollen Größenordnung (*Belitz et al., 2008*).

Tabelle 4-3: pK<sub>S</sub>-Werte von Valin und Valyldipeptiden

Aminosäure/Peptid	pK <sub>S1</sub>	pK <sub>S2</sub>	pK <sub>S3</sub>
Valin	n.e.	<b>9,26 ± 0,26</b>	
Val-Leu	3,49 ± 0,01	<b>7,75 ± 0,04</b>	
Val-His	2,25 ± 0,01	6,59 ± 0,01	<b>7,96 ± 0,03</b>
Val-Ser	3,09 ± 0,01	<b>7,75 ± 0,03</b>	
Val-Tyr	2,76 ± 0,01	<b>7,61 ± 0,02</b>	10,12 ± 0,04
Val-Glu	2,77 ± 0,01	4,59 ± 0,02	<b>7,99 ± 0,06</b>

Mittelwert ± Standardabweichung; n.e. - nicht erfasst; **hervorgehoben**: pK<sub>S</sub>-Wert der N-terminalen Aminogruppe.

Aus den ermittelten pK<sub>S</sub>-Werten für die N-terminale Aminogruppe der untersuchten Dipeptide lässt sich eine Basizitätsreihe aufstellen:

$$\begin{array}{ccccccc} \text{Val-Tyr} & < & \text{Val-Leu} & = & \text{Val-Ser} & < & \text{Val-His} & \leq & \text{Val-Glu} \\ 7,61 & < & 7,75 & = & 7,75 & < & 7,96 & \leq & 7,99 \end{array}$$

Die Basizität ist ein Maß für die Fähigkeit einer funktionellen Gruppe als Protonenakzeptor bzw. Elektronenpaardonator (Nukleophil) zu wirken. Damit lässt sich über den Vergleich der pK<sub>S</sub>-Werte der Valyl-Dipeptide ableiten, wie stark die N-terminale Aminogruppe bei einem bestimmten pH-Wert, beispielsweise 7,4, protoniert bzw. deprotoniert vorliegt. Da nur deprotonierte Aminogruppen ein freies Elektronenpaar aufweisen, um nukleophil an Carbonylfunktionen anzugreifen, ist einerseits ein höherer Anteil deprotonierter Aminogruppen

günstig für den Umsatz, andererseits ist die Fähigkeit einer stärker nukleophilen Gruppe diese Carbonylfunktion anzugreifen höher. Basizität und Nukleophilie stehen damit bei der Betrachtung der Reaktivität in Konkurrenz.

#### 4.1.4 Synthese von Furoylmethylvalin (FM-Val)

Die Darstellung von FM-Val ist in Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Die Identifizierung des Präparats erfolgte über die Molekülmasse und die NMR-Spektren. Zur weiteren Charakterisierung diente das charakteristische Fragmentspektrum wie in Abbildung 4-29.

Die zweistufige Synthesestrategie zur Darstellung von FM-Val orientierte sich an der Vorgehensweise zur Analytik von Amadori-Produkten nach saurer Hydrolyse und hat nur eine geringe Ausbeute erbracht. Zum Vorteil des zweiten Syntheseschritts und zur Vermeidung von möglichen Nebenreaktionen sollte ergänzend zum beschriebenen Vorgehen die überschüssige Glucose entfernt werden. Dazu empfiehlt es sich die Kationenaustauscherchromatographie nach Umsatz von Valin mit Glucose anzuwenden, wie bei der Synthese der Amadori-Produkte beschrieben wurde.

Der Umsatz zum Fru-Val im ersten Syntheseschritt sollte eine Ausbeute von etwa 55% ergeben haben, wie die Synthese von Fru-Val zeigte (Abschnitt 3.2.1). Wenn dazu der Umsatz von Fru-Val zu FM-Val in 8 M Salzsäure von 6,3% nach *Kunert (2009)* bzw. nach *Wellner (2012)* von 14,4% berücksichtigt wird, ist eine Ausbeute zwischen 3,5% und 8% zu erwarten. Damit liegt die geringe Ausbeute von 5,6% für FM-Val nach der angewendeten Synthesestrategie in der zu erwartenden Größenordnung.

#### 4.1.5 Synthese von 2(1H)-Pyrazinonen

*Amon (2010)* untersuchte verschiedene Synthesestrategien zur Darstellung von 2(1H)-Pyrazinonen. Die Methode nach *Krause et al. (2004)* (0,1 M Phosphat-Puffer, 37 °C, 14 d) wurde mit der nach *Van Chuyen (1973b)* (0,5 M Acetat-Puffer, 100 °C, 1,5 h) und einer Synthese in organischem Lösungsmittel (Methanol, 60 °C, 6 h) verglichen. Die Konzentrationen der Edukte Val-Leu bzw. Val-His (3,125 mM) und Glyoxal (5mM) in den Reaktionsansätzen waren bei allen Varianten gleich. Der geringste Umsatz zu den 2(1H)-Pyrazinonen wurde in den Reaktionsansätzen in Methanol beobachtet und in den HPLC-Chromatogrammen dieser Reaktionsansätze wurden mehrere Produktpeaks detektiert. Die Reaktionsansätze nach *Krause et al. (2004)* bzw. *van Chuyen (1973b)* ergaben das 2(1H)-Pyrazinonen als dominierendes Reaktionsprodukt. Die semiquantitative Auswertung des UV-Signals bei 320 nm zeigte, dass die Methode nach *Krause et al. (2004)* zwar eine lange Inkubationszeit erforderte, aber die höchste Ausbeute versprach.

Die Synthesen der GO-2(1H)-Pyrazinone ausgehend von den fünf Dipeptiden nach der Methode nach *Krause et al. (2004)* ergaben dennoch meist mäßige Ausbeuten von unter 10% (Abschnitt 3.2.3). Als weitere Variante wurde die Synthese der MGO-2(1H)-Pyrazinone von

Val-Leu und Val-His unter trockenen Bedingungen bei Temperaturen von ca. 190 °C, pH = 9,0 und Inkubationszeiten von 10 bzw. 30 Minuten durchgeführt (Losinski, 2012). Damit konnte die Ausbeute nicht erhöht werden.

Ein alternativer Syntheseweg zur Darstellung von 2(1*H*)-Pyrazinonen könnte die Strategie zur selektiven Einführung von MG-H1 in Arginyl-Peptide nach Hellwig (2011) sein, da der nukleophile Angriff einer Aminogruppe auf die Carbonyl-Funktion der Dicarbonylverbindung sowohl bei der MG-H1-Bildung als auch bei der Bildung von 2(1*H*)-Pyrazinonen der initiale Reaktionsschritt ist. Die Peptide wurden in 12 M Salzsäure für 4 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt und Ausbeuten der MG-H1-Peptide von ca. 30% erzielt. Bei der hohen Protonenkonzentration des Reaktionsansatzes sollte die Guanidino-Funktion des Arginins bzw. die N-terminale Aminogruppe von Peptiden maximal protoniert und damit unreaktiver sein. Doch Hellwig (2011) vermutete, dass dieser Nachteil durch die Erhöhung der Carbonylreaktivität des Methylglyoxals kompensiert und überstiegen wird (Hellwig, 2011).

Zur Reinigung bzw. Isolierung von 2(1*H*)-Pyrazinonen war die semi-präparative RP-HPLC ein effektives Verfahren (Abschnitt 3.2.3). Die IEC, wie für das GO-Val-Glu-2(1*H*)-Pyrazinon beschrieben, erwies sich als ungeeignet, da das 2(1*H*)-Pyrazinon sehr stark an das Ionentauschermaterial gebunden hatte. Die Elution war erst unter Zusatz von 20% Ethanol möglich, was vermuten lässt, dass hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Polymer des Ionentauschermaterials auftraten.

#### 4.1.6 Synthese von Carboxyalkylderivaten

Die Darstellung der Carboxyalkylderivate ist in Abschnitt 3.2.4 beschrieben. Die Identifizierung der Präparate erfolgte über die relativen Molekülmassen und die NMR-Spektren. Zur weiteren Charakterisierung dienten charakteristische Fragmentspektren wie in Abbildung 4-31.

Für die Synthese der Carboxyalkylderivate von Valin und Valyl-Dipeptiden konnte die reduktive Alkylierung mit einem Palladium-Aktivkohle-Katalysator unter Wasserstoffatmosphäre erfolgreich eingesetzt werden. Besonders bei der Umsetzung mit Valin und hydrophoben Valyl-Dipeptiden wurden hohe Ausbeuten erzielt. Als Ausnahme war die Ausbeute für CM-Val-His sehr gering. Möglicherweise könnte als alternative Reinigungsmethode statt der Anionenaustauscherchromatographie ein Kationenaustauschermaterial verwendet werden.

## 4.2 Sequenzabhängige Bildung N-terminaler MRPs unter physiologischen Bedingungen

Für humanes Hämoglobin ist bekannt, dass die N-terminale Aminogruppe an der  $\beta$ -Kette deutlich stärker mit Glucose zum Amadori-Produkt umgesetzt wird als an der  $\alpha$ -Kette (Abschnitt 2.1.1.5). Bei den am weitesten verbreiteten genetischen Variante des Hämoglobins beginnt die N-terminale Sequenz der  $\alpha$ -Kette mit Val-Leu und der  $\beta$ -Kette mit Val-His

(Abschnitt 2.3.3). Wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben ist, werden verschiedene Einflussfaktoren der Mikroumgebung des N-Terminus der  $\beta$ -Kette als Ursache für die bevorzugte Glykierung betrachtet. Hier sollte genauer untersucht werden, welchen Einfluss die Aminosäuresequenz am Beispiel der ersten zwei Aminosäuren auf die Reaktion der N-terminalen Aminogruppe mit Glucose hat. Es wurden die Dipeptide Val-Leu (unpolar) und Val-His (basisch) mit Glucose umgesetzt. Um den Einfluss der funktionellen Gruppe der Seitenkette der zweiten Aminosäure des Dipeptids besser einschätzen zu können, wurden außerdem Val-Ser (polar), Val-Tyr (aromatisch) und Val-Glu (sauer) verwendet (Abbildung 4-4).

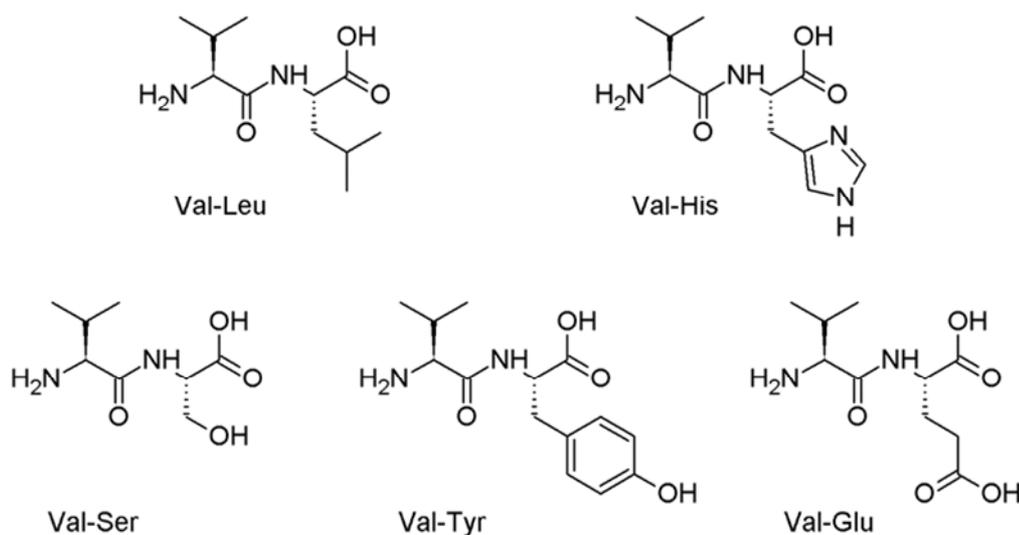


Abbildung 4-4: Dipeptide der Struktur Val-Xaa zur Verwendung für Inkubationsexperimente

## 4.2.1 Umsatz von Dipeptiden mit Glucose im physiologischen Modell

### 4.2.1.1 Quantifizierung von Amadori-Produkten

Die Dipeptide wurden unter physiologischen Bedingungen (37 °C, pH = 7,4, PBS-Puffer) äquimolar mit Glucose für 14 Tage inkubiert (Abschnitt 3.6.1). Zur Quantifizierung des Umsatzes zu den N- $\alpha$ -Fructosylvalylpeptiden wurden Aliquote der Inkubationslösungen in 6 M Salzsäure hydrolysiert, wobei aus den Amadori-Produkten FM-Val gebildet wurde. Nach der Hydrolyse wurde FM-Val über die Intensität des UV-Signals bei 280 nm quantifiziert (Abschnitt 3.3.9), da die Intensität des UV-Signals trotz der geringen Konzentration ausreichend hoch und deutlich stabiler bzw. reproduzierbarer als das Signal des Massendetektors war. Aus den gemessenen Gehalten für FM-Val in den hydrolysierten Proben wurde nach Berücksichtigung der individuellen Umsatzraten (Tabelle 4-2) die Konzentration der N- $\alpha$ -Fructosylvalylpeptide in den Inkubationslösungen ermittelt. Durch Bezug auf die eingesetzte Peptidkonzentration konnte anschließend der Umsatz des jeweiligen Dipeptids zum N- $\alpha$ -Amadori-Produkt berechnet werden.

In Abbildung 4-5 sind Chromatogramme der FM-Val-Analytik ( $\lambda = 280$  nm) in Proben der Inkubationsexperimente unter physiologischen Bedingungen dargestellt. Im Chromatogramm

einer Blindwertprobe mit 0 Tagen Inkubationszeit (c) ist kein Peak für FM-Val zu erkennen. Dagegen wurde in der Probe nach 14 Tagen Inkubationszeit (b) ein Peak mit der gleichen Retentionszeit wie im Chromatogramm des Referenzstandards (a) detektiert.

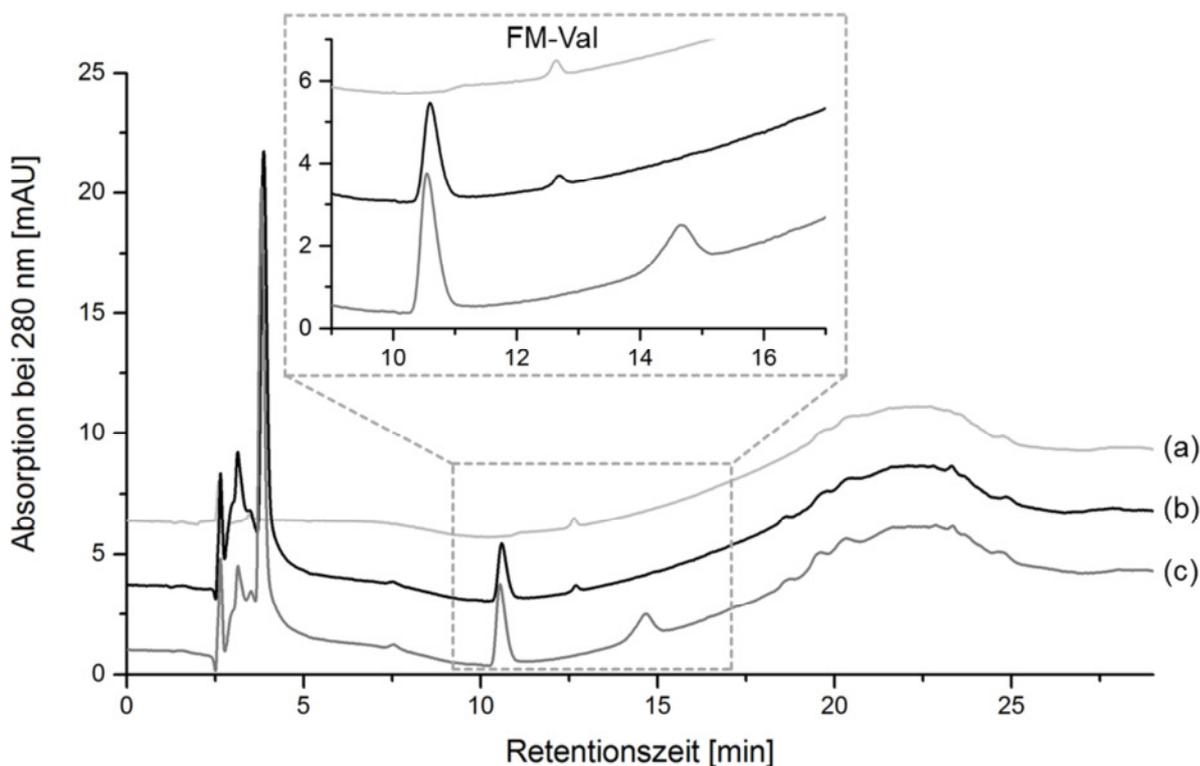


Abbildung 4-5: Exemplarisches RP-HPLC-Chromatogramm der Inkubationsexperimente des Glucose-Peptid-Modells (Val-Ser) unter physiologischen Bedingungen (37°C, pH = 7,4); Detektion von FM-Val bei  $\lambda = 280$  nm; (a) FM-Val-Standard; (b) Val-Ser + Glucose nach 14 Tagen Inkubationszeit; (c) Val-Ser + Glucose nach 0 Tagen Inkubationszeit.

#### 4.2.1.2 Initiale Phase der Amadori-Produkt-Bildung

In Abbildung 4-6 sind die Umsätze der Dipeptide mit Glucose zum Amadori-Produkt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt. Am ersten Tag der Inkubation der Dipeptide mit Glucose war die Bildung der Amadori-Produkte dominierend. Doch mit fortschreitendem Reaktionsverlauf zu Tag 2 und Tag 6 stagnierte die Zunahme und nach 14 Tagen Inkubationszeit waren geringere Gehalte quantifizierbar. Da die Konzentration der Amadori-Produkte unter 1 mmol/mol bezogen auf die Konzentration der eingesetzten Edukte lag, sollte die Verfügbarkeit des jeweiligen Peptids bzw. der Glucose für die Umsetzung zum Amadori-Produkt nicht limitierend gewesen sein. Die Ursachen für die geringe Zunahme bzw. das Sinken der Konzentration der Amadori-Produkte nach Tag 1 der Inkubationszeit müssen folglich Reaktionen sein, die einen großen Teil des gebildeten Amadori-Produkts abbauen. Bildung und Abbau finden dabei zeitgleich statt. Die quantitativ wichtigsten Abbauewege führen über das 1,2-Enol bzw. das 2,3-Enol als Zwischenstufen, die weiter zu den primären Abbauprodukten 1-DG und 3-DG reagieren. Diese können anschließend zu kurzkettingen Produkten fragmentieren (Abschnitt 2.1.1.6 bzw. 2.1.2.1).

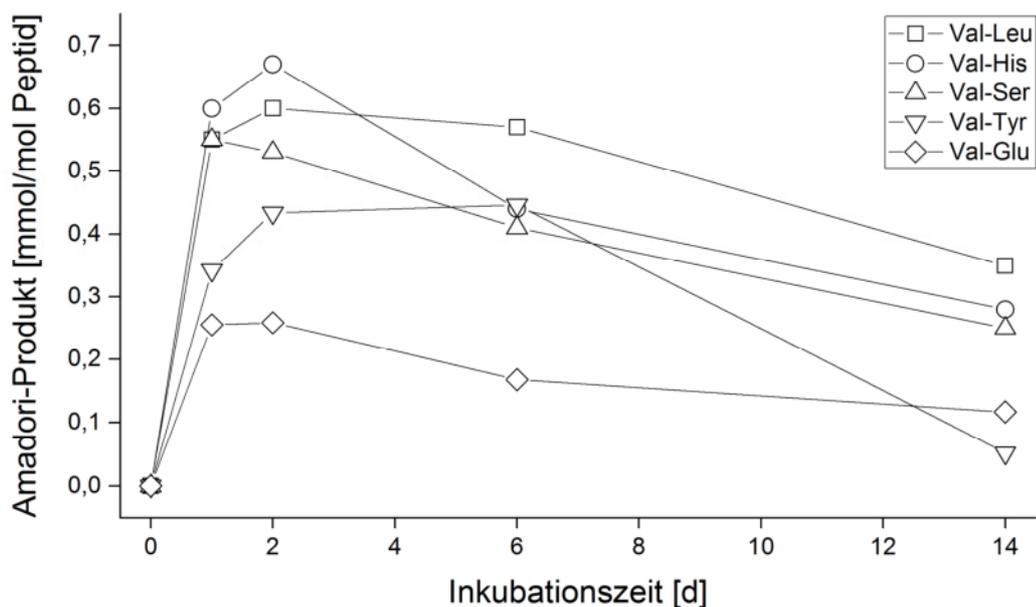


Abbildung 4-6: Gehalt der Fru-Val-Xaa-Amadori-Produkte nach Inkubation (Abschnitt 3.6.1) der Val-Xaa-Dipeptide (5 mM) mit Glucose (5 mM) unter physiologischen Modellbedingungen (pH = 7,4, 37°C, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) für 14 Tage.

Wie in Tabelle 4-4 dokumentiert ist, war der pH-Wert der Inkubationslösungen für alle Peptide bis Tag 2 konstant, sank aber schon nach 6 Tagen auf Werte zwischen pH = 7,1 und 6,9 ab. Die Kapazität des verwendeten PBS-Puffers konnte die pH-Wertabsenkung nicht ausreichend kompensieren. Das Sinken des pH-Werts wurde bereits in ähnlichen Experimenten beschrieben und kann damit begründet werden, dass bei Abbaureaktionen des Amadori-Produkts und insbesondere im pH-Bereich über 7,0 erhebliche Anteile (> 50 mol-%) in Essigsäure und Ameisensäure umgewandelt werden können (Davidek *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2003). Deren Entstehung kann mit der hydrolytischen Dicarbonylspaltung von 1-DG (Essigsäure) bzw. 3-DG (Ameisensäure) erklärt werden (Brands and van Boekel, 2002; Smuda and Glomb, 2013). Damit kann das Absinken des pH-Werts als Beleg für Abbaureaktionen angesehen werden.

Tabelle 4-4: Entwicklung des pH-Werts während der Inkubation der Peptide mit Glucose in PBS-Puffer

Peptid	Inkubationszeit [d]				
	0	1	2	6	14
Val-Leu	7,40	7,38	7,42	7,09	6,90
Val-His	7,40	7,32	7,40	7,11	6,90
Val-Ser	7,40	7,37	7,44	6,91	6,71
Val-Tyr	7,40	7,32	7,44	7,05	6,95
Val-Glu	7,40	7,37	7,38	7,06	6,78

#### 4.2.1.3 Vergleich der Reaktivität der Dipeptide zu N-terminalen Amadori-Produkten

Zum Vergleich der Bildung der Amadori-Produkte der Val-Xaa-Dipeptide werden die Umsätze nach 24 Stunden Inkubationszeit (37 °C, PBS-Puffer, pH = 7,4) verwendet (Abbildung 4-6), da Abbaureaktionen zu diesem Zeitpunkt noch am geringsten sein sollten und den quantifizierbaren Gehalt am wenigsten beeinflussten. In Abbildung 4-7 sind die Ergebnisse der Dreifachbestimmung mit den entsprechenden Fehlerindikatoren dargestellt. Der relativ geringe Gesamtumsatz der Peptide zu den Amadori-Produkten unter 1 mmol/mol ist in guter Übereinstimmung mit der Beobachtung von *Jakas et al. (2008)*. Dort konnte mittels einer RP-HPLC-UV Analytik in Inkubationsproben mit äquimolarem Verhältnis eines Tetrapeptids zu Glucose unter physiologischen Modellbedingungen (10 mmol/L, 37 °C, 0,05 M Phosphat-Puffer) selbst nach 4 Wochen keine Umsetzung zum Amadori-Produkt detektiert werden, obwohl das Tetrapeptid sowohl über eine freie N-terminale als auch eine N- $\epsilon$ -Aminogruppe (Lysin) verfügte. Nur in Inkubationsexperimenten mit 15-fachem bzw. 150-fachem Überschuss an Glucose wurden Amadori-Produkte detektiert. Dass *Jakas et al. (2008)* keinen Abbau bzw. keine Abnahme der Konzentration des Amadori-Produkts beobachteten, ist vermutlich auf den hohen Überschuss der Glucose zurückzuführen (*Jakas et al., 2008*).

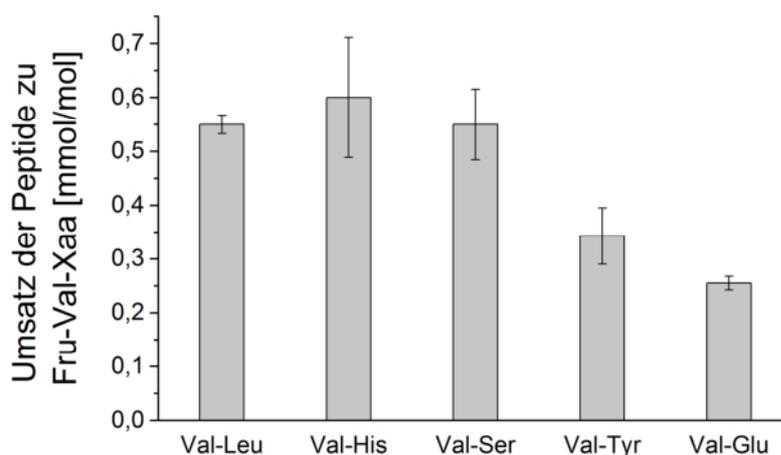


Abbildung 4-7: Umsatz der Val-Xaa-Dipeptide (5 mM) zu den Fru-Val-Xaa-Amadori-Produkten nach 1 Tag Inkubation mit Glucose (5 mM) unter physiologischen Modellbedingungen (pH = 7,4, 37°C, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS))

Wie aus Tabelle 4-5 ersichtlich wird, folgt die Ordnung des Umsatzes zu den Amadori-Produkten dem aufsteigenden  $pK_S$ -Wert der N-terminalen Aminogruppe der jeweiligen Dipeptide. Damit ist der Umsatz zum Amadori-Produkt höher, je höher die Basizität und die Nukleophilie der N-terminalen Aminogruppe sind. Eine Ausnahme von dieser Regel ist das Peptid Val-Glu. Nach dem  $pK_S$ -Wert bzw. der Nukleophilie müsste der Umsatz zu Fru-Val-Glu in der Größenordnung von Val-His liegen.

Wie in Abbildung 4-8 dargestellt ist, könnte die Basizität des Stickstoffatoms der Schiff'schen Base als Triebkraft über eine direkte unimolekulare Reaktion die Deprotonierung an C-2 und damit die Tautomerisierung zum 1,2-Enaminol erleichtern. Damit würde die höhere Basizität

bzw. Nukleophilie der Aminogruppe den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Bildung des Amadori-Produkts katalysieren.

Tabelle 4-5: Gegenüberstellung des  $pK_S$ -Werts bzw. der Nukleophilie der N-terminalen Aminogruppe mit der Reaktivität zum Amadori-Produkt

Reihenfolge der $pK_S$ -Werte (Abschnitt 4.1.3)	Val-Tyr	<	Val-Leu	=	Val-Ser	<	Val-His	≤	Val-Glu
	7,61	<	7,75		7,75	<	7,96	≤	7,99
aufsteigende Reihenfolge der initialen (Tag 1) Bildung des Amadori-Produkts (Abbildung 4-7)	Val-Glu	<	Val-Tyr	<	Val-Leu	=	Val-Ser	<	Val-His

Diese Argumentation wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins in einem deutlich höheren Maß das Amadori-Produkt bildet als eine  $\alpha$ -Aminogruppe, wie u.a. von *Jakas et al. (2008)* in Glykierungsexperimenten mit dem Tetrapeptid Leu-Ser-Lys-Leu gezeigt wurde (*Jakas et al., 2008*). Eine ähnliche Beobachtung machten *Watkins et al. (1985)* bei der Untersuchung der Glykierung von RNase. Sie fanden entsprechend dem niedrigeren  $pK_S$ -Wert höhere Gehalte der Schiff'schen Base am N-Terminus, aber einen höheren Gehalt des Amadori-Produkts an der Seitenkette des Lysins (*Watkins et al., 1985*). Dabei ist zu berücksichtigen, dass der  $pK_S$ -Wert der  $\epsilon$ -Aminogruppe über 9,5 und der  $pK_S$ -Wert der  $\alpha$ -Aminogruppe um 7,5 liegt. Die Basizität und die Nukleophilie der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins sind also deutlich höher.

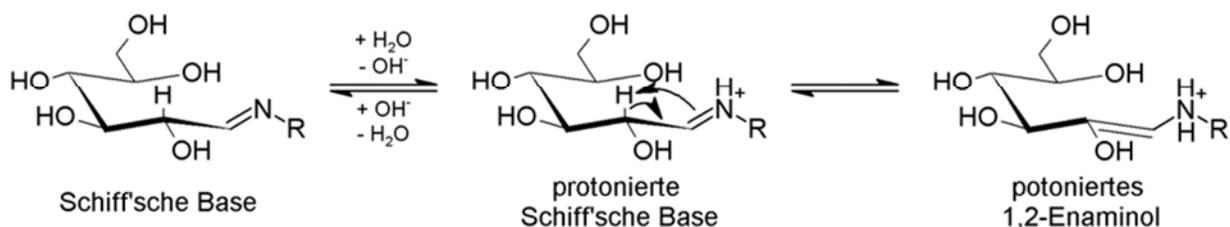


Abbildung 4-8: Hohe Nukleophilie der Aminofunktion als Triebkraft bei der Tautomerisierung der Schiff'schen Base zum 1,2-Enaminol.

#### 4.2.1.4 Einfluss des Nachbargruppeneffekts auf die Bildung des Amadori-Produkts

In Experimenten mit Di-, Tri- und Oligopeptiden wurde der Einfluss von funktionellen Gruppen der Seitenketten von Aminosäuren auf die Reaktion von Aminogruppen mit Glucose bzw. Glycerinaldehyd untersucht. *Mori et al. (1989)* fanden im Vergleich zu Peptiden mit neutralen Seitenketten, dass Peptide mit Histidin in zweiter Position vom N-Terminus stärker und mit Asparaginsäure in zweiter Position schwächer mit Glycerinaldehyd reagierten. *Venkatraman et al. (2001)* untersuchten an einem Oligopeptide mit 15 Aminosäuren, welchen Einfluss die räumlich nahestehenden Seitenketten von Histidin bzw. Asparaginsäure auf die Glykierung an der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins haben. Sie beobachteten eine stärkere Glykie-

rung bei Anwesenheit der basischen Seitenkette des Histidins bzw. der sauren Seitenkettenfunktion der Asparaginsäure im Vergleich mit dem Peptid mit neutralen Seitenketten. Damit erscheint der Effekt einer benachbarten basischen Funktion übereinsimmend förderlich und einer sauren Funktion widersprüchlich.

Im Vergleich der fünf Dipeptide hat Val-His den höchsten Umsatz zum Amadori-Produkt. Val-His ist aber auch das Peptide mit dem höchsten  $pK_S$ -Wert der  $\alpha$ -Aminogruppe, so dass der höhere Umsatz im Vergleich zu den Peptiden Val-Leu und Val-Ser schon mit der stärkeren Basizität und Nukleophilie der  $\alpha$ -Aminogruppe erklärt werden könnte. Wie stark die katalytische Protonenabstraktion durch die Seitenkette des Histidins in diesem Experiment zusätzlich zur Umlagerung der Schiff'schen Base zum Amadori-Produkt beiträgt, konnte nicht geklärt werden.

Der geringe Umsatz von Val-Glu zum Amadori-Produkt muss auf dem Einfluss der zusätzlichen Carboxylgruppe beruhen, da der  $pK_S$ -Wert der N-terminalen Aminogruppe eine deutlich höhere Reaktivität erwarten ließe.

*Lamberts et al. (2008)* beobachteten beim Umsatz von Aminosäuren mit Glucose, dass die Konzentration der Glucose bei Anwesenheit von Glutaminsäure sehr viel weniger abnahm als bei anderen Aminosäuren. Bei Glutamin, das statt der Carboxylgruppe eine Amidgruppe in der Seitenkette trägt, war der Umsatz schon höher. Bei  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), die der Glutaminsäure ohne die  $\alpha$ -Carboxylgruppe entspricht, bzw. Leucin, das vereinfacht betrachtet die Glutaminsäure ohne die  $\gamma$ -Carboxylgruppe darstellt, stieg der Umsatz noch weiter (*Lamberts et al., 2008*). Dabei lässt sich aus den Ergebnissen von *Lamberts et al. (2008)* zwischen der Reaktivität gegenüber Glucose und dem  $pK_S$ -Wert kein Zusammenhang finden ( $pK_S$ -Wert: Gln (9,13) < Leu (9,60) < Glu (9,67) < GABA (10,56); Umsatz mit Glucose: Glu < Gln < Leu = GABA). Aus diesem Vergleich lässt sich ein nachteilige Einfluss von intramolekular nahestehenden Carboxylgruppen auf den Umsatz von Aminofunktionen mit Glucose ableiten (Abbildung 4-9).

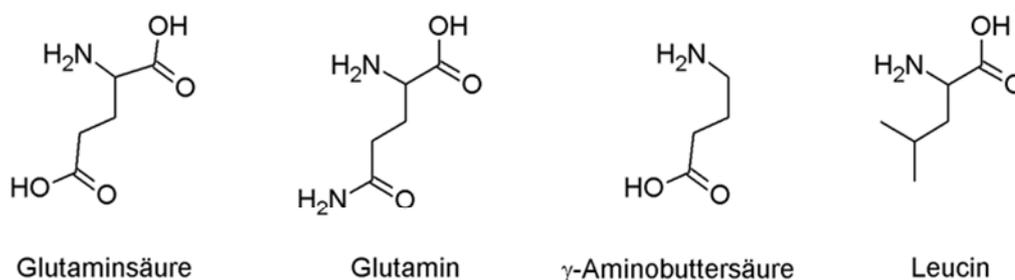


Abbildung 4-9: Vergleich der Strukturen von Glutaminsäure, Glutamin,  $\gamma$ -Aminobuttersäure und Leucin

Der gleiche Effekt ist möglicherweise für die Steigerung des Umsatzes bei der Kettenverlängerung von Aminosäuren zu Dipeptiden und weiter zu Tripeptiden verantwortlich. In den Experimenten von *Mori et al. (1989)* hat die Kettenverlängerung von Val zu Val-Gly den Umsatz ca. um Faktor 4 erhöht. Mit der Verlängerung von Gly-Ser auf Gly-Ser-Gly wurde

sogar eine Erhöhung des Umsatzes um Faktor 3-5 erreicht. Für die Änderung des  $pK_S$ -Werts der N-terminalen Aminogruppe mit der Kettenverlängerung von einer Aminosäure zum Dipeptid wurde in Abschnitt 2.1.1.3 ( $pK_S$ -Wert N- $\alpha$ -Aminogruppe: Lys (8,9)  $\gg$  Lys-Lys (7,5)  $>$  Lys-Lys-Lys (7,3)) und auch von *Krause (2005)* ( $pK_S$ -Wert N- $\alpha$ -Aminogruppe: Phe (9,13)  $\gg$  Phe-Gly (7,55)  $>$  Phe-Gly-Gly (7,39)) ein großer Sprung beschrieben, wogegen die Änderung vom Dipeptid zum Tripeptid deutlich geringer war. Aus diesen Fakten lässt sich ableiten, dass die Größenordnung der Erhöhung der Reaktivität der N- $\alpha$ -Aminogruppe bei Kettenverlängerung vermutlich nur wenig mit der Änderung ihres  $pK_S$ -Werts und dafür stärker mit der negativen Ladung der C-terminalen Carboxylgruppe zusammenhängt.

*Mori et al. (1989)* konnten weiterhin zeigen, dass die Blockade der C-terminalen Aminogruppe des Dipeptids Val-Leu den Umsatz mit Glycerinaldehyd im Vergleich zu einem weiteren Peptid mit neutralen Seitenketten (Ala-Gly) verdoppelte. Der Umsatz lag dann im Bereich der Dipeptide Leu-Arg und Val-His, die eine basische Aminosäure in C-terminaler Position haben. *Mori et al. (1989)* schlussfolgerten, dass die Nettoladung der C-terminalen Aminosäure die Reaktivität des N-Terminus bestimmen könnte.

Da in Val-Glu sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\gamma$ -Carboxylgruppe in wässriger Lösung bei pH-Werten über 7 vollständig deprotoniert vorliegen sollten ( $pK_S(\alpha\text{-COOH}) = 2,8$ ;  $pK_S(\gamma\text{-COOH}) = 4,6$ ), ist zu vermuten, dass die starke negative Ladung das Molekül gegen Basen wie Hydroxidionen abschirmt. Zusätzlich sind die Carboxylgruppen selbst nur schwache Basen, so dass sie bei pH = 7,4 nicht dazu neigen Protonen aufzunehmen, sondern bestrebt sind diese schnell abzugeben. Diese Protonen können dann im einfachsten Fall auf Wasser bzw. Hydroxidionen übertragen werden. Damit könnte sowohl die Bildung von Schiff'schen Basen als auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Amadori-Umlagerung im Vergleich zu den anderen Peptiden unterdrückt werden.

Folglich müsste sich als Gesetzmäßigkeit ergeben, dass der Einfluss der Carboxylgruppe mit abnehmender Anzahl der Carboxylgruppen in einem Molekül und zunehmendem Abstand der Carboxylgruppe zum Amin beispielsweise in der Reihe Glycin  $>$   $\beta$ -Alanin  $>$   $\gamma$ -Aminobuttersäure (Abbildung 4-9) oder bei der Verlängerung einer Peptidkette abnimmt. Um diese Theorie zu bestätigen, könnten Experimente mit einfach oder zweifach verestertem Val-Glu durchgeführt werden. Diese Blockierung der Carboxylgruppen müsste dann eine Verbesserung im Umsatz zum Amadori-Produkte ergeben.

## 4.2.2 Umsatz von Dipeptiden mit Glyoxal im physiologischen Modell

### 4.2.2.1 Quantifizierung N-terminaler AGEs

In Abschnitt 4.2.1 wurde die Reaktivität von Valyldipeptiden gegenüber Glucose untersucht. Die N-Termini des Hämoglobins reagieren *in vivo* auch mit Dicarbonylverbindungen. Deshalb soll am Beispiel der Reaktion mit Glyoxal untersucht werden, wie sich die Reaktivität der Dipeptide gegenüber Dicarbonylverbindungen unterscheidet. Dabei werden alle fünf

Dipeptide verwendet, um den Einfluss unterschiedlicher Seitenkettenfunktionen beurteilen zu können.

Die fünf Dipeptide (Val-Leu, Val-His, Val-Ser, Val-Tyr, Val-Glu) wurden unter physiologischen Modellbedingungen (37 °C, pH = 7,4, PBS-Puffer) äquimolar mit Glyoxal inkubiert (Abschnitt 3.6.2). Nach 0, 2, 6 und 14 Tagen Inkubationszeit wurden die Konzentration der gebildeten AGEs und die Abnahme der Konzentration der Edukte quantifiziert. Die 2(1*H*)-Pyrazinone wurden mittels RP-HPLC-UV und die CM-Derivate mittels LC-MS, wie in den Abschnitten 3.3.10 bzw. 3.3.11 beschrieben, quantifiziert. Die Bestimmung der Konzentration der freien Dipeptide in den Inkubationslösungen erfolgte mittels Aminosäureanalyse (Abschnitt 3.3.16). Zu den Zeitpunkten der Probenahme wurde die Reaktion durch Zugabe von OPD gestoppt. Das reaktive Glyoxal wurde in den Messproben mit einem 8-fachen Überschuss OPD (bezogen auf die Ausgangskonzentration des Glyoxals) inaktiviert (Abschnitt 3.6.2) und das Chinoxalin anschließend mittels RP-HPLC-UV (Abschnitt 3.3.10) quantifiziert.

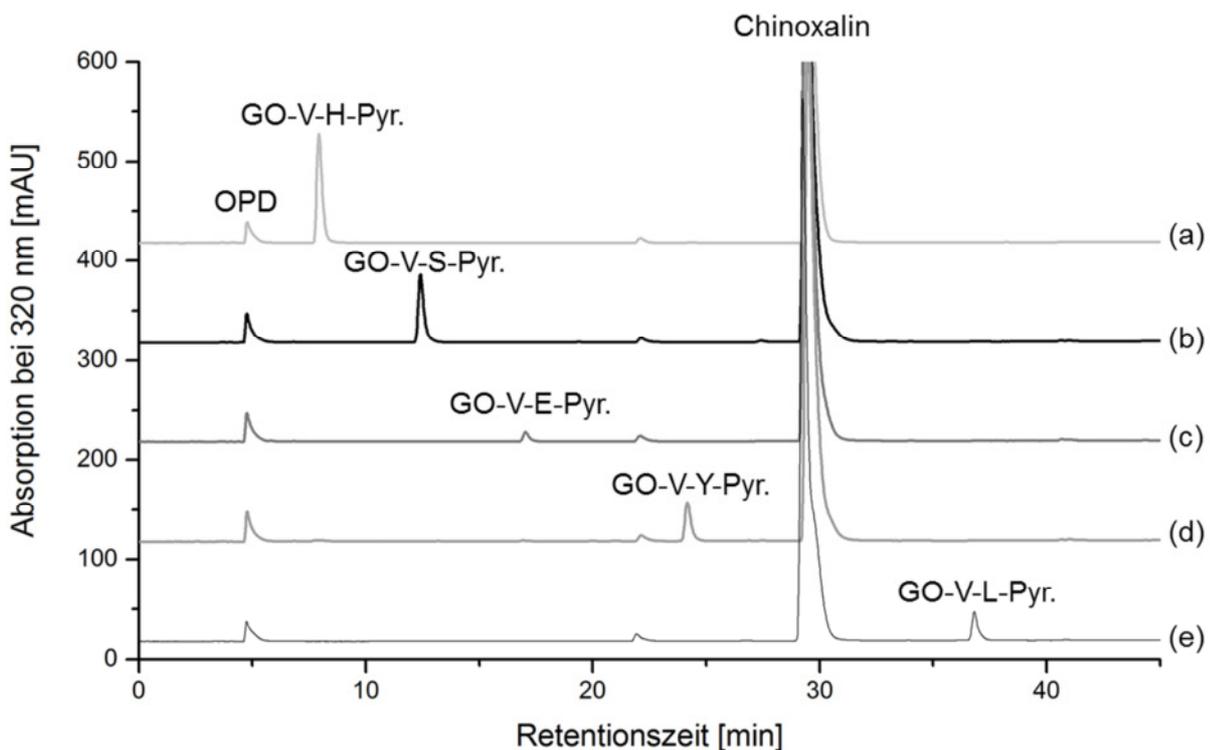


Abbildung 4-10: RP-HPLC-Chromatogramme von Inkubationsexperimenten des Glyoxal-Peptid-Modells unter physiologischen Bedingungen (37°C, pH = 7,4, 14d); Detektion der 2(1*H*)-Pyrazinone bei  $\lambda = 320$  nm; Inkubationen ausgehend von Glyoxal und (a) Val-His (VH), (b) Val-Ser (VS), (c) Val-Glu (VE), (d) Val-Tyr (VY), (e) Val-Leu (VL); OPD = ortho-Phenylendiamin; Chinoxalin = Kondensationsprodukt aus Glyoxal und OPD.

In Abbildung 4-10 sind exemplarisch die RP-HPLC-Chromatogramme ( $\lambda = 320$  nm) der Inkubationsproben nach 14 Tagen dargestellt. Die Detektionswellenlänge entspricht dem Absorptionsmaximum der 2(1*H*)-Pyrazinone. Die Identifizierung der jeweiligen 2(1*H*)-Pyrazinone wurde mittels synthetisierten Referenzstandards erzielt und über die zusätzliche

Detektion des Fluoreszenzsignals bei den für 2(1*H*)-Pyrazinone charakteristischen Anregungs- und Emissionswellenlängen ( $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$ ) abgesichert. Die Referenzstandards wurden ebenfalls zur Quantifizierung über externe Kalibrierungen eingesetzt. Neben den 2(1*H*)-Pyrazinonen wurden in allen Proben die Signale für OPD und Chinoxalin detektiert.

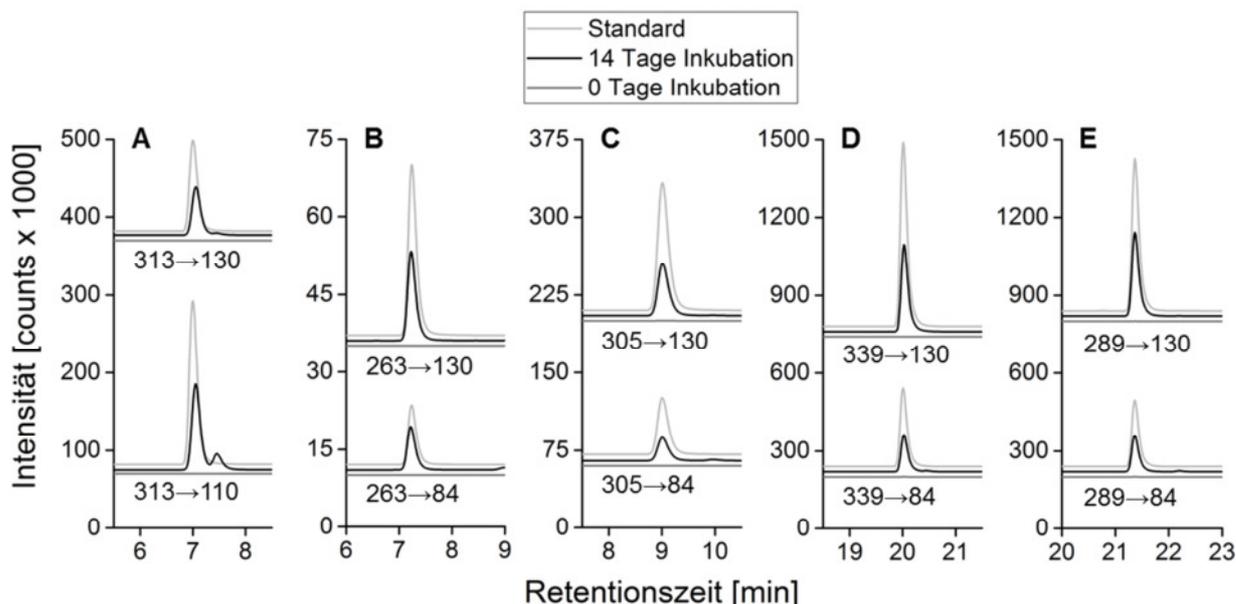


Abbildung 4-11: LC-MS/MS-Chromatogramme von Inkubationsexperimenten des Glyoxal-Peptid-Modells unter physiologischen Bedingungen ( $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ); Detektion der CM-Valyldipeptide (CM-Val-Xaa) über zwei charakteristische Massenübergänge; Inkubationen ausgehend von Glyoxal und (A) Val-His, (B) Val-Ser, (C) Val-Glu, (D) Val-Tyr, (E) Val-Leu; Darstellung der Chromatogramme der Referenzstandards, jeweils einer Probe nach 14 Tagen Inkubationszeit und eines Blindwerts nach 0 Tagen Inkubationszeit.

Die Gehalte der CM-Valyldipeptide (CM-Val-Xaa) in den Inkubationsproben wurden mittels LC-MS/MS ermittelt. Die Identifizierung der Analyten erfolgte über charakteristische Massenübergänge und den Abgleich der Retentionszeit mit einem synthetisierten Referenzstandard. In Abbildung 4-11 sind Chromatogramme von Proben der fünf verwendeten Dipeptide nach 14 Tagen Inkubationszeit dargestellt. Zusätzlich sind Chromatogramme von Proben der Reaktionsmischungen ohne Inkubation abgebildet. In den Blindwerten konnten die CM-Derivate nur im Spurenbereich detektiert werden. Die minimalen Gehalte können sich wegen der hohen Reaktivität des Glyoxals bereits bei der Mischung der Komponenten der Reaktionsgemische gebildet haben.

#### 4.2.2.2 Entwicklung des pH-Werts

Wie bei den Inkubationen der Dipeptide mit Glucose konnte auch in den Inkubationen mit Glyoxal ein Absinken des pH-Werts mit fortschreitender Reaktionszeit festgestellt werden. Der Verlauf ist in Tabelle 4-6 dokumentiert. Die pH-Wertsenkung verläuft bei den Inkubationen aller fünf Dipeptide in vergleichbarem Maß. Deshalb wurden für die Auswertung die Messergebnisse über den gesamten Inkubationszeit (14 Tage) verwendet.

Tabelle 4-6: Entwicklung des pH-Werts während der Inkubation der Peptide mit Glyoxal in PBS-Puffer

Peptid	Inkubationszeit [d]			
	0	2	6	14
Val-Leu	7,40	7,13	7,07	6,95
Val-His	7,40	7,17	7,11	6,99
Val-Ser	7,40	7,19	7,11	6,99
Val-Tyr	7,40	7,15	7,09	6,96
Val-Glu	7,40	7,20	7,12	6,99

Der sinkende pH-Wert kann über zwei Effekte erklärt werden. Die Freisetzung von Protonen durch den Verlust primärer Aminogruppen oder durch die Bildung saurer Endprodukte wie den CM-Derivaten scheinen nicht entscheidend zur Senkung des pH-Werts beizutragen, da der pH-Wert in den Inkubationsansätzen aller Peptide unabhängig vom Gesamtumsatz (Abbildung 4-14) in gleichem Maße sank. Eine zweite Möglichkeit ist, dass ein Teil des Glyoxals zu Glyoxylsäure und Glycolaldehyd oder intramolekular zu Glycolsäure disproportionierte (Abbildung 4-13), wodurch zusätzliche Protonen freigesetzt wurden. Mit der Information aus Abbildung 4-12, dass deutlich weniger Glyoxal detektierbar war, als durch die quantifizierten AGEs bzw. den Verlust der Dipeptide erklärt werden konnte, erscheint eine Nebenreaktion unter Abbau des Glyoxals plausibel. Eine zusätzliche Quantifizierung der C-2-Säuren könnte den Abbauweg des Glyoxals belegen.

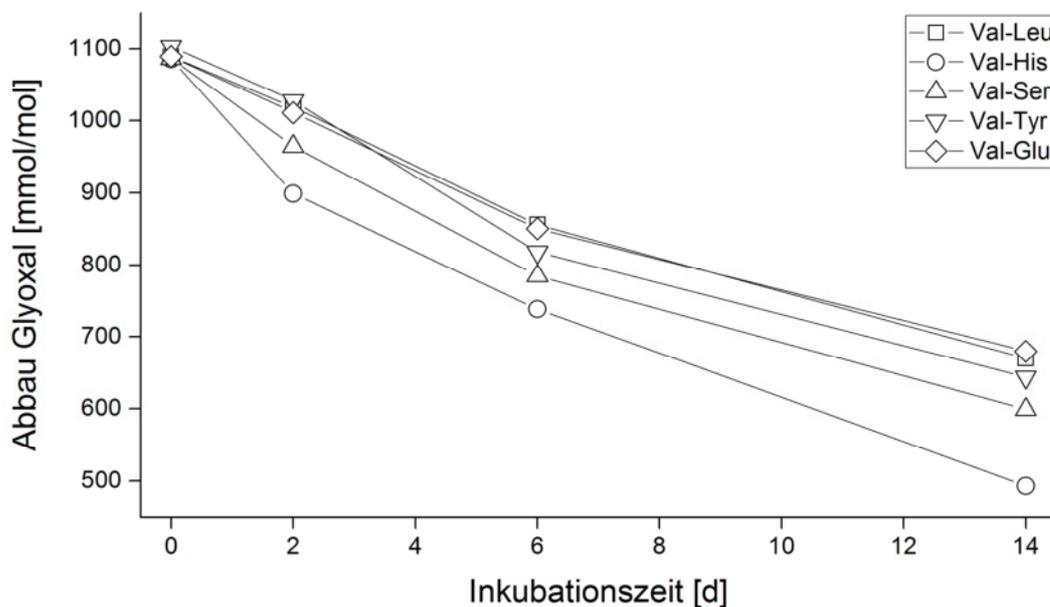


Abbildung 4-12: Abbau des Glyoxals (5 mM) nach Inkubation mit dem jeweiligen Val-Xaa-Dipeptid (5 mM) unter physiologischen Modellbedingungen (pH = 7,4, 37°C, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) für 14 Tage

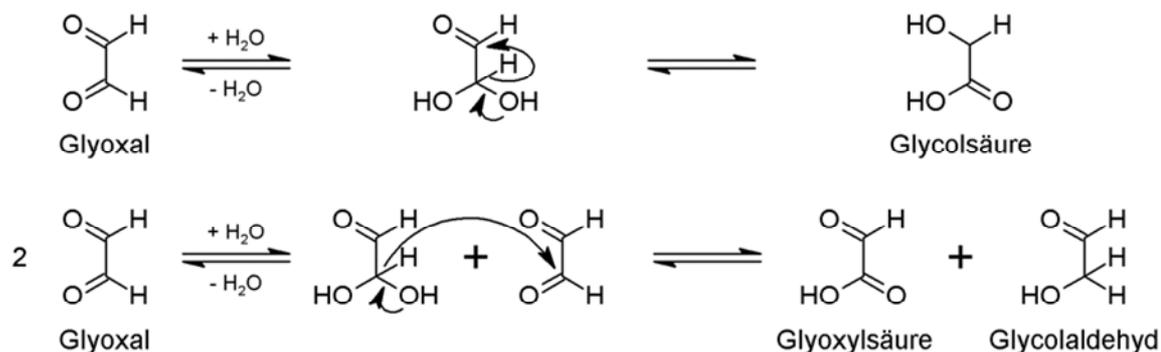


Abbildung 4-13: Disproportionierung von Glyoxal zu organischen Säuren gezeigt über den Mechanismus der Cannizzaro-Reaktion. Ein alternativer Mechanismus verläuft über Hydratisierung und Enolisierung.

#### 4.2.2.3 Gesamtumsatz der Dipeptide

In Abbildung 4-14 ist der Gesamtumsatz der Dipeptide nach Inkubation mit Glyoxal in Abhängigkeit von der Zeit gemessen als freies Dipeptid dargestellt. Damit wurde die Summe der quantifizierten AGEs (Pyrazinone, CM-Val-Xaa) und nicht quantifizierter Zwischen- und Nebenprodukte erfasst. Das Peptid mit dem höchsten Umsatz nach 14 Tagen ist Val-His und das Peptid mit dem geringsten Umsatz Val-Glu.

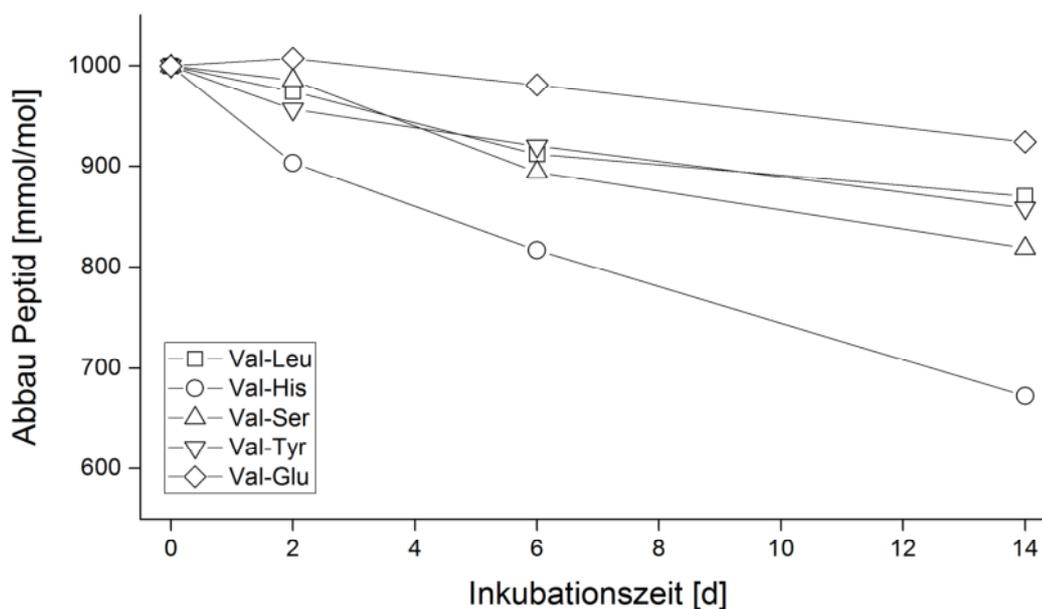


Abbildung 4-14: Umsatz der Val-Xaa-Dipeptide (5 mM) nach Inkubation mit Glyoxal (5 mM) unter physiologischen Modellbedingungen (pH = 7,4, 37°C, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) für 14 Tage.

*Krause (2005)* hat bei der Inkubation von Tripeptiden, die aus neutralen Aminosäuren aufgebaut waren, festgestellt, dass der Umsatz der Tripeptide mit Glyoxal mit niedrigerem pK<sub>S</sub>-Wert der α-Aminogruppe höher war. Dieser Effekt wurde mit dem höheren Anteil der deprotonierten Form der α-Aminogruppe und damit einer erhöhten Neigung zur Bildung des Imins (Schiff'sche Base) erklärt. Wie in Tabelle 4-7 dargestellt ist, entspricht der Gesamtumsatz der Dipeptide nicht direkt dieser Regel. Werden die Dipeptide mit dem höchsten Umsatz,

Val-His und Val-Ser, aus dieser Betrachtung ausgeschlossen, ist der Zusammenhang des Gesamtumsatzes mit dem  $pK_S$ -Wert der N-terminalen Aminogruppe der Peptide Val-Glu, Val-Leu und Val-Tyr gegeben.

Die deutlich höheren Umsätze von Val-His und Val-Ser müssen folglich über Mechanismen begründet werden, die die Bildung oder den Umsatz des Imins katalysieren. In Abschnitt 4.2.1.2 wurde bereits erwähnt, dass die Imidazolfunktion in der Seitenkette des Histidins Reaktionsschritte durch die Abstraktion oder Abgabe von Protonen katalysieren kann. Eine katalytische Wirkung der Seitenkette des Serins ist aus Serin-Endopeptidasen wie Trypsin oder Chymotrypsin bekannt, die ihren Aktivitätsbereich bei pH 7 bis 11 haben (*Belitz et al., 2008*). Im Basischen ist die Deprotonierung der Hydroxylgruppe des Serins erleichtert, wodurch die Ausbildung einer intermediären kovalenten Bindung zum Substrat möglich wird. Der Einfluss der funktionellen Seitenketten des Histidins und Serins wird in Abschnitt 4.2.2.5 genauer diskutiert.

Tabelle 4-7: Gegenüberstellung des  $pK_S$ -Werts der N-terminalen Aminogruppe von Dipeptiden mit der Reaktivität gegenüber Glyoxal

Reihenfolge der $pK_S$ -Werte (Abschnitt 4.1.3)	Val-Tyr	<	Val-Leu	=	Val-Ser	<	Val-His	≤	Val-Glu
	7,61	<	7,75	=	7,75	<	7,96	≤	7,99
absteigende Reihenfolge des Gesamtumsatzes der Dipeptide mit Glyoxal (Abbildung 4-14) nach 14 Tagen Inkubationszeit	Val-His	>	Val-Ser	>	Val-Tyr	≥	Val-Leu	>	Val-Glu
absteigende Reihenfolge des Umsatzes der Dipeptide mit Glyoxal zu CM-Val-Xaa (Abbildung 4-15) nach 14 Tagen Inkubationszeit	Val-His	>>	Val-Tyr	>	Val-Ser	≥	Val-Leu	>	Val-Glu
absteigende Reihenfolge des Umsatzes der Dipeptide mit Glyoxal zu 2(1 <i>H</i> )-Pyrazinonen (Abbildung 4-16) nach 14 Tagen Inkubationszeit	Val-His	=	Val-Ser	>	Val-Leu	≥	Val-Tyr	>	Val-Glu

#### 4.2.2.4 Umsatz der Dipeptide zu N-terminalen AGEs

In Abbildung 4-15 und Abbildung 4-16 ist gezeigt, wie die Konzentration der AGEs über die Inkubationszeit stetig anstieg. Eine Abweichung von diesem Trend ist nur für das Peptid Val-His, das die höchste Produktbildung aufweist, zu beobachten. Es ist folglich davon auszugehen, dass die verfügbare Konzentration der Edukte über den gesamten Reaktionszeitraum nicht limitierend war.

Nach dem nukleophilen Angriff der deprotonierten N-terminalen Aminogruppe ist die Bildung des Iminoglyoxals (Schiff'sche Base) in der Reaktion der Peptide mit Glyoxal sowohl für die Bildung von CM-Derivaten als auch die Bildung der 2(1*H*)-Pyrazinone der erste gemeinsame Schritt. Die nachfolgende Bildung der Pyrazinone erfolgt über eine Zyklisierungsreaktion (Abschnitt 2.1.3.3) und die Bildung der CM-Derivate kann über verschiedene Mechanismen (Abschnitt 2.1.3.2) formuliert werden. Die N-terminalen AGEs werden damit in Konkurrenz zueinander gebildet (Abbildung 4-64).

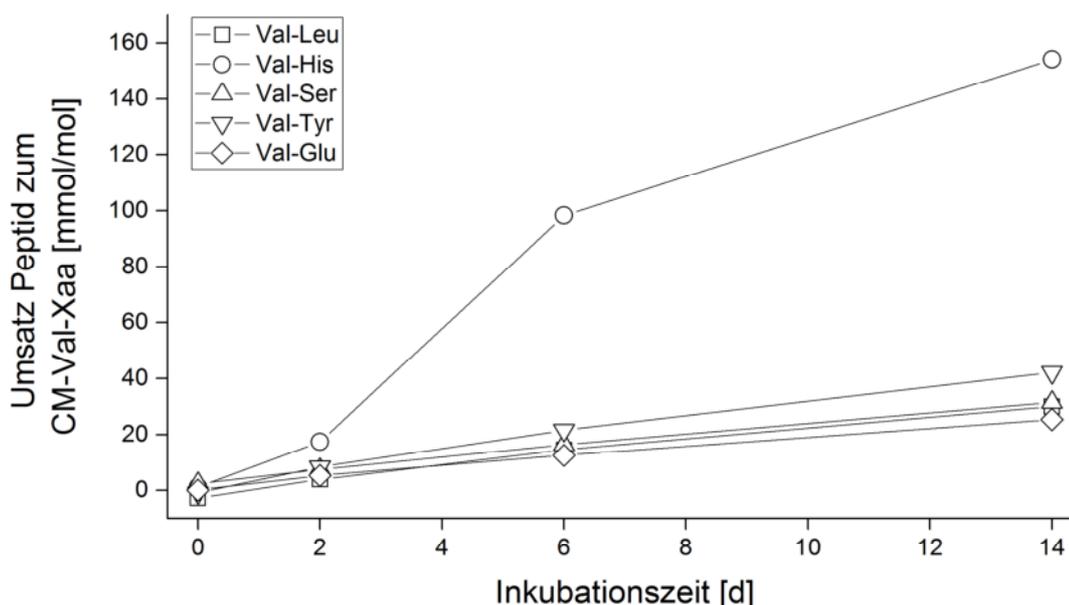


Abbildung 4-15: Peptidumsatz zum CM-Val-Xaa-Dipeptid nach Inkubation von Val-Xaa-Dipeptiden (5 mM) mit Glyoxal (5 mM) unter physiologischen Modellbedingungen (pH = 7,4, 37°C, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) für 14 Tage

Bei der Bildung der CM-Val-Xaa-Dipeptide (Abbildung 4-15) entspricht die Bildungsrate mit Ausnahme von Val-His der Reihenfolge der  $pK_S$ -Werte der freien Aminogruppe (Tabelle 4-7). Damit könnte geschlossen werden, dass die Bildungsrate der Schiff'schen Base bei der Reaktion der Dipeptide mit freiem Glyoxal für die Bildung der CM-Val-Xaa geschwindigkeitsbestimmend ist. Die Beobachtung, dass die Bildung von CM-Val-His deutlich höher ausfällt, deutet darauf hin, dass entweder direkt die Bildung des Iminoglyoxals oder Reaktionsschritte zur Bildung von CM-Val-His durch die Histidinseitenkette katalysiert werden.

Bei der Bildung der 2(1*H*)-Pyrazinone (Abbildung 4-16) scheint sich ein Effekt des  $pK_S$ -Werts in Zusammenhang mit der Bildung der Schiff'schen Base nicht einfach ableiten zu lassen. Val-His zeigt erneut eine hohe Produktbildung und auch die Bildung des von Val-Ser abgeleiteten 2(1*H*)-Pyrazinons liegt deutlich höher als erwartet. In Abbildung 4-17 ist zusätzlich zu den quantifizierten Gehalten der CM-Val-Xaa und der 2(1*H*)-Pyrazinone die Summe dieser beiden AGEs dargestellt. Es wird deutlich, dass die Produktbildung bei Val-His und Val-Ser nicht dem Prinzip des höheren Umsatzes mit niedrigerem  $pK_S$ -Wert der N-terminalen Aminogruppe entspricht. Allerdings folgt sowohl die Summe der gebildeten AGEs

als auch der Gesamtumsatz der Peptide bei Val-Tyr, Val-Leu und Val-Glu diesem Zusammenhang.

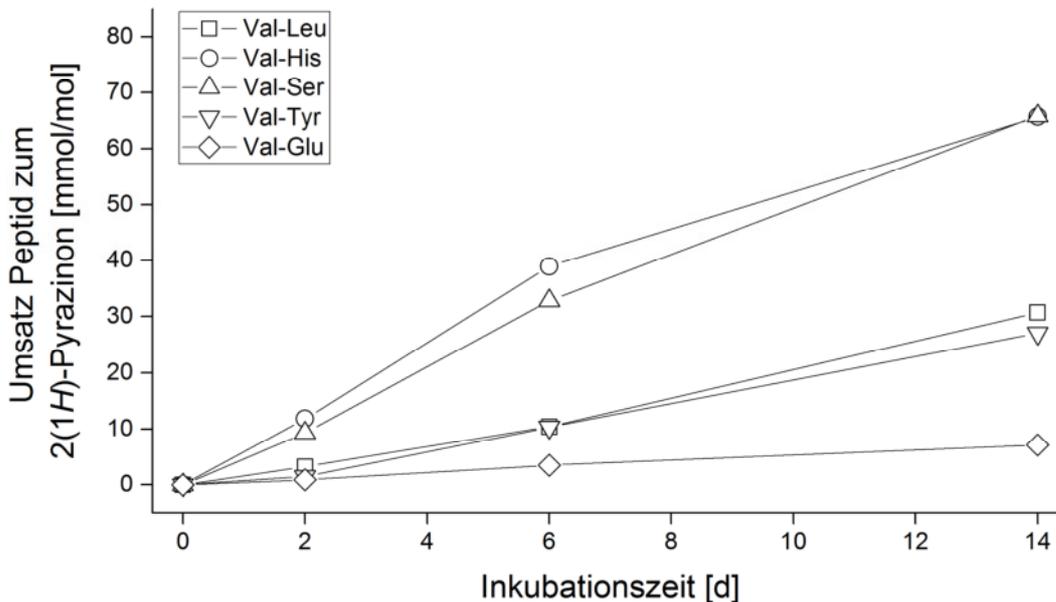


Abbildung 4-16: Peptidumsatz zum 2(1H)-Pyrazinon nach Inkubation von Val-Xaa-Dipeptiden (5 mM) mit Glyoxal (5 mM) unter physiologischen Modellbedingungen (pH = 7,4, 37 °C, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) für 14 Tage

Die Lücke zwischen dem quantifizierten Gesamtumsatz der Dipeptide zu deren Umsatz zu den quantifizierten AGEs (Summe aus 2(1H)-Pyrazinon und CM-Derivat) lässt sich mit der Bildung teilweise stabiler Zwischenprodukte der AGE-Bildung bzw. weiteren nicht identifizierten AGEs erklären.

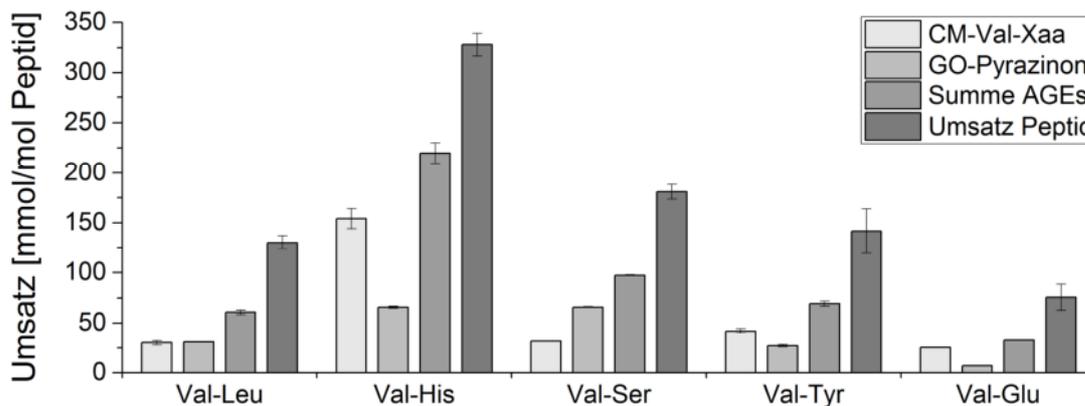


Abbildung 4-17: Übersicht zur Bildung der CM-Derivate, der 2(1H)-Pyrazinone, der Summe dieser beiden AGEs und zum Gesamtumsatz der Dipeptide nach 14 Tagen Inkubationszeit unter physiologischen Bedingungen

#### 4.2.2.5 Einfluss der funktionellen Gruppe der Seitenkette der C-terminalen Aminosäure

Sowohl bei der Bildung der Schiff'schen Base (Abbildung 4-19) als auch bei folgenden Umlagerungsschritten finden in Teilreaktionen Deprotonierungen und Protonierungen statt,

die entsprechend je nach pH-Wert des Reaktionssystems durch die Imidazolfunktion des Histidins katalysiert werden können.

Beispielsweise bei der Formulierung des Mechanismus zur Bildung von CM-Derivaten aus dem Iminoglyoxal mittels Hydratisierung und Enolisierung nach Abbildung 2-10 (d) kann die Protonenkatalyse bei verschiedenen Teilreaktionen stattfinden. So könnte die Protonierung des Carbonylsauerstoffs des Iminoglyoxals die Hydratisierung begünstigen. Bei der Bildung der C-C-Doppelbindung könnte die Imidazolgruppe die Deprotonierung bzw. die Protonierung der Aminogruppe könnte die Tautomerisierung erleichtern.

Da die Zyklisierungsreaktion des Iminoglyoxals zum 2(1*H*)-Pyrazinon als Reaktionsschritte sowohl die Tautomerisierung als auch den weiteren nukleophilen Angriff der sekundären Aminogruppe der Peptidbindung erfordert (Abbildung 2-13), ist die Protonentransferkatalyse durch die Seitenkette des Histidins in Reaktionsansätzen mit Val-His ebenfalls als der Grund für den erhöhten Umsatz im Vergleich zu den anderen Valyl-dipeptiden zu vermuten.

Der  $pK_S$ -Wert der Seitenkette des Histidins in Val-His liegt bei 6,6, so dass die Imidazolfunktion bei  $pH = 7,4$  noch zu etwa 10% protoniert vorliegt und so beide Varianten des Protonentransfers katalysieren kann. Im Vergleich ist eine entsprechende Katalyse durch die bei  $pH = 7,4$  nur noch zu ca. 0,1% protonierte  $\gamma$ -Carboxylfunktion in Val-Glu ( $pK_S = 4,6$ ) vermutlich nur bei Deprotonierungen möglich, aber auch dort nicht sehr wahrscheinlich, da die  $\gamma$ -Carboxylfunktion eine schwächere Base ist und bei diesem pH-Wert nicht sehr protonenziehend wirken sollte.

Bei Val-Ser ist zu vermuten, dass eine Katalyse durch die intermediäre Ausbildung einer kovalenten Bindung entsprechend dem Mechanismus des aktiven Zentrums einer Serin-Endopeptidase erfolgt. Eine leicht zu knüpfende und reversivle kovalente Bindung entsteht durch die Bildung von Halbaminolen und Halbacetallen, die durch den nukleophilen Angriff der Hydroxylgruppe des Serins am Kohlenstoff der Iminogruppe bzw. dem Carbonylkohlenstoff des Glyoxalrests des Iminoglyoxals entstehen können.

Der Angriff ist dabei durch ein zweites Val-Ser-Dipeptid denkbar. Aber ein intramolekularer Angriff hat den Vorteil, dass die Entropie weniger stark negativ ist, denn es reagieren nicht zwei Moleküle zu einem. Durch die Zyklisierung wird zwar die Freiheit der Molekülrotation eingeschränkt und die Entropie ist negativ, aber der Betrag sollte deutlich geringer sein als bei der Reaktion von zwei Molekülen. In Abbildung 4-18 sind sowohl ein Achtring, der bei der Bildung des Halbaminols (a) entsteht, als auch ein Neunring, aus der Bildung des Halbacetals (b), abgebildet. Die intermediäre Bildung dieser Verbindungen könnte zur Nachbildung des Imins führen bzw. als dessen Stabilisierung verstanden werden. Gleichzeitig könnte im Halbaminol wiederum intramolekular der nukleophile Angriff der Aminogruppe der Peptidbindung am Carbonylkohlenstoff durch die räumliche Nähe erleichtert sein. Im zyklischen Halbacetal ist der intramolekulare nukleophile Angriff der Aminogruppe der Peptidbindung über eine  $S_N2$ -Reaktion formulierbar. Mit diesen Mechanismen kann die bevorzugte Bildung

des GO-Val-Ser-2(1*H*)-Pyrazinons gegenüber CM-Val-Ser und gleichzeitig der erhöhte Umsatz von Val-Ser begründet werden.

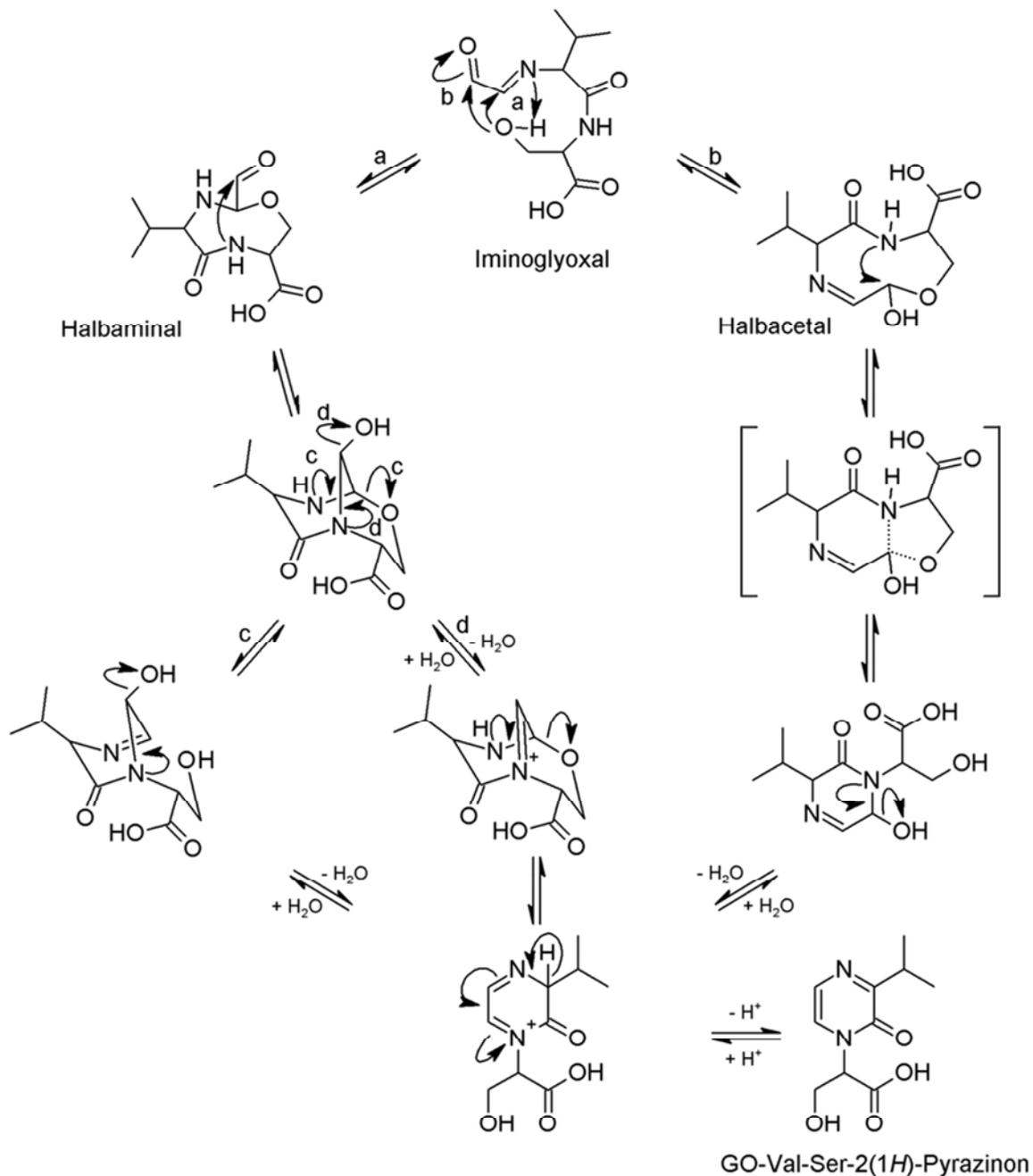


Abbildung 4-18: Mögliche Mechanismen zur Katalyse durch die Seitenkette des Serins bei der Bildung des 2(1*H*)-Pyrazinons aus dem Iminoglyoxal

#### 4.2.2.6 Einfluss des $pK_S$ -Werts der N-terminalen Aminogruppe auf die Produktbildung

Wie bereits beschrieben, identifizierte *Krause (2005)* bei der Umsetzung von Tripeptiden, bestehend aus Aminosäuren mit neutralen Seitenketten, zu 2(1*H*)-Pyrazinonen den initialen nukleophilen Angriff bei der Bildung der Schiff'schen Base als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, was in Abbildung 4-19 dem ersten Reaktionsschritt entspricht. Peptide mit einem niedrigen  $pK_S$ -Wert der N-terminalen Aminogruppe zeigten einen höheren Umsatz mit

Glyoxal, was mit dem größeren Anteil der deprotonierten N-terminalen Aminogruppe erklärt wurde.

Ein niedrigerer  $pK_S$ -Wert bzw. eine geringere Nucleophilie kann aber auch eine höhere Stabilität der Schiff'schen Base erklären. Nach der Abspaltung eines Moleküls Wasser entsteht die Schiff'sche Base vorerst in ihrer protonierten Form (Abbildung 4-19). Diese kann nach einem nukleophilen Angriff durch Wasser in der Rückreaktion zu den Edukten zerfallen oder durch eine Deprotonierung stabilisiert werden. Da der deprotonierte Anteil einer Aminogruppe umso größer ist, je niedriger der  $pK_S$ -Wert ist, wäre durch einen niedrigen  $pK_S$ -Wert nicht nur der nukleophile Angriff der N-terminalen Aminogruppe auf Glyoxal erleichtert, sondern auch die Stabilität der Schiff'schen Base erhöht.

Für Peptide ohne funktionelle Gruppen an den Aminosäureseitenketten, die beispielsweise über Protonenkatalyse in die Reaktionskinetik eingreifen könnten, kann auch hier die Bildung der Schiff'schen Base in der Reaktion der N-terminalen Aminogruppe von Peptiden mit Dicarbonylverbindungen als geschwindigkeitsbestimmend angenommen werden.

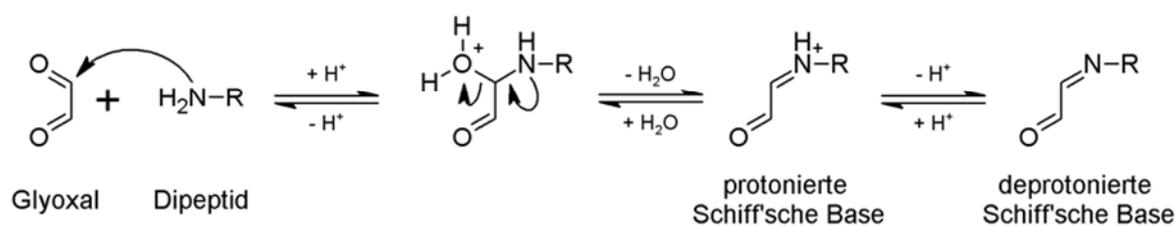


Abbildung 4-19: Bildung der Schiff'schen Base (Iminoglyoxal)

#### 4.2.2.7 Peptidspezifische Produktverteilung

Der Vergleich der Dipeptide hinsichtlich der Bildung der beiden N-terminalen AGEs zeigt, dass das Verhältnis der AGEs zueinander von Peptid zu Peptid stark variierte (Abbildung 4-17). Es konnte kein einheitliches Prinzip gefunden werden, so dass vermutlich der unterschiedlichen Seitenketten der C-terminalen Aminosäuren verantwortlich sind.

Ausschließlich bei Val-Ser wurden höhere Gehalte des 2(1*H*)-Pyrazinons als für das CM-Derivat erhalten. Diese Beobachtung könnte mit den in Abbildung 4-18 beschriebenen Mechanismen erklärt werden, da die beschriebenen zyklischen Intermediate den nukleophilen Angriff durch die sekundäre Aminogruppe der Peptidbindung erleichtern könnte.

Bei den anderen Peptiden wurden höhere Anteile des CM-Derivats bzw. für Val-Leu etwa gleich hohe Gehalte des CM-Derivats und des 2(1*H*)-Pyrazinons gefunden. Da besonders Val-Glu und Val-His bevorzugt zum CM-Derivat reagiert haben, wäre es möglich, dass die nukleophilere N-terminale Aminogruppe (Tabelle 4-5) die Bildung des CM-Derivats begünstigte.

### 4.2.3 Zusammenfassung zu den Ergebnissen aus den Experimenten im physiologischen Modell

Als Erkenntnis aus den Inkubationsexperimenten zur Reaktion von Valyldipeptiden mit Glucose unter physiologischen Bedingungen (pH = 7,4, 37 °C, PBS-Puffer) kann geschlossen werden, dass die Aminosäure an zweiter Position einen deutlichen Einfluss auf die Bildung des N-terminalen Amadori-Produkts nehmen kann. Insbesondere wirken sich dabei Unterschiede im  $pK_S$ -Wert der  $\alpha$ -Aminogruppe aus. Mit höherem  $pK_S$ -Wert sind gleichzeitig eine höhere Basizität und Nukleophilie verbunden, die sich vermutlich günstig auf die Amadori-Umlagerung auswirken.

Die Seitenkette der zweiten Aminosäure kann die Umsetzung zum Amadori-Produkt unabhängig vom  $pK_S$ -Wert beeinflussen. Für Val-Glu wurde der mit Abstand geringste Umsatz ermittelt, obwohl dieser auf Grund des  $pK_S$ -Werts einer der höchsten sein sollte. Die zusätzliche Carboxylgruppe wirkt sich also negativ auf die Umlagerungsrate aus. Ein begünstigender Effekt der Seitenkette des Histidins ist zu vermuten, aber da Val-His im Vergleich zu Val-Leu und Val-Ser nur einen geringfügig höheren Umsatz aufwies und der  $pK_S$ -Wert der N-terminalen Aminogruppe von Val-His höher liegt, ist der Einfluss der basischen Seitenkette bei den angewendeten Reaktionsbedingungen vermutlich nur gering.

Ein möglicher Effekt des geringfügigen Unterschieds der Reaktivität, insbesondere zwischen Val-Leu und Val-His, auf die Ausbildung des Amadori-Produkts an den N-Termini der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Ketten des Hämoglobins ist als gering einzuschätzen. Zumal sich die Verlängerung der Peptidkette über das Dipeptid hinaus noch direkt auf den  $pK_S$ -Wert und damit die Nukleophilie der N-terminalen Aminogruppe auswirkt. Ein Unterschied in den Gehalten des Amadori-Produkts in humanen Hämoglobinproben von Faktor 10 wurde in den Inkubationsexperimenten nicht beobachtet.

Die Experimente zum Umsatz der Dipeptide mit Glyoxal als exemplarische Dicarbonylverbindung haben gezeigt, dass alle Dipeptide sowohl zum entsprechenden N-terminalen CM-Derivat als auch zum 2(1*H*)-Pyrazinon umgesetzt wurden. Der Gesamtumsatz der Dipeptide war mit niedrigerem  $pK_S$ -Wert der N-terminalen Aminogruppe höher.

Abweichend von diesem Prinzip ergaben die Peptide Val-His und Val-Ser höhere Gehalte als abhängig vom  $pK_S$ -Wert zu erwarten wäre. Dieser Effekt kann über eine Katalyse des Umsatzes des Zwischenprodukts Iminoglyoxal zu den AGEs durch die funktionellen Gruppen der C-terminalen Aminosäuren erklärt werden.

Die Anteile der beiden untersuchten von Glyoxal abgeleiteten N-terminalen AGEs unterschieden sich in Abhängigkeit von den Dipeptiden deutlich. Wegen der vielfältigen Einflussfaktoren konnte für diese Beobachtung bisher keine abschließende Erklärung gefunden werden.

Für die Bildung von AGEs am N-Terminus der Hämoglobinketten lässt sich ableiten, dass Carboxyalkylderivate und 2(1*H*)-Pyrazinone der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette aus der Reaktion mit freiem

Glyoxal und Methylglyoxal zu erwarten sind. Insbesondere für den N-Terminus der  $\beta$ -Kette können niedrigere Gehalte des GO-2(1H)-Pyrazinons als von CM-Val-His vermutet werden.

### 4.3 N-terminale MRPs und MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin in humanem Hämoglobin

#### 4.3.1 Nachweis N-terminaler AGEs in humanem Hämoglobin nach enzymatischer Hydrolyse

Wie in Abschnitt 2.3.6 beschrieben ist, wurden als N-terminale AGEs des Hämoglobins bisher das Carboxymethylvalin (CM-Val) und das GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon nachgewiesen. Das N-terminale Carboxymethylvalin der Hämoglobinketten wurde in humanen Blutproben von *Cai & Hurst (1999)* nach Freisetzung durch einen modifizierten Edman-Abbau eindeutig identifiziert. *Kunert (2009)* konnte nach einer enzymatischen Hydrolyse mit Pronase E bereits das von Glyoxal abgeleitete 2(1H)-Pyrazinon der  $\beta$ -Kette des humanen Hämoglobins nachweisen und quantifizieren. Da diese beiden von Glyoxal abgeleiteten Derivate analysierbar waren, könnte auch das GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon der  $\alpha$ -Kette des humanen Hämoglobins detektierbar sein.

Nicht in physiologischen Proben aber im  $\beta$ -Lactoglobulin der Milch konnte neben dem N-terminalen CM-Derivat das N-terminale CE-Leu nach Inkubation mit Lactose nachgewiesen werden (*Meltretter et al., 2013*). CE-Derivate leiten sich von Methylglyoxal ab, das *in vivo* eine quantitativ relevante 1,2-Dicarbonylverbindung darstellt (Abschnitt 2.3.2). Deshalb könnte auch der Nachweis der von Methylglyoxal abgeleiteten N-terminalen AGEs gelingen. Als Modifizierungen der N-Termini der Hämoglobinketten können CE-Val, das MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon am N-Terminus der  $\alpha$ -Kette und das MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon am N-Terminus der  $\beta$ -Kette erwartet werden.

Zum Nachweis und zur Quantifizierung N-terminaler Glykierungsprodukte des Hämoglobins ist das Ziel dieser Arbeit diese als möglichst kurzkettige Derivate erfassbar zu machen. Um N-terminale AGEs freizusetzen, wurde eine zweistufige enzymatische Hydrolyse mit der Endopeptidase Pepsin im ersten Schritt und der Exopeptidase Carboxypeptidase Y im zweiten Schritt durchgeführt (Abschnitte 3.7.4). Die Verwendung der Pronase E wurde ebenfalls getestet. Auf Grund unzureichender Freisetzung wurde dieses Enzym jedoch nicht weiter eingesetzt (*Starke, 2013*). Zur Hydrolyse wurde das isolierte Hämoglobin eines diabetischen Dialysepatienten verwendet, da dieses vermutlich die höchsten Gehalte der N-terminalen AGEs enthalten sollte.

#### 4.3.1.1 Nachweis der Amadori-Produkte der N-Termini der $\alpha$ - und der $\beta$ -Kette des Hämoglobins

Da ein höherer Derivatisierungsgrad der Hämoglobinketten zum Amadori-Produkt als zu den AGEs zu erwarten ist, wurde das Hydrolysat auf freigesetzte N-terminale Fructosylpeptide untersucht. Dabei gelang der Nachweis des N-terminalen Fructosyltripeptids der  $\alpha$ -Kette (Fru-Val-Leu-Ser) durch die Verwendung charakteristischer Massenübergänge (Abschnitt 4.1.1.2) ausgehend von der relativen Masse des Molekülions. Das Fructosyltripeptid der  $\beta$ -Kette (Fru-Val-His-Leu) konnte nicht detektiert werden. Bei der Suche nach den Fructosyldipeptiden wurde nach dem gleichen Prinzip vorgegangen, wobei zusätzlich ein Abgleich der Elutionszeit mit dem synthetisierten Referenzstandard erfolgte. Es konnten Fru-Val-Leu ( $\alpha$ -Kette) und Fru-Val-His ( $\beta$ -Kette) detektiert werden. Representative Chromatogramme der Massenübergänge sind in Abbildung 4-20 dargestellt. Der Nachweis von Fru-Val gelang jedoch nicht. Die gleichzeitige Anwesenheit von Fru-Val-Leu und Fru-Val-Leu-Ser zeigt, dass der Abbau bis zum Fructosyldipeptid möglich, aber nicht vollständig ist. Dass Fru-Val-His, aber nicht Fru-Val-His-Leu, detektierbar war, deutet darauf hin, dass das C-terminale Leucin vermutlich gut freisetzbar war und so das Tripeptid-Amadori-Produkt nicht in detektierbaren Konzentrationen vorlag.

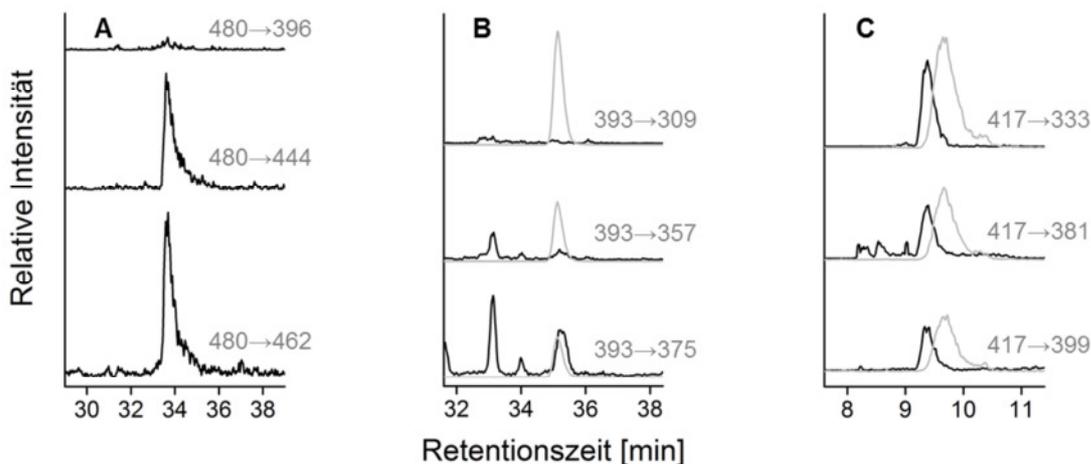


Abbildung 4-20: Nachweis von Fru-Val-Leu-Ser (A), Fru-Val-Leu (B) und Fru-Val-His (C) im Hydrolysat von isoliertem Hämoglobin nach Hydrolyse mit Pepsin und Carboxypeptidase Y; Detektion charakteristischer Massenübergänge von Fructosylpeptiden mittels LC-MS/MS (Abschnitt 4.1.1.2, Abbildung 4-1).

#### 4.3.1.2 Abbau der N-terminalen Di- und Tripeptide der Hämoglobinketten und ihrer Derivate durch die Carboxypeptidase Y

Um genauer zu untersuchen wie weit die Carboxypeptidase Y die Peptidketten abbauen kann, wurden im ersten Schritt das N-terminale Tripeptid Val-Leu-Ser und das N-terminale Dipeptid Val-Leu der  $\alpha$ -Kette sowie das N-terminale Dipeptid der  $\beta$ -Kette Val-His mit der Carboxypeptidase Y inkubiert (Abschnitt 3.7.4). Die freien Aminosäuren, sowie die Peptide wurden mittels Aminosäureanalyse quantifiziert (Abschnitt 3.3.16). Von Val-Leu-Ser wurde das Serin vollständig abgespalten. Die C-terminale Aminosäure der Dipeptide wurde aller-

dings nicht effektiv freigesetzt. Die Durchführung dieses Experiments mit Fru-Val-Leu und Fru-Val-His hat ergeben, dass diese durch die Carboxypeptidase Y ebenfalls nicht weiter abgebaut wurden.

Da das Ziel der Versuche der Nachweis der N-terminalen AGEs des Hämoglobins ist, wurden diese Freisetzungsversuche ebenfalls mit den Dipeptidderivaten CM-Val-Leu, CE-Val-Leu und CM-Val-His durchgeführt. Auch aus diesen wurde die C-terminale Aminosäure nicht abgespalten. Demnach sind aus der Hydrolyse des Hämoglobins mit Pepsin und Carboxypeptidase Y weder CM-Val noch CE-Val zu erwarten. Da bei der Bildung der Pyrazinone sowohl die erste als auch die zweite Aminosäure des N-Terminus in das Derivat eingeschlossen werden, ist zu vermuten, dass diese nach enzymatischer Hydrolyse nicht als freie AGEs sondern als die entsprechenden Tripeptidderivate vorliegen könnten.

#### 4.3.1.3 Nachweis N-terminaler Carboxyalkylderivate

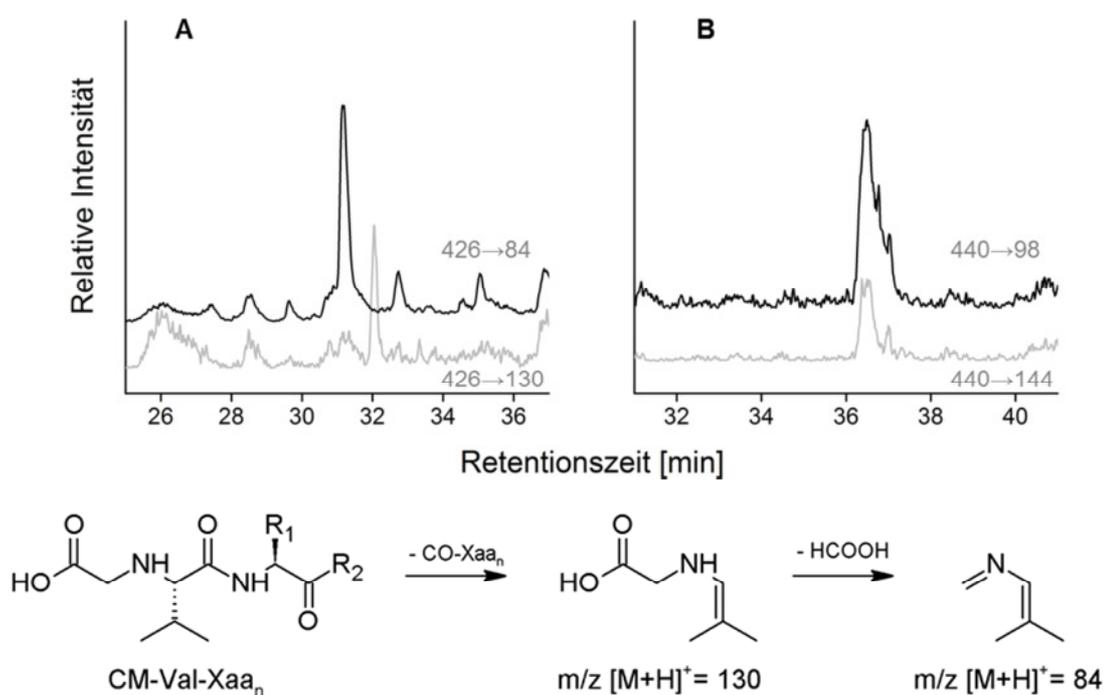


Abbildung 4-21: Identifizierung von CM-Val-His-Leu (A) und CE-Val-His-Leu (B) im Hydrolysat von isoliertem Hämoglobin nach Inkubation mit Pepsin und Carboxypeptidase Y mittels zwei charakteristischer Massenübergänge; Prinzip der Fragmentierung von N-terminalen Carboxyalkylderivaten zu den charakteristischen Fragmenten am Beispiel eines N- $\alpha$ -CM-Val-Xaa<sub>n</sub>-Peptids (bei CE-Derivaten gilt  $m/z + 14$  Da), R<sub>1</sub> = beliebige Aminosäureseitenkette, R<sub>2</sub> = OH für Dipeptidderivat, R<sub>2</sub> = Xaa<sub>n</sub> für beliebige Aminosäure oder Peptidkette.

Nach Hydrolyse des Hämoglobins mit den Enzymen Pepsin und Carboxypeptidase Y waren die N-terminalen Carboxyalkylderivate der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins als Tripeptidderivate CM-Val-His-Leu (426→130; 426→84) und CE-Val-His-Leu (440→144; 440→98) über charakteristische Massenübergänge in Spuren detektierbar (Abbildung 4-21). Die Massenübergänge wurden ausgehend von bekannten Fragmentmustern synthetisierter CM- und CE-

Peptide abgeleitet. Die Verwendung der charakteristischen Massenübergänge ermöglichte die maximale Empfindlichkeit bei der Detektion mit dem verwendeten Massendetektor. Da die Massenübergänge für diese Moleküle gerade noch detektierbar waren, konnten zur weiteren Bestätigung der Zuordnung keine verwertbaren Fragmentspektren im Hydrolysat des Hämoglobins gemessen werden. Deshalb ist das Ergebnis als orientierend anzusehen und die Peakzuordnung sollte durch die Verwendung synthetisierter Standards weiter abgesichert werden. Die CM-/CE-Dipeptidderivate der  $\beta$ -Kette sowie CM- und CE-Val konnten nicht detektiert werden. Vermutlich ist der Abbau bis zu den Carboxyalkyldipeptiden der  $\beta$ -Kette und weiter zu den Aminosäurederivaten nicht möglich.

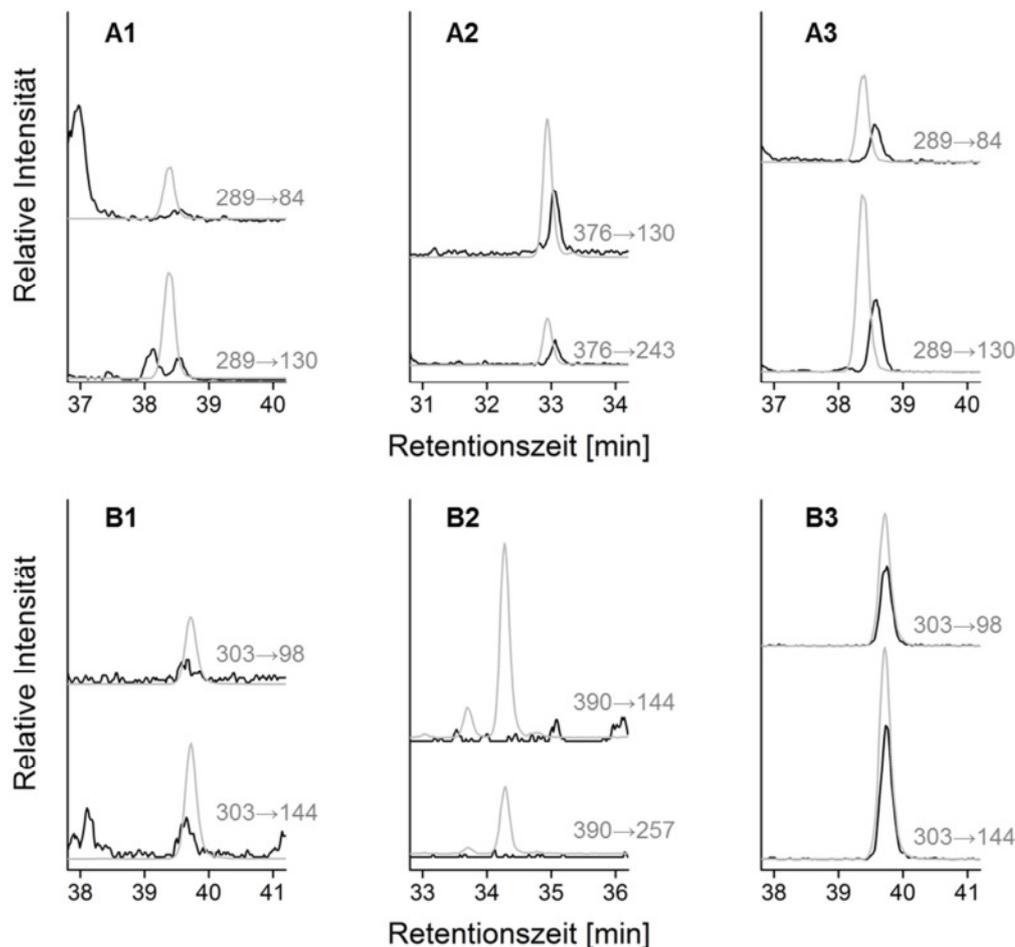


Abbildung 4-22: Identifizierung von CM-Val-Leu (**A1**) und CE-Val-Leu (**B1**) im Hydrolysat von isoliertem Hämoglobin (schwarze Linie) im Vergleich zu synthetisiertem Referenzstandard (graue Linie); Detektion von CM-Val-Leu-Ser (**A2**) und von CM-Val-Leu (**A3**) nach Umsetzung von Hämoglobin mit Glyoxal (Abschnitt 3.7.3) bzw. CE-Val-Leu (**B3**) aber nicht CE-Val-Leu-Ser (**B2**) nach Umsetzung von Hämoglobin mit Methylglyoxal (Abschnitt 3.7.3), schwarze Linie entspricht Hydrolysaten der inkubierten Hämoglobine, graue Linie entspricht synthetisierten CM-/CE-Dipeptidstandards bzw. CM-/CE-Tripeptid (erzeugt durch Inkubation des Tripeptids mit Glyoxal bzw. Methylglyoxal; Abschnitt 3.7.3); Hydrolyse mit Pepsin und Carboxypeptidase Y.

Die Carboxyalkyltripeptidderivate des N-Terminus der  $\alpha$ -Kette konnten nicht nachgewiesen werden. Doch für die Dipeptidderivate CM-Val-Leu und CE-Val-Leu wurden Signale sehr geringer Intensität detektiert (Abbildung 4-22: A1, B1). Diese Beobachtung ist in guter

Übereinstimmung mit dem Ergebnis, dass die Carboxypeptidase Y von Val-Leu-Ser sehr gut Serin abspalten kann. Es ist zu vermuten, dass sich die Carboxyalkylderivatisierung am N-Terminus nicht hinderlich auf die Substratbindung auswirkt.

Um die Freisetzbarkeit abzusichern wurde je ein Teil des Hämoglobins mit Glyoxal bzw. Methylglyoxal inkubiert, um höhere Gehalte der N-terminalen AGEs zu erzeugen (Abschnitt 3.7.3). Im Hydrolysat des mit Glyoxal-AGEs angereicherten Hämoglobins waren das CM-Val-Leu-Ser und auch das CM-Val-Leu nachweisbar (Abbildung 4-22: A2, A3), so dass eine Hydrolyse des CM-Derivats des N-Terminus der  $\alpha$ -Kette bis zum CM-Dipeptid möglich erscheint. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde das N-terminale Tripeptid der  $\alpha$ -Kette mit Glyoxal inkubiert und mit Carboxypeptidase Y hydrolysiert. In dieser Probe konnte der Abbau von CM-Val-Leu-Ser und die gleichzeitige Bildung von CM-Val-Leu bestätigt werden. Die Freisetzbarkeit von CM-Val-Leu aus dem Tripeptidderivat scheint folglich grundsätzlich möglich. Im mit Methylglyoxal inkubierten Hämoglobin konnte ebenfalls wie im unbehandelten Hämoglobin das CE-Val-Leu-Ser nicht nachgewiesen werden, dafür aber eindeutig das CE-Val-Leu (Abbildung 4-22: B2, B3). Es ist zu vermuten, dass das CE-Tripeptid soweit zum CE-Dipeptid abgebaut wurde, bis es nicht mehr nachweisbar war.

#### 4.3.1.4 Nachweis von 2(1H)-Pyrazinonen der N-Termini der $\alpha$ - und der $\beta$ -Kette des Hämoglobins

Die GO- und MGO-Tripeptid- und Dipeptid-2(1H)-pyrazinone der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins konnten nicht nachgewiesen werden. Auch in AGE-angereicherten Hämoglobinproben nach Inkubation mit Glyoxal bzw. Methylglyoxal war dies nicht möglich. Es ist zu vermuten, dass die Carboxypeptidase Y die Peptidkette nicht bis zum Pyrazinontripeptid abbauen konnte.

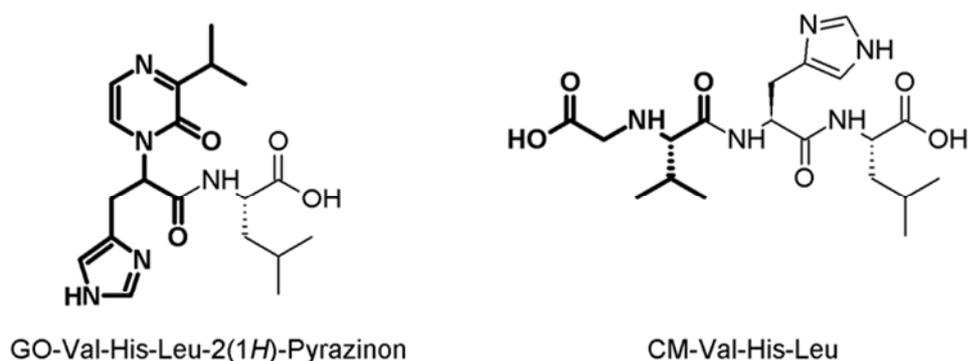


Abbildung 4-23: Vergleich der Derivatisierungsstelle zwischen einem 2(1H)-Pyrazinon und einem Carboxyalkylderivat am Beispiel der Glyoxalderivate von Val-His-Leu (N-Terminus  $\beta$ -Kette); **hervorgehoben**: AGE-Teil des Peptidderivats.

Das Pyrazinontripeptid entspricht einer Aminosäure mit einem N-terminal gebundenen AGE. Da bei der Bildung eines Pyrazinons die ersten zwei Aminosäuren des N-Terminus im AGE gebunden sind, liegt nicht nur ein anderes Derivat vor, sondern die Derivatisierungsstelle ist im Vergleich zu Carboxyalkylderivaten zusätzlich um eine Aminosäure Richtung C-Terminus

verschoben (Abbildung 4-23). Die Derivatisierungsstelle des GO-Val-His-Leu-2(1*H*)-Pyrazinons entspricht also der des CM-Val-His. Es ist nicht bekannt auf welche Weise sich die zyklische 2(1*H*)-Pyrazinonstruktur im Vergleich zu einer kleinen negativ geladenen Carboxyalkylstruktur am N-Terminus die Substrateigenschaften beeinflusst. Da für die  $\beta$ -Kette keine 2(1*H*)-Pyrazinondipeptide und -tripeptide nachweisbar waren, kann vermutet werden, dass die Carboxypeptidase Y die Peptidkette mit einem N-terminal gebundenen 2(1*H*)-Pyrazinon nicht so weit abbauen kann wie mit einer N-terminal gebundenen CM-Aminosäure.

Das GO-Val-Leu-Ser-2(1*H*)-Pyrazinon und das MGO-Val-Leu-Ser-2(1*H*)-Pyrazinon, die 2(1*H*)-Pyrazinontripeptide der  $\alpha$ -Kette, waren im Hydrolysat von originärem Hämoglobin nicht nachweisbar. Nach Inkubation mit Glyoxal und Hydrolyse konnte das GO-Val-Leu-Ser-2(1*H*)-Pyrazinon in sehr geringer Intensität mittels charakteristischer Massenübergänge detektiert werden. Die Zuordnung wurde durch den Retentionszeitvergleich mit dem GO-Val-Leu-Ser-2(1*H*)-Pyrazinon aus dem Glyoxal-modifizierten Tripeptid (Abschnitt 3.7.3) zusätzlich abgesichert (Abbildung 4-24). Der entsprechende Nachweis des MGO-Val-Leu-Ser-2(1*H*)-Pyrazinons nach Umsetzung des Hämoglobins mit Methylglyoxal ist nicht gelungen.

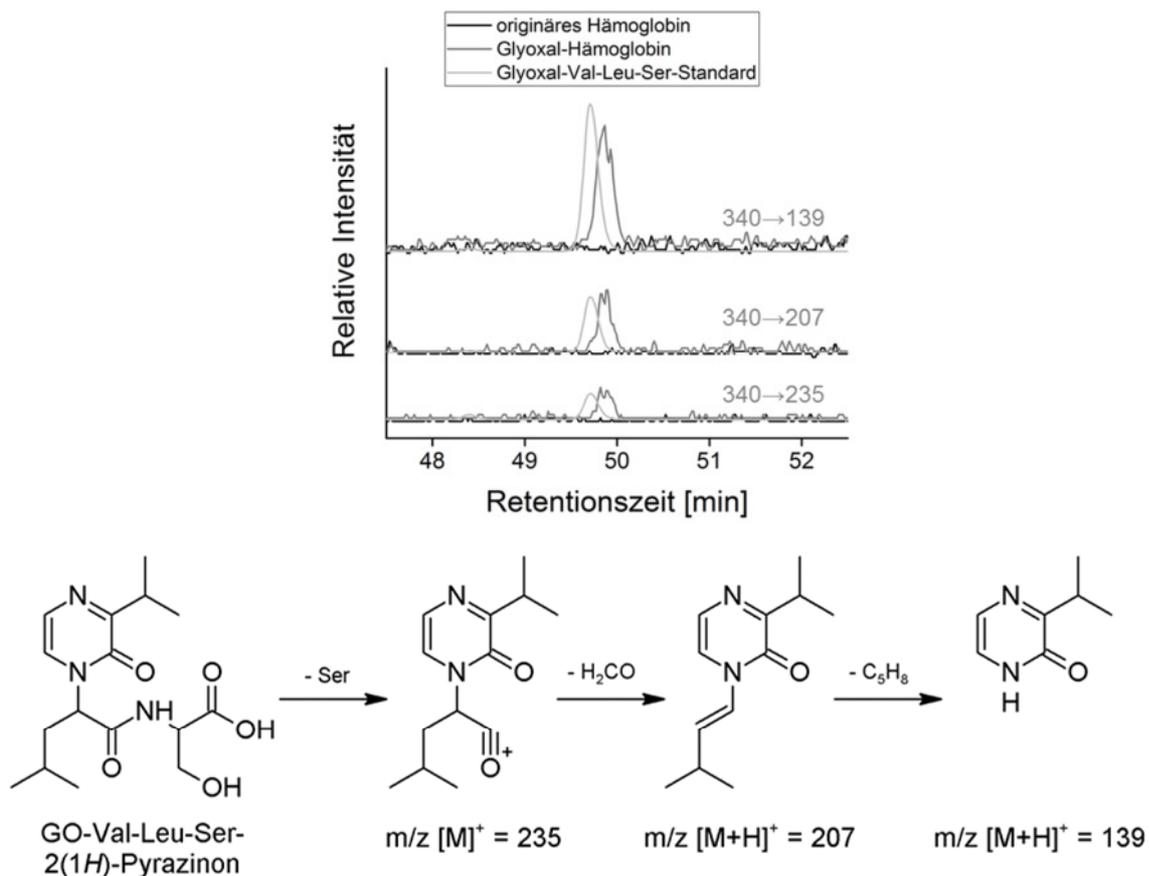


Abbildung 4-24: Identifizierung des GO-Val-Leu-Ser-2(1*H*)-Pyrazinons nach Inkubation des Hämoglobins mit Glyoxal und Hydrolyse mit Pepsin und Carboxypeptidase Y; Vergleich des Hydrolysats des originären Hämoglobins, des Glyoxal-AGE-angereicherten Hämoglobins und des Glyoxal-AGE-angereicherten Vergleichs-peptids Val-Leu-Ser; Fragmentierungsschema zur Erklärung der zur Detektion verwendeten charakteristischen Massenübergänge.

Für die Derivatisierung des Hämoglobins mit Glyoxal bzw. Methylglyoxal zur Anreicherung N-terminaler AGEs wurde im Vergleich zur Vielzahl möglicher Derivatisierungsstellen im gesamten Hämoglobinmolekül nur ein geringer Überschuss der Dicarbonylverbindungen eingesetzt, um die enzymatische Hydrolyse nicht zu beeinträchtigen. Die eingesetzte Konzentration der jeweiligen Dicarbonylverbindung entsprach ca. einem zweifachen Überschuss bezogen auf die N-terminalen Aminogruppen. Da ein Hämoglobintetramer weitere 12 mol Arginin enthält, dessen Seitenkette ebenfalls effektiv mit Dicarbonylverbindungen reagieren kann, ergab sich ein molares Verhältnis der reaktiven Gruppen zur Dicarbonylverbindung von etwa 1,5 zu 1,0. Die 44 Lysinseitenketten wurden dabei noch nicht berücksichtigt. Um die Freisetzbarkeit der 2(1*H*)-Pyrazinonderivate der  $\beta$ -Kette und des MGO-2(1*H*)-Pyrazinonderivats der  $\alpha$ -Kette nachweisen zu können, wäre ein weiteres Experiment mit einem stärker mit AGEs angereichertem Hämoglobin sinnvoll.

Der Versuch, die Modifizierung der Hämoglobinketten durch 2(1*H*)-Pyrazinonstrukturen nachzuweisen, ist bisher in unmodifiziertem Hämoglobin nach enzymatischer Hydrolyse nicht gelungen. Möglicherweise könnte der Nachweis durch die Suche nach längererkettigen modifizierten N-terminalen Bruchstücken erfolgreich sein.

#### 4.3.1.5 Zusammenfassung zur enzymatischen Freisetzung N-terminaler AGEs

Der Versuch, die N-terminalen AGEs des Hämoglobins durch eine enzymatische Hydrolyse freizusetzen zeigt, dass die Abspaltung von Aminosäuren vom C-Terminus nur bis zu einer bestimmten Position möglich war und so nur zum Teil kurzkettenige N-terminal-glykierte Peptide angereichert werden konnten. Für die Amadori- und Carboxyalkyl-Produkte der Hämoglobinketten konnte die Freisetzung bis zu den Dipeptid- oder Tripeptidderivaten gezeigt werden. Die Freisetzbarkeit von 2(1*H*)-Pyrazinonpeptiden konnte nur ansatzweise nach Anreicherung mit AGEs nachgewiesen werden, wobei schon eine geringe Erhöhung des Gehalts der N-terminalen Glyoxal-AGEs den Nachweis ermöglicht hatte.

Das eigentliche Ziel der Hydrolyse ist die vollständige Freisetzung und damit analytische Erfassbarkeit der N-terminalen AGEs des Hämoglobins als definierte kurzkettenige Derivate um diese anschließend quantifizieren zu können. Ob das durch eine Optimierung der Hydrolysestrategie mit Peptidasen möglich ist, bleibt offen. Um eine reproduzierbare und quantitative Freisetzung zu erreichen, soll daher die Hydrolyse in 6 M Salzsäure zum Einsatz kommen.

Zwar konnten mit der angewendeten enzymatischen Hydrolyse keine freien N-terminalen AGEs erzeugt werden, weshalb die Hydrolyse nicht für die zu entwickelnde Methode geeignet ist, aber ein reproduzierbarer und quantitativer Abbau bis zu den Di- oder Tripeptidderivaten würde auch für die N-terminalen Carboxyalkyl- und Fructosylderivate eine Zuordnung zu den N-Termini der beiden Hämoglobinketten ermöglichen. So könnten zu den kettenspezifischen 2(1*H*)-Pyrazinonen auch die Anteile von Fru-Val, CM-Val und CE-Val an den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten ermittelt werden.

### 4.3.2 Stabilität und Nachbildung N-terminaler AGEs aus Hämoglobin bei der Hydrolyse mit Salzsäure

#### 4.3.2.1 Stabilität von 2(1H)-Pyrazinonen bei der Hydrolyse mit Salzsäure

Wie in Abschnitt 2.1.3.3 beschrieben ist, untersuchte *Krause (2005)* die Stabilität von 2(1H)-Pyrazinonen bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure. Dabei wurden verschiedene Abbauewege beschrieben. Zum Teil wurde beobachtet, dass nach der Abspaltung der C-terminalen Aminosäuren eine Decarboxylierung des 2(1H)-Pyrazinons zum N<sup>1</sup>-Alkylpyrazinon stattfinden kann. Allerdings war diese Reaktion von untergeordneter Bedeutung, wenn das Pyrazinon aus dem langkettigen Protein Insulin und nicht dem Pyrazinontripeptid freigesetzt wurde. Damit sollte die Bildung von N<sup>1</sup>-Alkylpyrazinonen in Hydrolysen von Globinproben keine große Relevanz besitzen. Als Hauptprodukt fand *Krause* das intakte 2(1H)-Pyrazinon.

*Krause (2005)* zeigte weiterhin, dass nach 23 Stunden Hydrolysedauer eines Tripeptidpyrazinons die N-terminale Aminosäure zu 21% und die zweite Aminosäure zu 35% nachweisbar waren. Damit wies er nach, dass unter diesen Reaktionsbedingungen der Abbau von Pyrazinonstrukturen über eine Rückreaktion zu den Edukten oder einen anderen Abbaueweg unter Freisetzung der Aminosäuren möglich ist. Es ist zu vermuten, dass der Abbau bei der Hydrolyse eines langkettigen Proteins geringer ausfallen könnte, aber es ist nicht auszuschließen, dass der detektierte Gehalt den tatsächlichen Pyrazinongehalt unterschätzt.

Um den Abbau von 2(1H)-Pyrazinonstrukturen der Globinketten des Hämoglobins genauer zu untersuchen wurden die GO- und MGO-2(1H)-Pyrazinone von Val-Leu ( $\alpha$ -Kette) und Val-His ( $\beta$ -Kette) zu je einer Globinprobe zudotiert und mit 6 M Salzsäure bei 110 °C für 23 Stunden hydrolysiert (Abschnitt 3.7.7.1). Das Ergebnis der Untersuchung der Stabilität der 2(1H)-Pyrazinone bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure ist in Abbildung 4-25 dargestellt. Die Stabilität ist abhängig von der Struktur der 2(1H)-Pyrazinone. Die von Methylglyoxal abgeleiteten 2(1H)-Pyrazinone sind stabiler als die von Glyoxal abgeleiteten. Die Wiederfindung der von Val-His und Val-Leu abgeleiteten MGO-2(1H)-Pyrazinone betrug 84% bzw. 107% und ist damit als hoch einzuschätzen. Im Vergleich wurden die von Glyoxal abgeleiteten 2(1H)-Pyrazinone deutlich stärker abgebaut. Die Wiederfindung betrug 66% (Val-Leu) bzw. 8% (Val-His). Damit wurde gezeigt, dass die Aminosäuresequenz des im 2(1H)-Pyrazinon gebundenen Dipeptids genau wie die Struktur der eingeschlossenen Dicarboxylverbindung einen großen Einfluss auf die Stabilität haben. Die Seitenkette der zweiten Aminosäure könnte sich u.a. auf die Tendenz zur von *Krause (2005)* beschriebenen Decarboxylierung und Bildung des N<sup>1</sup>-Alkyl-2(1H)-pyrazinons auswirken (Abbildung 2-15). Viel stärker scheint die Stabilität aber von einer zusätzlichen Methylgruppe am 2(1H)-Pyrazinonring beeinflusst zu werden. Dieser Strukturunterschied wirkt sich vermutlich kaum auf die Bildung des N<sup>1</sup>-Alkyl-2(1H)-pyrazinons aus.

Wie bereits erwähnt konnte *Krause (2005)* bei der Hydrolyse eines von einem Tripeptid und Glyoxal abgeleiteten 2(1H)-Pyrazinons 35% der zweiten und 21% der N-terminalen Amino-

säure wiederfinden. Es ist zu vermuten, dass ein 2(1*H*)-Pyrazinon unter Umkehrung der Bildungsreaktion zu den Edukten zerfallen kann. Der Unterschied in der Wiederfindung der ersten und der zweiten Aminosäure könnte mit konkurrierenden Abbauwegen begründet werden.

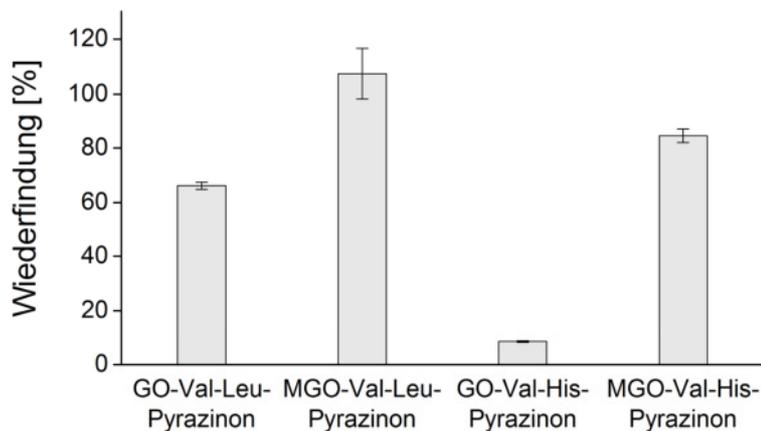


Abbildung 4-25: Stabilität von 2(1*H*)-Pyrazinonen unter den Bedingungen der Hydrolyse in 6 M Salzsäure

In Abbildung 4-26 (B) ist dargestellt wie durch die reversible Umlagerung der Doppelbindungen im 2(1*H*)-Pyrazinonmolekül und die anschließende Hydrolyse an Position 5 und 6 des Ringes das Glyoxal und die Aminosäuren nach Hydrolyse der Peptidbindung freigesetzt werden können. Als Zwischenverbindung könnte nach Hydrolyse an Position 6 und Erhalt der Bindung an Position 5 das N-terminale Iminoglyoxal entstehen (Abbildung 4-26, A). Dieses könnte unter Disproportionierung zum CM-Val reagieren. Damit könnte ein Verlust der N-terminalen Aminosäure erklärt werden. Alternativ könnte die hydrolytische Spaltung des 2(1*H*)-Pyrazinons an der Peptidbindung im intakten 2(1*H*)-Pyrazinon an Position 2 und an der Iminobindung in Position 3 erfolgen (Abbildung 4-26, C). Dabei kann nach weiteren Umlagerungsschritten und Hydrolyse zwar die zweite Aminosäure intakt freigesetzt werden, aber das N-terminale Valin würde zur entsprechenden  $\alpha$ -Ketosäure abgebaut.

Der Einfluss der zweiten Aminosäure auf die Stabilität könnte möglicherweise mit der Nucleophilie bzw. Basizität der N-terminalen Aminogruppe des ursprünglichen Peptids erklärt werden. Dabei muss davon ausgegangen werden, dass sich der Stickstoff an Position 4 im 2(1*H*)-Pyrazinonring diesbezüglich ebenfalls unterscheidet und Val-His-2(1*H*)-Pyrazinone an Position 4 stärker protoniert sind als Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinone. Mit einer stärkeren Protonierung des Stickstoffs bei dem hohen Protonenüberschuss unter Hydrolysebedingungen sollte der Iminokohlenstoff an Position 3 oder Position 5 für Wasser leichter angreifbar sein. Auf diese Weise könnte der erhöhte Verlust des 2(1*H*)-Pyrazinons bei Val-His erklärt werden.

Bei der Bildung von 2(1*H*)-Pyrazinonen aus Methylglyoxal wurde bereits diskutiert, dass die Ketofunktion deutlich weniger hydratisiert ist als die Aldehydfunktion und deshalb nukleophile Angriffe durch Aminogruppen bevorzugt am zweiten Kohlenstoffatom des Methylglyoxals erfolgen (Abschnitt 2.1.3.3). Dabei wirkt sich die Methylgruppe vermutlich durch die

Erhöhung der Elektronendichte (+I-Effekt) negativ auf die Hydratisierbarkeit aus. Genau dieser +I-Effekt kann ebenfalls die Hydratisierung an Position 5 des 2(1*H*)-Pyrazinons als initialen Schritt der Hydrolyse verringern und so die Stabilität des 2(1*H*)-Pyrazinons erhöhen. Da sich der induktive Effekt über mehrere Bindungen erstreckt, kann er möglicherweise auch die Hydratisierung an Position 6 einschränken.

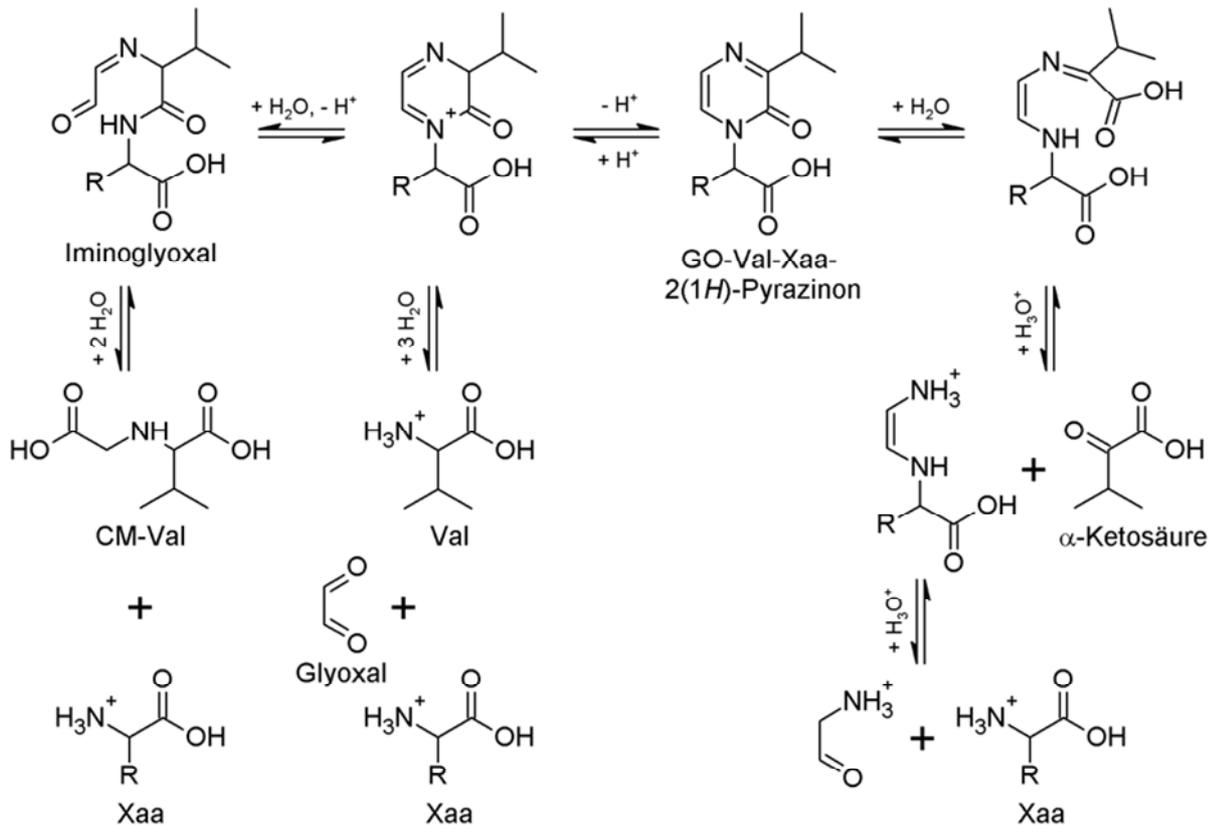


Abbildung 4-26: Mögliche Abbauege von 2(1*H*)-Pyrazinonen bei der Umsetzung mit 6 M Salzsäure bei 110 °C für 23 h; R = Seitenkette der zweiten Aminosäure des Dipeptids; Xaa = beliebige Aminosäure.

Dieses Experiment zur Stabilität von Pyrazinonen bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure wurde mit Hilfe von 2(1*H*)-Pyrazinonstrukturen durchgeführt, die aus Dipeptiden gebildet wurden. Ob sich die beobachteten Effekte gleichfalls auf die Stabilität der an Hämoglobin gebundenen 2(1*H*)-Pyrazinone auswirkt, kann nur vermutet werden. Offen bleibt diese Frage insbesondere für die von Glyoxal abgeleiteten 2(1*H*)-Pyrazinone. Da die von Methylglyoxal abgeleiteten Dipeptidpyrazinone von Abbaureaktionen nur in geringem Maß betroffen sind, kann auch von einer hohen Stabilität der an Globin gebundenen 2(1*H*)-Pyrazinone ausgegangen werden.

#### 4.3.2.2 Nachbildung N-terminaler AGEs aus dem N- $\alpha$ -Fructosylvalin des Hämoglobins

Carboxyalkylderivate an der Seitenkette von Lysin sind stabile Endprodukte und werden bei der Hydrolyse in Salzsäure nicht weiter abgebaut. Insbesondere für CML wurde aber festgestellt, dass dieses aus dem N- $\epsilon$ -Fructosyllysin nachgebildet werden kann (Krause *et al.*, 2003). Die direkte Nachbildung von CEL aus N- $\epsilon$ -Fructosyllysin ist mechanistisch nicht zu erklären.

Für N-terminale Carboxyalkylderivate des humanen Hämoglobins ist also zu erwarten, dass CM-Val aus N- $\alpha$ -Fru-Val nachgebildet werden kann. Hingegen ist eine Bildung des verzweigten Produkts CE-Val direkt aus dem Fructosylvalin nicht möglich.

Da als N-terminale AGEs im Hämoglobin auch 2(1H)-Pyrazinonstrukturen vorkommen können, ist zu klären, ob diese ebenfalls aus dem Amadori-Produkt nachgebildet werden. Für von Glyoxal abgeleitete 2(1H)-Pyrazinone ist ein Bildungsweg über das Iminoglyoxal denkbar, das auf verschiedenen Wegen aus dem N- $\alpha$ -Fru-Val-Derivat entstehen kann und eine gemeinsame Zwischenverbindung bei der Bildung von CM-Val bzw. den GO-2(1H)-Pyrazinonen darstellt (Abbildung 4-71). Das 5-Methyl-2(1H)-pyrazinon kann entsprechend dem CE-Val nicht aus dem N- $\alpha$ -Fru-Val gebildet werden. Da das 6-Methyl-2(1H)-pyrazinon aber aus dem 1-Iminomethylglyoxal entstehen kann, ist nicht auszuschließen, dass auf diesem Weg MGO-2(1H)-Pyrazinone entstehen können (Abbildung 4-63).

Um herauszufinden ob und in welchem Ausmaß N-terminale AGEs aus einem N-terminalen Fructosylderivat bei der Hydrolyse von humanem Hämoglobin in 6 M Salzsäure (23 h, 110 °C) gebildet werden, wurde isoliertes Globin unter Zusatz einer definierten Menge Fru-Val-His (2,6 nmol/6 mg Globin) hydrolysiert. Zum Vergleich wurde das Globin ohne Zusatz hydrolysiert. Zur Vermeidung der Nachbildung von CML aus N- $\epsilon$ -Fru-Lys bei der Quantifizierung von CML in Lebensmitteln wird das Amadori-Produkt vor der Hydrolyse zum Zuckeralkoholamin reduziert (Krause *et al.*, 2003). Deshalb wurde auch diese Methode darauf getestet, ob sie zur Vermeidung einer möglichen Nachbildung N-terminaler AGEs nützlich ist. Die Probenbehandlung ist in Abschnitt 3.7.7.2 beschrieben.

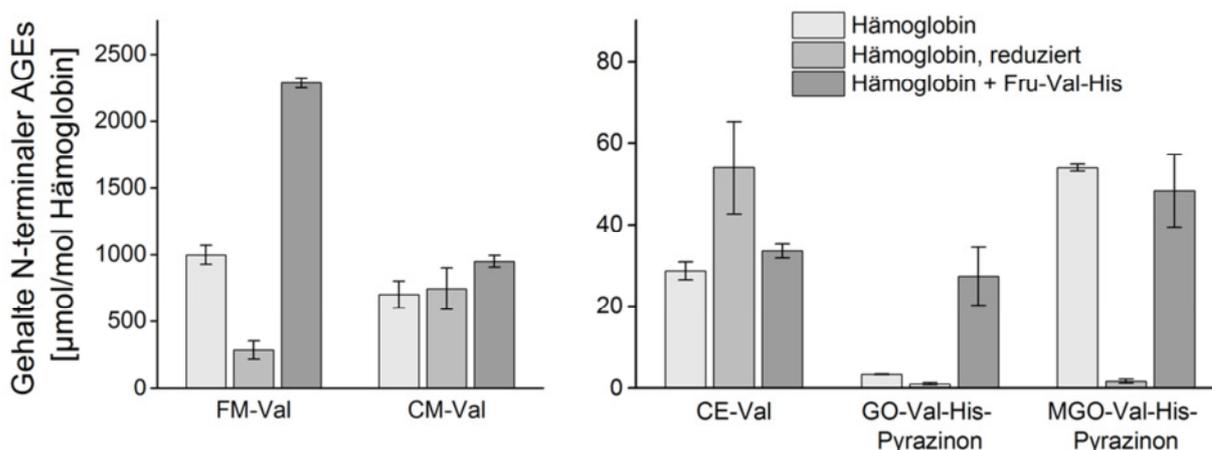


Abbildung 4-27: Gehalte N-terminaler AGEs im Hydrolysat eines Hämoglobins, eines reduzierten Hämoglobins und eines Hämoglobins mit Zusatz von Fru-Val-His

Nach der Hydrolyse wurden die Gehalte der N-terminalen MRP mit der in Abschnitt 3.3.14 beschriebenen Methode quantifiziert. Als interner Messstandard wurde den Proben vor der Messung CM-Val-Tyr zugesetzt um Messschwankungen auszugleichen. Die Kalibrierung erfolgte als Matrixkalibrierung indem die Kalibrierstandards dem Hydrolysat einer ausgewählten Globinprobe zugesetzt wurden. Dadurch sollten matrixbedingte Signalsuppressionen

bzw. –verstärkungen kompensiert werden. Die Berechnung der AGE-Gehalte in Hämoglobin erfolgte durch die Verwendung des im Hämoglobin enthaltenen Phenylalanins als internen Standard und Bezugsgröße.

In Abbildung 4-27 sind die quantifizierten Gehalte der N-terminalen AGEs und von FM-Val dargestellt. Die Gehalte sind als  $\mu\text{mol AGE pro mol Hämoglobintetramer}$  berechnet. Die Reduktion der Fructosylderivate der N-Termini sollte die Möglichkeit der Nachbildung N-terminaler AGEs aus dem Abbau des Amadori-Produkts bei der Hydrolyse in Salzsäure unterbinden. Wenn die Fructosylderivate vollständig reduziert sind, kann kein FM-Val gebildet werden. Allerdings wurden trotz Reduzierung noch 25-30% des FM-Val-Gehalts ohne vorherige Reduzierung quantifiziert. Die Unvollständigkeit der Reduzierung könnte auf die schlechte Löslichkeit des Hämoglobins und die starke Schaumbildung bei der Reduzierung zurück zu führen sein. Auch wenn die Reduzierung der Amadori-Produkte nicht vollständig war, konnte der Gehalt doch deutlich verringert werden, so dass ein möglicher Effekt auf die quantifizierbaren Gehalte der N-terminalen AGEs trotzdem beobachtbar sein sollte. Die Dotierung mit Fru-Val-His, des N-terminalen Amadori-Produkts der  $\beta$ -Kette, ergab eine Erhöhung des detektierbaren Gehalts von FM-Val um Faktor 2,3. Auf Grund dieser Dotierung sollte es möglich sein eine Nachbildung der N-terminalen AGEs durch die Hydrolyse mit Salzsäure zu beobachten.

Für CM-Val ist eine Nachbildung aus dem Amadori-Produkt möglich, doch die Reduzierung hat den Gehalt nicht verringert. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der quantifizierbare Gehalt von CM-Val schon weitestgehend originär im Hämoglobin enthalten war. Darüber hinaus zeigten *Hegele et al. (2008b)*, dass die Nachbildung von CML aus Fru-Lys durch die Reduktion zwar größtenteils vermindert, aber nicht vollständig verhindert wurde. Der Zusatz von Fru-Val-His, des N-terminalen Amadori-Produkts der  $\beta$ -Kette, erhöhte nach Hydrolyse in Salzsäure den Gehalt um etwa 35%. Diese Zunahme entspricht nur einem Viertel der Zunahme von FM-Val. Für den Umsatz von Fru-Val-His zu FM-Val nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure wurde eine Ausbeute von 4,3% ermittelt (Abschnitt 4.1.2). Der Umsatz von Fru-Val-His zu CM-Val lässt sich auf unter 0,9% abschätzen und liegt damit etwas niedriger als der Umsatz von N- $\epsilon$ -Fru-Lys zu CML von 1,5% (*Krause et al., 2003*). Das Ergebnis der Experimente zeigt, dass eine Nachbildung von CM-Val möglich ist, aber den originären Gehalt in Hämoglobin nur geringfügig erhöhen sollte. Damit kann eine Bewertung des CM-Val-Gehalts des Hämoglobins auch ohne eine Reduktion vor der Hydrolyse verwertbare Ergebnisse liefern.

Für CE-Val ist keine Nachbildung aus dem Amadori-Produkt zu erwarten. Eine direkte Bildung des an C-2 verzweigten AGEs aus Fru-Val kann mechanistisch nicht erklärt werden. Entsprechend wurde nach Zusatz von Fru-Val-His keine Erhöhung des Gehalts festgestellt. Allerdings wurden nach Reduktion leicht erhöhte Gehalte gemessen. Da die Reduktion zu einer starken Verringerung des Gehalts des MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinons geführt hat, wäre es möglich, dass ein Teil des abgebauten Pyrazinons in CE-Val umgewandelt wurde.

Durch eine partielle Reduzierung des 2(1*H*)-Pyrazinonringes und die anschließende Hydrolyse könnte CE-Val, wie in Abbildung 4-28 beschrieben, entstehen. Da das MGO-2(1*H*)-Pyrazinon verhältnismäßig hydrolysestabil ist, könnte der Verlust des konjugierten Doppelbindungssystems zu einer erleichterten Hydrolyse führen und in einem zweiten Schritt könnte das freigesetzte 1-Methyl-1-aminoglycolaldehydderivat zu CE-Val oxidiert werden. Da eine Nachbildung aus dem Amadori-Produkt nicht möglich ist und eine mögliche Nachbildung aus dem 5-Methyl-2(1*H*)-pyrazinonen ohne Reduzierung quantitativ nicht relevant zu sein scheint, sollte die quantitative Bewertung der CE-Modifizierung der N-Termini der Hämoglobinketten nach Hydrolyse mit Salzsäure sinnvoll und möglich sein.

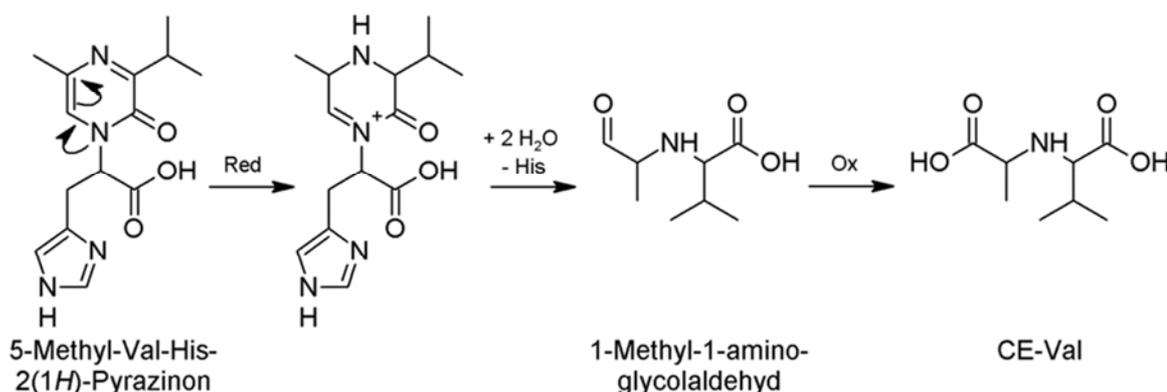


Abbildung 4-28: Umwandlung des 5-Methyl-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons in CE-Val durch partielle Reduzierung mit Natriumborhydrid, Hydrolyse und Oxidation bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure

In den Untersuchungen zur Stabilität der 2(1*H*)-Pyrazinone bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure konnte ein deutlicher Abbau der von Glyoxal abgeleiteten 2(1*H*)-Pyrazinone beobachtet werden (Abschnitt 4.3.2.1). Nach Zusatz von Fru-Val-His zu einer Globinprobe vor der Hydrolyse, der eine Verdoppelung der Bildung von FM-Val verursachte, wurde eine deutliche Steigerung des quantifizierbaren Gehalts des GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons um Faktor 8 beobachtet. Der viel stärkere Einfluss auf den Gehalt des GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons lässt vermuten, dass eine Nachbildung aus dem Amadori-Produkt stattfand, diese aber ausgehend vom Fructosyldipeptid um ein Vielfaches stärker ausfiel, als ausgehend vom Fructosylhämoglobin zu erwarten ist. Die Anwendung der Reduktion vor der Hydrolyse des isolierten Globins bewirkte eine Verringerung des quantifizierbaren Gehalts des GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons auf ein Drittel. Auch der Gehalt von FM-Val wurde auf ein Drittel verringert, so dass ein direkter Zusammenhang möglich wäre. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass der Gehalt des MGO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons nach Reduktion ebenfalls stark verringert war, obwohl nicht von einer Nachbildung aus den Fructosylderivaten auszugehen ist. Aus diesen drei Experimenten kann geschlossen werden, dass der quantifizierbare Gehalt des von Glyoxal abgeleiteten 2(1*H*)-Pyrazinons des Globins von den Bedingungen der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure durch Abbau- sowie Nachbildungsprozesse beeinflusst wurde. Wie stark sich die einzelnen Effekte quantitativ auswirkten, kann an dieser Stelle nicht abschließend bewertet werden und sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Die

mit der beschriebenen Aufarbeitung ermittelten Gehalte von Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinonen in Hämoglobinproben können nur orientierend verwendet werden. Die standardisierten Bedingungen der Aufarbeitung erlauben somit nur eingeschränkt quantitative Vergleiche mit anderen AGEs, aber durchaus relative Vergleiche zwischen Probanden.

Für die Methylglyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone wurde eine gute Stabilität unter den Bedingungen der Hydrolyse mit Salzsäure festgestellt (Abschnitt 4.3.2.1). In den Proben des reduzierten Globins wurden 25-fach geringere Gehalte quantifiziert als im unbehandelten Globin. Diese starke Abnahme kann nicht mit der Reduzierung des Amadori-Produkts erklärt werden, da diese nur etwa 75% betrug. Es muss davon ausgegangen werden, dass die ungesättigten Bindungen der 2(1*H*)-Pyrazinonstruktur reduziert wurden. Für CE-Val wurden nach Reduzierung geringfügig höhere Gehalte gemessen. Diese könnten sich wie oben beschrieben aus dem Abbau von partiell reduzierten 5-Methyl-2(1*H*)-pyrazinonen ergeben. Der zweite Beleg, dass die Gehalte der Methylglyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone nicht durch eine Nachbildung aus dem N-terminalen Amadori-Produkt beeinflusst sind, ist die Beobachtung, dass nach Zugabe von Fru-Val-His vor der Hydrolyse keine entsprechende Erhöhung des Gehalts des MGO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons bestimmbar war. Mechanistisch betrachtet könnte die Nachbildung des 6-Methyl-2(1*H*)-pyrazinons aus dem Amadori-Produkt nicht vollständig ausgeschlossen werden, da nach einer Dehydratisierung an C-3 des Zuckerrests mit anschließender Spaltung zwischen C-3 und C-4 die Bildung des 6-Methyl-2(1*H*)-pyrazinons formulierbar wäre (Abbildung 2-3 bzw. Abbildung 4-63). Da keine Nachbildung des Methylglyoxal-2(1*H*)-Pyrazinons nachweisbar war, können nach der Hydrolyse mit Salzsäure die originären Gehalte der Methylglyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone des Hämoglobins bestimmt werden.

#### 4.3.2.3 Fazit zur Nachbildung und Stabilität N-terminaler AGEs bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure

Mit dem Ziel der Entwicklung einer Analysenmethode zur Quantifizierung N-terminaler AGEs in humanem Hämoglobin wurde die Stabilität von 2(1*H*)-Pyrazinonen und die Nachbildung der von Glyoxal und Methylglyoxal abgeleiteten N-terminalen AGEs unter den Bedingungen der Proteinhydrolyse mittels 6 M Salzsäure (23 h, 110 °C) untersucht. Diese Methode stellt ein Standardverfahren zur vollständigen Hydrolyse von Proteinen dar.

Die Carboxyalkylderivate sind stabile Endprodukte, die bei der Hydrolyse nicht weiter abgebaut werden. CE-Derivate können nicht aus dem Amadori-Produkt nachgebildet werden. Für CM-Derivate ist eine Nachbildung aus dem Amadori-Produkt bekannt. Doch der Vergleich der Hydrolyse von Globin, reduziertem Globin und Globin mit Zusatz von Fru-Val-His hat ergeben, dass CM-Val nicht oder nur in sehr geringem Maß aus dem im Globin vorhandenen Amadori-Produkt nachgebildet wird. Damit können die Carboxyalkylderivate CM-Val und CE-Val nach Freisetzung durch die Hydrolyse mit Salzsäure zur Bewertung des N-terminalen Glykierungsstatus verwendet werden.

Die N-terminalen Methylglyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone der Globinketten zeigten unter Hydrolysebedingungen mit Wiederfindungsraten von 107% ( $\alpha$ -Kette) und 84% ( $\beta$ -Kette) eine gute Stabilität. Die Experimente zur Untersuchung einer möglichen Nachbildung haben ergeben, dass eine Reduzierung des Globins zu einer starken Abnahme und die Dotierung mit Fru-Val-His zu keiner Zunahme des detektierbaren Gehalts führten. Die Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone zeigten keine gute Stabilität bei der Hydrolyse und nach Reduktion. Nach der Dotierung von Fru-Val-His kann von einer Nachbildung des Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinons aus dem Amadori-Produkt bei der Hydrolyse ausgegangen werden. Damit sind die Methylglyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone, die Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone aber nur eingeschränkt, zur Bewertung des Glykierungsstatus der N-Termini der Globinketten geeignet.

Die Hydrolyse des Globins mit 6 M Salzsäure ermöglicht eine zuverlässige Spaltung der Peptidbindungen und damit die vollständige Freisetzung der Aminosäuren und der N-terminalen Glykierungsprodukte. Ein vorheriger Reduzierungsschritt führte zum Verlust von 2(1*H*)-Pyrazinonen, möglicherweise einer Nachbildung von CE-Val und zu keiner Verringerung des Gehalts von CM-Val. Deshalb findet die Reduzierung keine Anwendung.

Es konnte gezeigt werden, dass die N-terminalen AGEs CM-Val, CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon sowie MGO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon gut, bzw. die GO-Val-Leu- und GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinone nur eingeschränkt, für eine Quantifizierung nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure geeignet sind und damit gemeinsam mit FM-Val in einer Methode analysiert werden können.

### **4.3.3 Nachweis und Quantifizierung N-terminaler MRPs in humanem Hämoglobin nach Hydrolyse in 6 M Salzsäure**

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie der qualitative Nachweis der N-terminalen MRPs des Hämoglobins als Voraussetzung für deren Quantifizierung durchgeführt wurde. Ausgehend von Referenzstandards wurden die MRPs in den Hämoglobinhydrolysaten eindeutig mittels LC-MS/MS nachgewiesen. Dazu wurde die Übereinstimmung der Elutionszeit mittels Standardaddition überprüft und die zweifelsfreie Detektion erfolgte über charakteristische Massenübergänge der Analytmoleküle. Die chromatographischen Bedingungen und die Einstellungen des Massendetektors sind in Abschnitt 3.3.14 beschrieben.

Nachdem N-terminale Glykierungsprodukte mittels enzymatischer Hydrolyse nicht vollständig freigesetzt werden konnten (Abschnitt 4.3.1), erfolgte die Hydrolyse des Globins und die Freisetzung der N-terminalen Modifizierungen mit 6 M Salzsäure (Abschnitt 3.7.6). Dabei wurden die MRPs durch die hydrolytische Spaltung einer Peptidbindung in gleicher Weise wie Aminosäuren freigesetzt.

Bei der Hydrolyse wird das N-terminal gebundene Amadori-Produkt Fru-Val zu einem reproduzierbaren Anteil zu freiem, analytisch gut erfassbarem FM-Val umgewandelt. Die N- $\alpha$ -Carboxyalkylderivate sind hydrolysestabil und eine Nachbildung ist nicht (CE-Val) oder

kaum (CM-Val) relevant (Abschnitt 4.3.2). Für die Methylglyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone der Hämoglobinketten wurde ebenfalls eine gute Stabilität und keine Nachbildung ermittelt. Einzig die Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone sind nicht hydrolysestabil und können aus dem Amadori-Produkt nachgebildet werden. Damit ist die Hydrolyse mit 6 M Salzsäure mit Ausnahme der Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone gut geeignet um die Gehalte der N-terminalen AGEs in humanen Hämoglobinproben direkt zu quantifizieren.

Die Quantifizierung der N-terminalen AGEs erfolgte über eine Matrixkalibrierung. Dazu wurde eine Mischung aus Hämoglobinhydrolysaten mehrerer humaner Blutproben hergestellt und mit Standardadditionsstufen so dotiert, dass für jeden Analyten eine Kalibrierung in einer sinnvollen Größenordnung entstand. Als interner Standard wurde das Phenylalanin des Hämoglobins genutzt, auf dessen reproduzierbaren Anteil im Hämoglobin die Gehalte der AGEs bezogen werden konnten. Das genaue Vorgehen wurde in Abschnitt 3.3.14 erklärt.

#### 4.3.3.1 Fructosylvalin (Fru-Val)

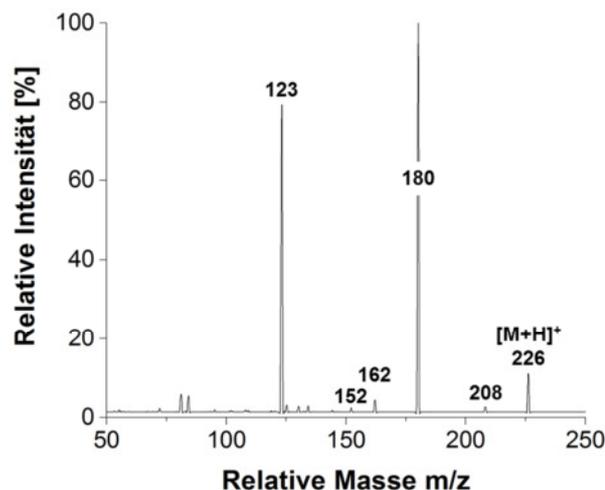


Abbildung 4-29: Massenspektrum der Fragmentierung von FM-Val (Referenzstandard) im positiven Modus bei einer Kollisionsenergie von 10 eV

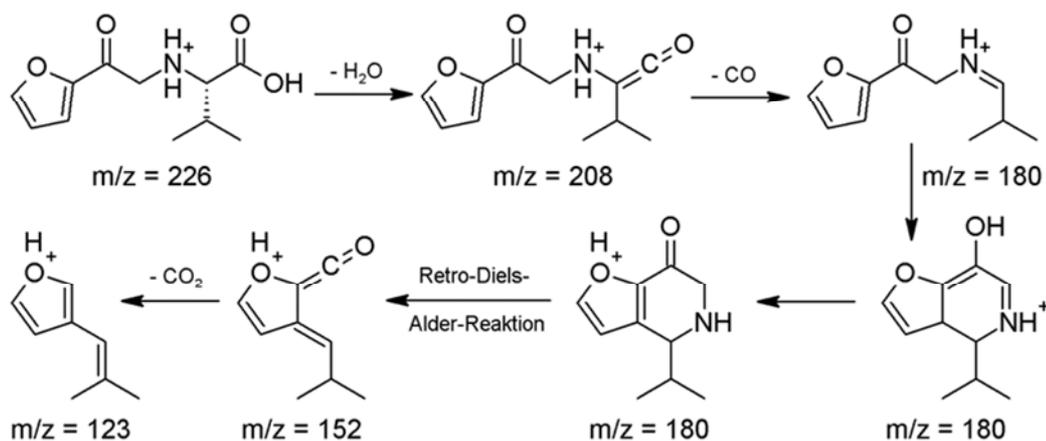
In Abbildung 4-29 ist das Massenspektrum des während der Hydrolyse aus Fructosylvalin gebildeten FM-Vals dargestellt. Die Signale ausgewählter Fragmente sind mit den relativen Molekülmassen der Molekülonen beschriftet und in Tabelle 4-8 sind die Fragmente mit einer Erklärung der Masseverluste aufgelistet. Die Strukturen einiger charakteristischer Fragmente und mögliche Fragmentierungsreaktionen sind in Abbildung 4-30 zusammengefasst. Für die Quantifizierung von FM-Val in Hämoglobinhydrolysaten wurden Massenübergänge mit hoher Intensität und Empfindlichkeit ausgewählt. Für FM-Val wurden der Übergang von  $m/z = 226$  auf  $m/z = 180$  als Quantifier und der Übergang auf  $m/z = 123$  als Qualifier verwendet (Tabelle 3-23).

Tabelle 4-8: Fragmente des Massenspektrums von FM-Val

Amadori-Produkt	Precursorion m/z ([M+H] <sup>+</sup> )	Fragmentionen m/z ([M+H] <sup>+</sup> ) <sup>a</sup>
FM-Val	226	208 (- H <sub>2</sub> O), 180 (- H <sub>2</sub> O, - CO), 162 (180 - H <sub>2</sub> O), 152 (180 - CH <sub>2</sub> =NH), 123 (152 - CO)

<sup>a</sup> Charakteristische Fragmentationen gemessen im positiven Modus

In Abbildung 4-33 (C) ist ein exemplarisches Chromatogramm für FM-Val dargestellt. Für die zwei detektierten Massenspuren wurden die Chromatogramme eines Matrixmixes und einer Standardadditionsprobe des gleichen Matrixmixes überlagert. Es ist gut zu erkennen, dass über das Standardadditionsexperiment für beide charakteristischen Massenübergänge die selben Elutions- und Detektionseigenschaften in dem Gemisch der Hämoglobinhydrolysate und der Standardadditionsprobe nachgewiesen wurden. Für beide Massenübergänge wurde ein proportionaler Zuwachs der Signalintensität beobachtet. Damit kann davon ausgegangen werden, dass die Substanz in den Hämoglobinhydrolysaten mit dem synthetisierten Referenzstandard (Abschnitt 4.1.4) übereinstimmt.

Abbildung 4-30: Fragmentierungsschema für FM-Val ([M+H]<sup>+</sup> = 226)

Über die Quantifizierung von FM-Val in den Hämoglobinhydrolysaten sollte auf den ursprünglichen Gehalte von Fru-Val in den Hämoglobinproben geschlossen werden. Da das Fructosylderivat einer Aminosäure unter definierten Bedingungen der Hydrolyse in Salzsäure reproduzierbar zu dem Furoylmethylderivat der Aminosäure umgesetzt wird, kann über einen Korrekturfaktor auf den Gehalt des Fructosylderivats vor der Hydrolyse zurückgeschlossen werden (Krause *et al.*, 2003).

Für das N-terminale Fructosyldipeptid der  $\alpha$ -Kette (Fru-Val-Leu) wurde ein Umsatz zu FM-Val von 8,2% und für das Fru-Val-His der  $\beta$ -Kette von 4,3% ermittelt (Tabelle 4-2). Diese Konstellation führt zu dem Problem, dass nicht ohne Weiteres ein einheitlicher Korrekturfaktor zur Berechnung des ursprünglichen Fru-Val-Gehalts verwendet werden kann. Weiterhin ist nicht bekannt, wie sich die weitere Kettenverlängerung über das Fructosyldipeptid hinaus auf den Umsatz zu FM-Val auswirkt. Da aber humanes Hämoglobin N-terminal überwiegend

am N-Terminus der  $\beta$ -Kette (ca. 90%) glykiert ist (Jeppsson *et al.*, 2002; Shapiro *et al.*, 1980), wurde für die Berechnung der Fru-Val-Gehalte im Hämoglobin der Korrekturfaktor für Fru-Val-His verwendet.

#### 4.3.3.2 Carboxyalkylderivate (CM-Val, CE-Val)

Die Hydrolyse des Hämoglobins mit 6 M Salzsäure führt zur Freisetzung der N-terminalen Carboxyalkylderivate CM-Val und CE-Val. Genau wie Fru-Val bzw. FM-Val können diese von beiden Hämoglobinketten stammen.

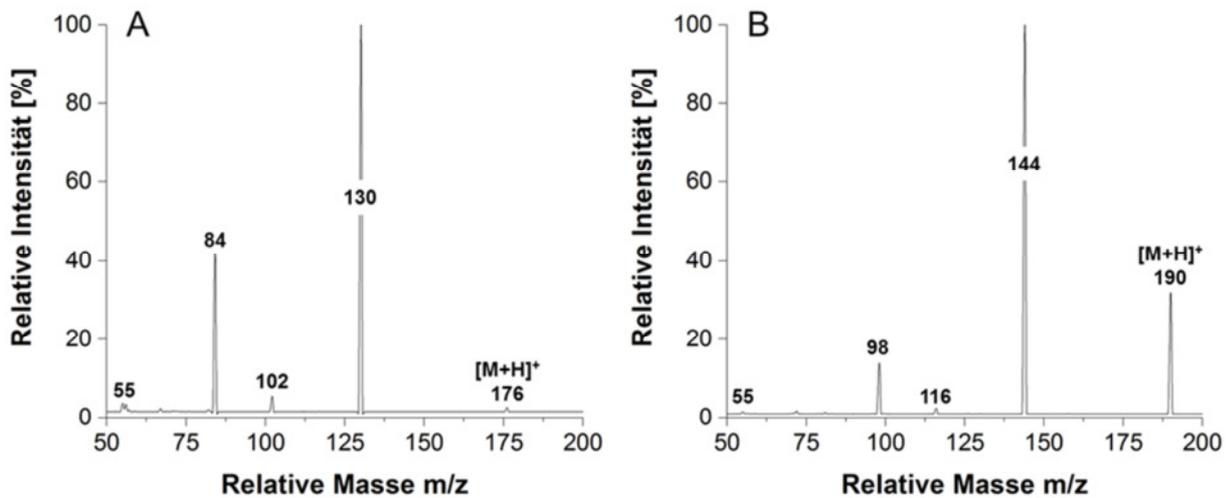


Abbildung 4-31: Massenspektren der Fragmentierung von (A) CM-Val (10 eV Kollisionsenergie) und von (B) CE-Val (5 eV Kollisionsenergie).

In Abbildung 4-31 sind die Massenspektren von CM-Val und CE-Val dargestellt und in Tabelle 4-9 sind die Fragmentationen mit einer Erklärung der Masseverluste aufgelistet. Für beide AGEs ist die Abspaltung von Wasser ( $m/z = 18$ ) und Kohlenstoffmonoxid ( $m/z = 28$ ) charakteristisch (Abbildung 4-32). Dabei unterscheiden sich die Massen der Molekülonen und der Fragmente von CM-Val und CE-Val genau um die relative Masse  $m/z = 14$ , die einer Methylgruppe entspricht.

Tabelle 4-9: Fragmente des Massenspektrums von CM-Val und CE-Val

Amadori-Produkt	Precursorion m/z ([M+H] <sup>+</sup> )	Fragmentationen m/z <sup>a</sup>
CM-Val	176	130 (- H <sub>2</sub> O, - CO), 102 (130 - H <sub>2</sub> O), 84 (130 - H <sub>2</sub> O, - CO), 55 (84 - CH <sub>2</sub> =NH)
CE-Val	190	144 (- H <sub>2</sub> O, - CO), 116 (144 - H <sub>2</sub> O), 98 (144 - H <sub>2</sub> O, - CO), 55 (98 - CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> )=NH)

<sup>a</sup> Charakteristische Fragmentationen gemessen im positiven Modus

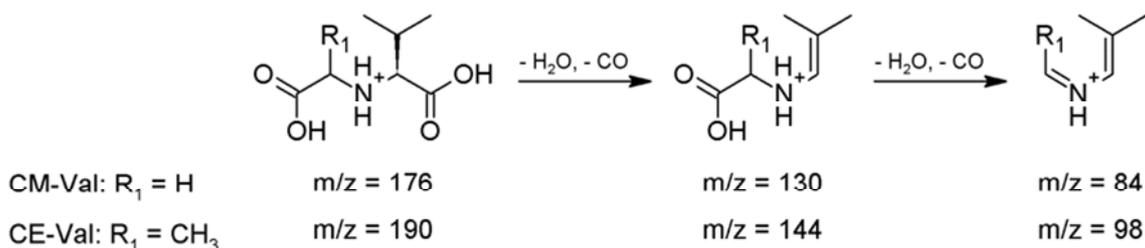


Abbildung 4-32: Fragmentierungsschema für CM-Val ( $[M+H]^+ = 176$  Da) und CE-Val ( $[M+H]^+ = 190$  Da)

Die charakteristischen Massenübergänge für CM-Val und CE-Val wurden zur eindeutigen Identifizierung und Quantifizierung in hydrolysierten Hämoglobinproben verwendet. Nach Addition der synthetisierten Referenzstandards (Abschnitt 4.1.6) zu Hämoglobinhydrolysaten konnte die Peakzuordnung durch die Übereinstimmung der Elutionszeiten, wie in Abbildung 4-33 dargestellt, für CM-Val (A) und CE-Val (B) belegt werden. Damit gelang der Nachweis, dass das N-terminale Valin der Hämoglobinketten *in vivo* nicht nur zu CM- sondern auch CE-Val derivatisiert wird. CM-Val wurde von *Cai & Hurst (1999)* bereits in Hämoglobin nachgewiesen (Abschnitt 2.3.6.1). Aber CE-Val wurde bisher ausschließlich in mit Lactose inkubiertem  $\beta$ -Lactoglobulin (*Meltretter et al., 2013*) und noch nicht in biologischen Proben detektiert.

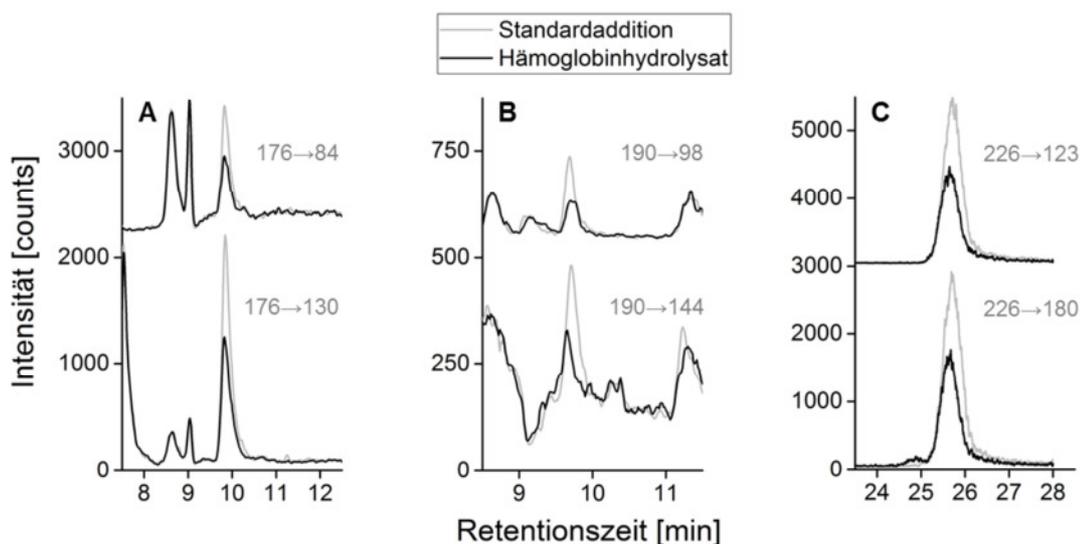


Abbildung 4-33: LC-MS/MS-Chromatogramme von je zwei charakteristischen Massenübergängen von CM-Val, CE-Val und FM-Val in einem Hämoglobinhydrolysat (Mischung aus Hämoglobinhydrolysaten für die Matrixkalibrierung) und einem Kalibrierstandard (Standardaddition, Matrixkalibrierung); **A** – CM-Val, **B** – CE-Val, **C** – FM-Val.

#### 4.3.3.3 2(1H)-Pyrazinone

Da in die Strukturen der 2(1H)-Pyrazinone die ersten zwei Aminosäuren der N-Termini der Hämoglobinketten eingeschlossen sind, können diese nach der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure weiterhin der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette des Hämoglobins zugeordnet werden. Zum Nachweis und der

Quantifizierung von 2(1*H*)-Pyrazinonen im Hydrolysat von humanem Hämoglobin wurden diese Analyten bei der Entwicklung der LC-MS/MS-Methode berücksichtigt.

Das Detektionsprinzip basiert auf der Verwendung charakteristischer Massenübergänge. In Abbildung 4-34 und Abbildung 4-35 sind die Fragmentierungsspektren der untersuchten 2(1*H*)-Pyrazinone dargestellt und die Massenverluste sind in Tabelle 4-10 erklärt. Dabei wird deutlich, dass sich die Fragmentierung der 2(1*H*)-Pyrazinone hinsichtlich der Massenverluste gleichen. Die Massen der detektierten Fragmente unterscheiden sich wegen unterschiedlicher Aminosäureseitenketten der zweiten Aminosäure und der Methylgruppe am 2(1*H*)-Pyrazinonring bei den MGO-2(1*H*)-Pyrazinonen. In Abbildung 4-36 ist ein exemplarisches Fragmentierungsschema für von Val-His abgeleitete 2(1*H*)-Pyrazinone dargestellt. Die Abfolge der Fragmentierungen und die zugrundeliegenden Fragmentierungsreaktionen sind als eine von mehreren Möglichkeiten anzusehen.

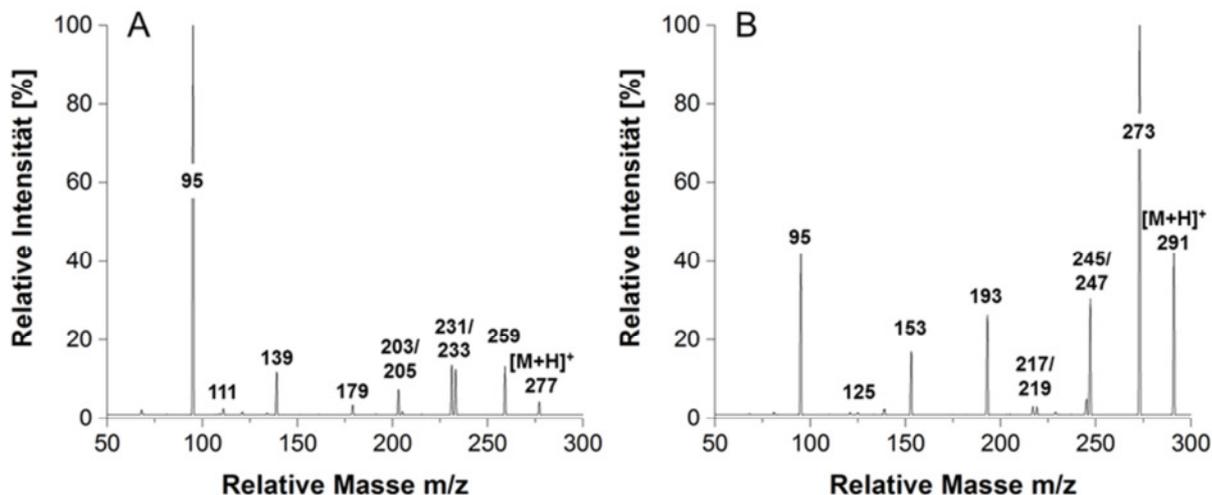


Abbildung 4-34: Massenspektren der Fragmentierung des (A) GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons (15 eV Kollisionsenergie) und des (B) MGO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons (10 eV Kollisionsenergie).

Das reproduzierbare Fragmentierungsprinzip der 2(1*H*)-Pyrazinone eröffnet eine einfache Möglichkeit 2(1*H*)-Pyrazinone auch in anderen Proben als humanem Hämoglobin zu finden. Dabei kann einerseits gezielt nach Modifizierungen von quantitativ relevanten Proteinen oder weniger zielgerichtet nach beliebig zusammengesetzten 2(1*H*)-Pyrazinonen gesucht werden. Für orientierende Untersuchungen kann auf Pyrazinonstrukturen gescreent werden, ohne dass bereits Referenzstandards vorliegen müssen.

Eine naheliegende Anwendung ist die Suche nach der N-terminalen Modifizierung des humanen Serumalbumins zu 2(1*H*)-Pyrazinonen. *Kunert (2009)* konnte keine 2(1*H*)-Pyrazinone des humanen Serumalbumins nachweisen. Aber mit Hilfe der vollständigen Hydrolyse mit 6 M Salzsäure und der empfindlichen Analytik mittels LC-MS/MS könnte ein Nachweis gelingen.

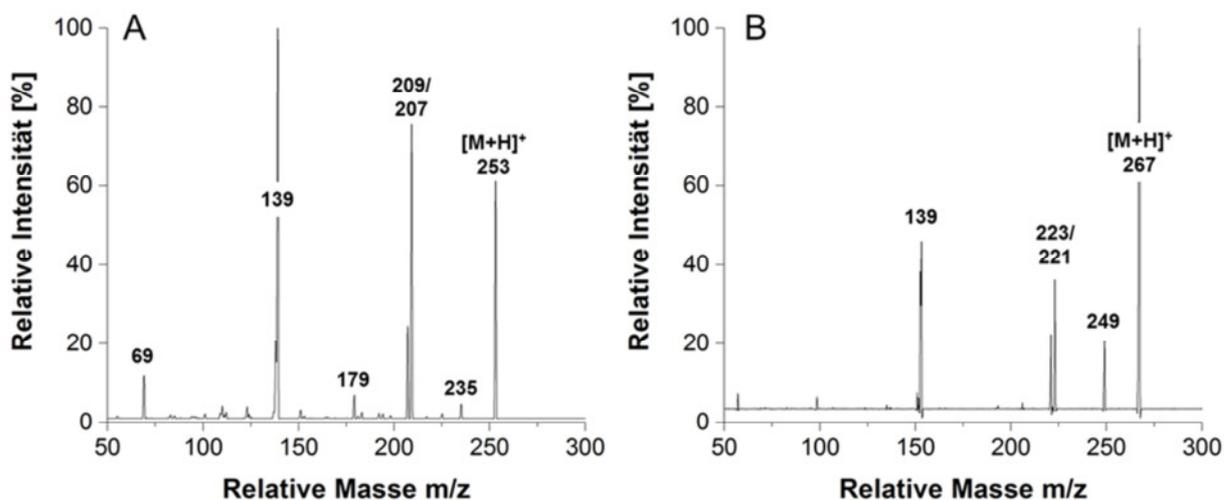


Abbildung 4-35: Massenspektren der Fragmentierung des (A) GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons (15 eV Kollisionsenergie) und des (B) MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons (10 eV Kollisionsenergie).

Ein allgemeinerer Ansatz könnte zur Analyse von 2(1H)-Pyrazinonen in Plasma- und Urinproben verwendet werden. Wenn N-Termini von Proteinen oder Peptiden *in vivo* zu 2(1H)-Pyrazinonen derivatisiert und diese Proteine zur Rückgewinnung der Aminosäuren durch zelluläre Prozesse zerlegt wurden, müssen freie 2(1H)-Pyrazinone oder 2(1H)-Pyrazinone mit weiteren C-terminal gebundenen Aminosäuren freigesetzt werden. Wenn diese 2(1H)-Pyrazinone zur Ausschleusung aus dem Organismus nicht modifiziert werden, sollten sie im Blutplasma bzw. dem Urin zu finden sein. Obwohl dann die Aminosäurezusammensetzung der 2(1H)-Pyrazinone beliebig sein kann, besteht auf Grundlage der 23 proteinogenen Aminosäuren und der systematischen Fragmentierung der 2(1H)-Pyrazinone die Möglichkeit gemäß einer Metabolomics- bzw. Proteomicsanalyse automatisierte Untersuchungen durchzuführen.

Tabelle 4-10: Fragmente des Massenspektrums der 2(1H)-Pyrazinone

Amadori-Produkt	Precursorion m/z ([M+H] <sup>+</sup> ) [Da]	Fragmentionen m/z [Da] <sup>a</sup>
GO-Val-His-2(1H)-pyrazinon	277	259 (- H <sub>2</sub> O), 233 (-CO), 231 (- H <sub>2</sub> O, - CO), 205 (233 - CO), 203 (231 - CO), 179 (- H <sub>2</sub> O, - His-Seitenkette), 139 (233/231 - His-Seitenkette), 111 (139 - CO), 95 (His-Seitenkette)
MGO-Val-His-2(1H)-pyrazinon	291	273 (- H <sub>2</sub> O), 247 (-CO), 245 (- H <sub>2</sub> O, - CO), 219 (233 - CO), 217 (245 - CO), 193 (- H <sub>2</sub> O, - His-Seitenkette), 153 (147/245 - His-Seitenkette), 125 (153 - CO), 95 (His-Seitenkette)
GO-Val-Leu-2(1H)-pyrazinon	253	235 (- H <sub>2</sub> O), 209 (-CO), 207 (- H <sub>2</sub> O, - CO), 179 (207 - CO) oder 179 (- H <sub>2</sub> O, - Leu-Seitenkette), 139 (209/207 - Leu-Seitenkette), 69 (Leu-Seitenkette)
MGO-Val-Leu-2(1H)-pyrazinon	267	249 (- H <sub>2</sub> O), 223 (-CO), 221 (- H <sub>2</sub> O, - CO), 153 (209/207 - Leu-Seitenkette)

<sup>a</sup> Charakteristische Fragmentionen gemessen im positiven Modus

Ausgehend von den charakteristischen Massenübergängen der 2(1*H*)-Pyrazinone der N-Termini der Hämoglobinketten wurden diese nach Hydrolyse des humanen Hämoglobins mit 6 M Salzsäure analysiert. In Abbildung 4-37 sind exemplarische Chromatogramme einer Mischung von Hämoglobinhydrolysaten und einer Standardaddition dargestellt. Die Übereinstimmung der Elutionszeit und die Zunahme der Peakflächen bei den ausgewählten Massenübergängen belegen eindeutig die Identifizierung der 2(1*H*)-Pyrazinone des Hämoglobins in humanen Blutproben.

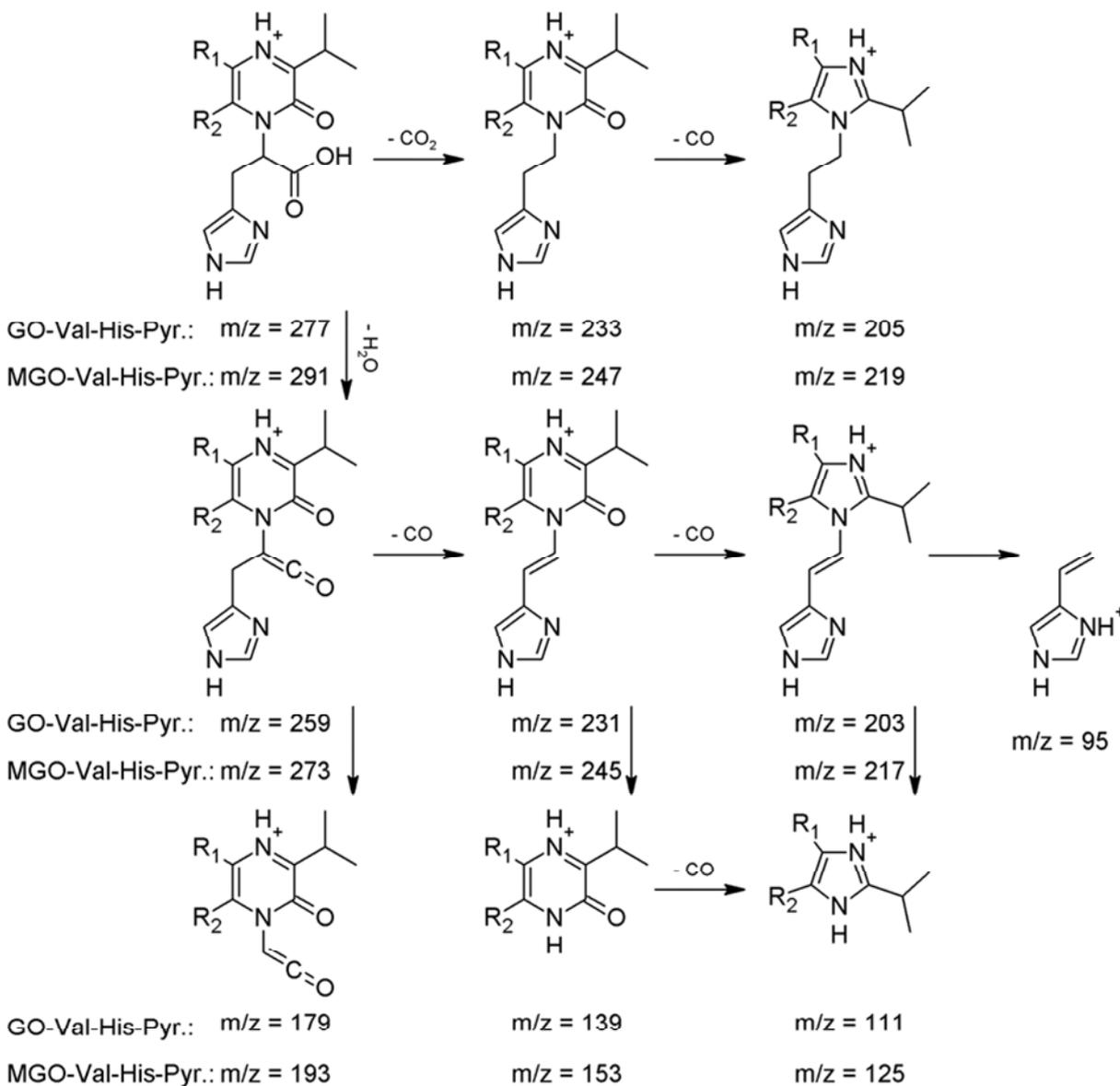


Abbildung 4-36: Charakteristische Fragmente des GO- ( $R_1 = \text{H}$  und  $R_2 = \text{H}$ ) und des MGO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons ( $R_1 = \text{H}$  und  $R_2 = \text{CH}_3$  oder  $R_1 = \text{CH}_3$  und  $R_2 = \text{H}$ )

In den Spektren der 2(1*H*)-Pyrazinone waren zwar die gleichen Fragmente zu beobachten, aber je nach Struktur des 2(1*H*)-Pyrazinons zeigten unterschiedliche Massenübergänge die besten Eigenschaften für eine empfindliche Quantifizierung. So hatte bei den Val-His-2(1*H*)-Pyrazinonen der Übergang auf das Fragmentation mit der relativen Masse  $m/z = 95$ , das der

Seitenkette des Histidins entspricht, die günstigsten Detektionsbedingungen. Für die 2(1*H*)-Pyrazinone des Dipeptids Val-Leu war der Massenübergang auf  $m/z = 139$  bzw. 153 am besten geeignet. Diese Fragmentation entspricht der 2(1*H*)-Pyrazinongrundstruktur, die nur noch die Aminogruppe der zweiten Aminosäure enthält (Abbildung 4-36).

Eine Besonderheit ergibt sich in der Quantifizierung für die von Methylglyoxal abgeleiteten 2(1*H*)-Pyrazinone. In der Massendetektion konnte nicht zwischen den 6-Methyl- und den 5-Methyl-2(1*H*)-pyrazinonen unterschieden werden und eine chromatographische Trennung wurde nicht beobachtet. Da schon die Glyoxal- (Abbildung 4-36: A, C) und Methylglyoxalderivate (Abbildung 4-36: B, D) eines Peptids nur geringfügig unterschiedliche Elutionszeiten aufwiesen, kann unter den angewendeten chromatographischen Bedingungen von einer Koelution der beiden Methylglyoxal-2(1*H*)-pyrazinone ausgegangen werden. Damit bleibt unklar, in welchen Anteilen die beiden Strukturisomere in den Proben vorliegen. Unter der Annahme, dass der nukleophile Angriff vorrangig an der Ketofunktion des Methylglyoxals erfolgt, weil diese weniger stark hydratisiert vorliegt (Abschnitt 2.1.3.3), kann vermutet werden, dass überwiegend das 5-Methyl-Pyrazinon vorkommt. Da die zwei möglichen Methyl-2(1*H*)-pyrazinone analytisch nicht getrennt wurden, entsprechen quantitative Angaben der Summe der beiden Derivate.

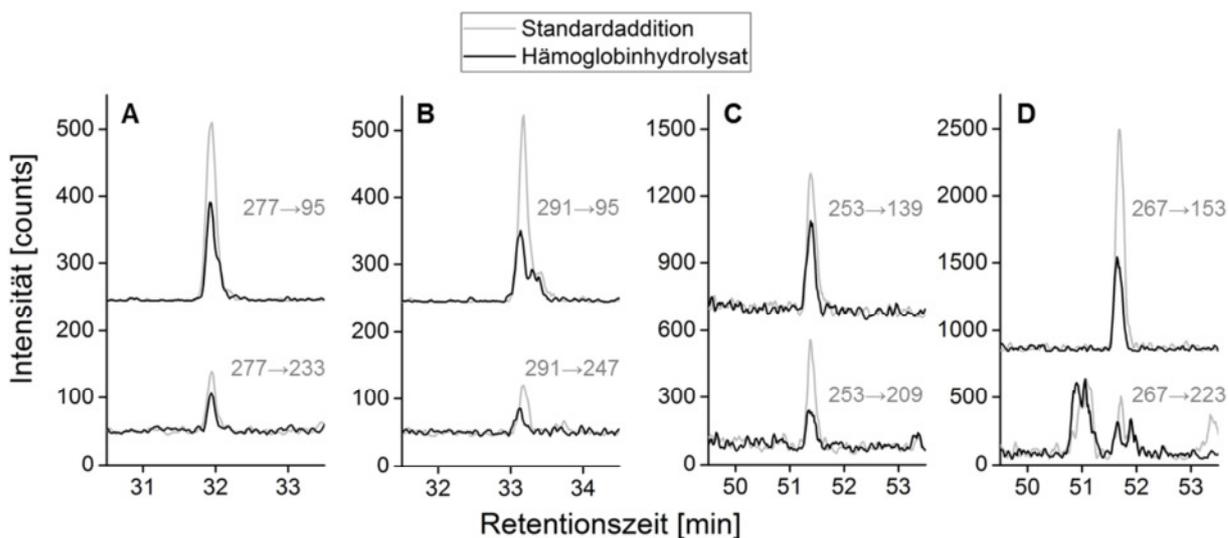


Abbildung 4-37: LC-MS/MS-Chromatogramme von je zwei charakteristischen Massenübergängen der 2(1*H*)-Pyrazinone in einem Hämoglobinhydrolysat (Mischung aus Hämoglobinhydrolysaten für die Matrixkalibrierung) und einem Kalibrierstandard (Standardaddition, Matrixkalibrierung); **A** – GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon, **B** – MGO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon, **C** – GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon, **D** – MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon.

Da die 2(1*H*)-Pyrazinone kettenspezifische AGEs sind, kann die Derivatisierung im Unterschied zu den Amadori-Produkten und den Carboxyalkylderivaten zwischen der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Kette unterschieden werden. *Kunert (2009)* gelang bereits die Identifizierung des GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons in humanem Hämoglobin. Mit der hier beschriebenen LC-MS/MS-Methode gelang nicht nur die Bestätigung des Vorkommens des GO-Val-His-2(1*H*)-

Pyrazinons sondern der Nachweis aller vier von Glyoxal und Methylglyoxal abgeleiteten 2(1*H*)-Pyrazinone beider Hämoglobinketten.

#### 4.3.3.4 Fazit zur Analytik N-terminaler MRPs in humanem Hämoglobin

Fru-Val, CM-Val und das GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon wurden bereits in anderen Studien in humanem Hämoglobin nachgewiesen, aber CE-Val, das MGO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon, das GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon und das MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon wurden hier erstmals in humanem Hämoglobin identifiziert. Neben dem qualitativen Nachweis der genannten N-terminalen MRPs wurde eine Methode zu deren Quantifizierung entwickelt, mit der alle sieben N-terminalen AGEs in einem Lauf erfasst werden können. Zur chromatographischen Trennung der Analyten wurde eine geeignete RP-HPLC-Methode erarbeitet. Die empfindliche Detektion und die eindeutige Zuordnung erfolgte über charakteristische Massenübergänge sowie den Vergleich mit synthetisierten Referenzstandards.

Damit ist der systematische Nachweis der Modifizierung der N-Termini der beiden Hämoglobinketten zu den Carboxyalkylderivaten und den 2(1*H*)-Pyrazinonen gelungen. Insbesondere Hämoglobin ist wegen der hohen Lebensdauer gut geeignet, um stabile Endprodukte der Glykierung nachzuweisen. Für weitere Fragestellungen ist aber auch Serumalbumin interessant, das zwar eine geringere mittlere Zirkulationszeit hat, aber im Plasma als Protein mit einer definierten Aminosäuresequenz und in hoher Konzentration vorliegt.

#### 4.3.4 Quantifizierung der MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin in Hämoglobin nach enzymatischer Hydrolyse

Die Quantifizierung der MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin in Hämoglobin erfolgte in Anlehnung an die Methode von *Thornalley et al. (2003)*. Das konkrete Vorgehen bei der enzymatischen Hydrolyse sowie zur Quantifizierung wurde von *Peßler (2013)* entwickelt und in den Abschnitten 3.7.5 bzw. 3.3.15 beschrieben. Anwendung fand die Methode bereits bei der Quantifizierung der freien MRPs in humanem Blutplasma (*Teichert et al., 2015*).

In Abbildung 4-38 sind exemplarische Chromatogramme der vier Analyten in einem Matrixmix und einer Standardadditionsprobe dieses Matrixmixes als Überlagerung dargestellt. Zusätzlich sind die Massenübergänge der stabilisotopenmarkierten internen Standards abgebildet. Im Chromatogramm von CEL (Abbildung 4-38, C) fehlt das Signal für einen internen Standard, weil für CEL kein isotopenmarkierter Standard verfügbar war. Für die Matrixkalibrierung wurde ein Matrixmix aus 5 verschiedenen Hämoglobinhydrolysaten verwendet. Zur Standardaddition wurden die authentischen Referenzstandards dem Matrixmix zudotiert.

Durch die Verwendung charakteristischer Massenübergänge bei der Detektion wird eine hohe Selektivität erreicht. Die proportionale Zunahme der Intensität der Signale im Standardadd-

tionsexperiment und die Übereinstimmung der Elutionszeit bei Standardaddition sowie mit dem isotoopenmarkierten internen Standard belegt die korrekte Identifizierung der Analyten im Hämoglobinhydrolysat.

Eine Besonderheit besteht für die Detektion und damit die Quantifizierung der von Methylglyoxal abgeleiteten Hydroimidazolone (Abbildung 2-7). In Abbildung 4-38 (C) ist sowohl für den Matrixmix, die Standardaddition als auch für den internen Standard ein Doppelpick zu sehen. Der Referenzstandard und der interne Standard entsprechen dem MG-H1. In den Hämoglobinhydrolysaten können allerdings alle drei möglichen Methylglyoxalhydroimidazolone (MG-Hs) nebeneinander vorliegen. Deshalb wird im Folgenden MG-H als Summenparameter verwendet.

Schon *Thornalley et al. (2003)* beobachteten in unterschiedlichen physiologischen Proben die Detektion eines Doppelpicks für die MG-Hs. Sie erklärten, dass die strukturisomeren MG-H1, MG-H2 und MG-H3 nicht chromatographisch getrennt wurden. Der Doppelpick wurde mit der chromatographischen Trennung der Epimeren (chirales C-Atom im Hydroimidazolone) erklärt. Außerdem liegt in physiologischen Proben hauptsächlich das MG-H1, das stabilste Methylglyoxalhydroimidazolone, vor (*Ahmed et al., 2002; Thornalley et al., 2003*). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass hauptsächlich das MG-H1 detektiert wurde.

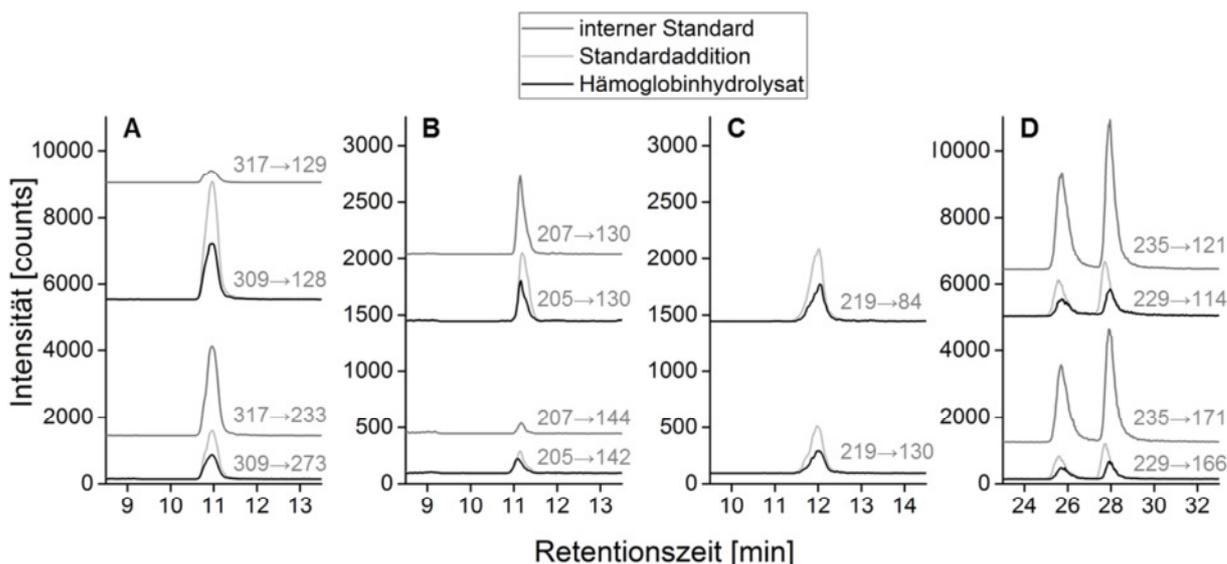


Abbildung 4-38: Chromatogramme von je zwei charakteristischen Massenübergängen von Fru-Lys (A), <sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-Fru-Lys (A), CML (B), D<sub>2</sub>-CML (B), CEL (C), MG-H (D) und <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-MG-H in einem Matrixmix aus enzymatisch hydrolysiertem humanem Hämoglobin und einer Standardadditionsprobe dieses Matrixmixes.

*Henle et al. (1994)* beobachteten zwar keine chromatographische Trennung, aber konnten in NMR-Spektren zwei Tautomere Formen des MG-H1 in einem stabilen Verhältnis identifizieren. Für die möglichen Diastereomerenpaare der Tautomere wurde interpretiert, dass jedes Tautomer nur als eines der möglichen Diastereomeren (zwei Chirale C-Atome: C-2 des Arginins und Hydroimidazolone) vorliegt. Durch einen Austausch von Protonen am

chiralen C-Atom des Hydroimidazolrings über eine Keto-Enol-Tautomerie lässt sich eine Umlagerung zwischen den Diastereomeren erklären (*Henle et al., 1994*).

#### 4.3.5 Fructosylderivate in humanem Hämoglobin

##### *Bewertung des Glykierungsstatus der Probanden über den HbA<sub>1c</sub>-Wert*

In der klinischen Routine wird der HbA<sub>1c</sub>-Wert verwendet um Diabetes mellitus diagnostizieren zu können. Bei einem HbA<sub>1c</sub>-Wert  $\geq 48$  mmol/mol ( $\geq 6,5\%$ ) wird nach einer Leitlinie der Deutschen Diabetesgesellschaft von einem Diabetes mellitus ausgegangen. Bei einem HbA<sub>1c</sub>-Wert  $< 39$  mmol/mol ( $5,7\%$ ) wird davon ausgegangen, dass kein Diabetes mellitus vorliegt. Liegt der HbA<sub>1c</sub>-Wert im Bereich von 39 bis 47 mmol/mol ( $5,7\%$  bis  $6,4\%$ ) sollen der Diabetes mellitus bzw. seine Vorstufen über die Bestimmung der Plasmaglukose ermittelt werden (*Kerner and Brückel, 2015*).

Der HbA<sub>1c</sub>-Wert wurde in Blutproben von 11 Dialysepatienten und 9 Kontrollprobanden analysiert. In Abbildung 4-39 (B) und Tabelle 4-12 sind die HbA<sub>1c</sub>-Werte der beiden Probandengruppen dargestellt. Die Mittelwerte der HbA<sub>1c</sub>-Werte der beiden Gruppen waren statistisch signifikant ( $\alpha < 0,001$ ) unterscheidbar. Bei drei der Dialysepatienten lag der HbA<sub>1c</sub>-Wert bei 48 mmol/mol und höher. Nach diesem Kriterium müsste folglich ein Diabetes mellitus diagnostiziert werden. Für drei weitere Patienten wurde ein HbA<sub>1c</sub>-Wert im Bereich von 39 bis 47 mmol/mol ermittelt. Bei diesen Patienten können das Vorliegen eines Diabetes mellitus bzw. dessen Vorstufen nicht ausgeschlossen werden. Für die restlichen fünf Dialysepatienten wurde ein HbA<sub>1c</sub>-Wert unter 39 mmol/mol gemessen. In der Kontrollgruppe lag der HbA<sub>1c</sub>-Wert für alle Probanden unterhalb von 39 mmol/mol. Sie sind folglich als Normoglykämiker einzustufen.

Tabelle 4-11: Fructosylderivate in humanem Hämoglobin

MRP	Dialyse		Kontrolle	
	[mmol/mol HbA <sub>0</sub> ]		[mmol/mol HbA <sub>0</sub> ]	
HbA <sub>1c</sub>	42,4 ± 9,2	(29-61)	29,3 ± 2,4***	(26-33)
	[mmol/mol Hämoglobin] <sup>#</sup>		[mmol/mol Hämoglobin] <sup>#</sup>	
Fru-Val	48,9 ± 12,5	(34-77)	35,9 ± 3,1**	(31-41)
Fru-Lys	62,1 ± 19,3	(38-102)	46,6 ± 3,4*	(41-50)

<sup>#</sup>Mittelwert ± Standardabweichung (Spannweite); <sup>‡</sup>Berechnung bezogen auf alle 44 Lys in einem Hämoglobintetramer bzw. bei Fru-Val bezogen auf 4 N-terminale Val in einem Hämoglobintetramer; Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Methoden: Abschnitt 3.7.8) mit dem Signifikanzniveau: \* ( $\alpha < 0,05$ ); \*\* ( $\alpha < 0,01$ ); \*\*\* ( $\alpha < 0,001$ ).

In Abschnitt 2.3.4 wurde beschrieben, dass bei nicht-diabetischen Urämikern von einer Verringerung des mittleren Erythrozytenalters von 20% ausgegangen werden kann. Da der HbA<sub>1c</sub>-Wert linear mit dem Alter der Erythrozyten ansteigt, ist davon auszugehen, dass der HbA<sub>1c</sub>-Wert um 20% unterschätzt wird (*Vos et al., 2011*). Deshalb kann vermutet werden, dass die Hyperglykämie im Plasma und den Erythrozyten der Dialysepatienten noch stärker

ausgeprägt ist, als es der Vergleich des HbA<sub>1c</sub>-Werts mit den HbA<sub>1c</sub>-Werten der normoglykämischen Kontrollgruppe anzeigt. Damit müsste die Glycation Gap (Abschnitt 2.3.4.3) bei den Dialysepatienten größer sein, weshalb die Bestimmung des Glykierungsgrades des Hämoglobins die gesamtsystemische Glykierung unterschätzt.

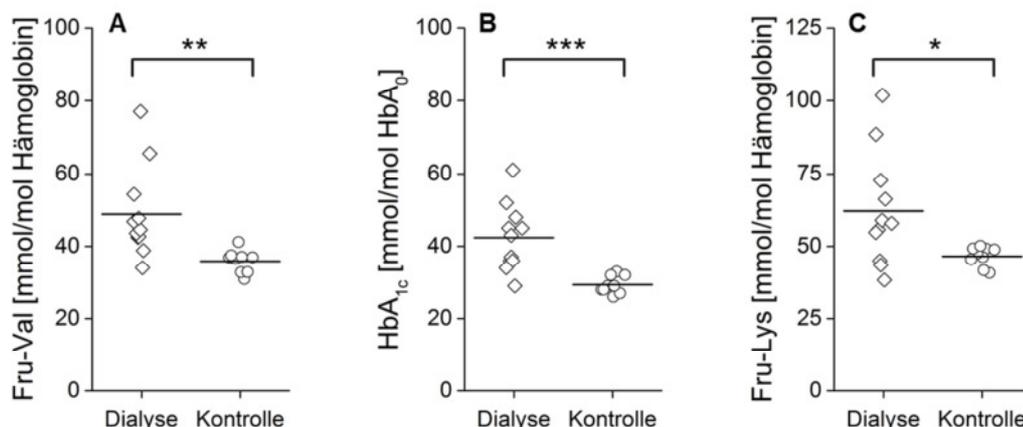


Abbildung 4-39: Gehalte von Fructosylvalin (A), des HbA<sub>1c</sub>-Werts (B) sowie Fructosyllysin (C) des Hämoglobins von Dialysepatienten (diabetisch und nicht-diabetisch) und einer Kontrollgruppe (normoglykämisch); Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Methoden: Abschnitt 3.7.8) mit dem Signifikanzniveau: \* ( $\alpha < 0,05$ ); \*\* ( $\alpha < 0,01$ ); \*\*\* ( $\alpha < 0,001$ ); n.s. (nicht signifikant,  $\alpha > 0,05$ ).

#### Gehalte des Fructosylvalins in humanem Hämoglobin

Die Gehalte von Fructosylvalin in den Proben der Probandengruppen wurden nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure über die Quantifizierung als FM-Val ermittelt. Von den FM-Val-Gehalten wurde über den Umsatzfaktor für Fru-Val-His (Abschnitt 4.1.2 bzw. Tabelle 4-2) auf die Fru-Val-Gehalte geschlossen. Die Gehalte betragen 34 bis 77 mmol Fru-Val/mol Hämoglobin für Dialysepatienten und 31 bis 41 mmol Fru-Val/mol Hämoglobin für die Kontrollgruppe und sind in Tabelle 4-11 angegeben. Die Gehalte lagen bei den Dialysepatienten um 13% und bei der Kontrollgruppe um 18% über den entsprechenden HbA<sub>1c</sub>-Werten. Die Differenz kann also in etwa mit dem Anteil des Fructosylvalins der  $\alpha$ -Kette erklärt werden.

Die Gehalte des Fructosylvalins im Vergleich der Probandengruppen unterschieden sich hinsichtlich der Mittelwerte signifikant ( $\alpha < 0,01$ ) (Abbildung 4-39: A). Damit zeigt die Quantifizierung des N-terminalen Fructosylvalins des Hämoglobins eine vergleichbare Aussagekraft zur Bewertung der Glykierung des Hämoglobins durch Glucose wie der HbA<sub>1c</sub>-Wert.

N-terminales Fructosylvalin wurde bereits von *Penndorf et al. (2008)* in humanem Hämoglobin quantifiziert. *Penndorf et al. (2008)* haben die Gehalte in pmol Fru-Val/mg Hämoglobin angegeben. Zur Berechnung der Gehalte in mmol Fru-Val/mol Hämoglobin wurde die molare Masse des Hämoglobintetramers von 64450 g/mol verwendet (*Braunitzer, 1964*). Die von *Penndorf et al. (2008)* ermittelten Gehalte für Fructosylvalin betragen bei diabetischen Dialysepatienten 38 bis 92 mmol/mol Hämoglobin und für die Kontrollgruppe 33 bis 50

mmol/mol Hämoglobin und liegen im gleichen Bereich wie die in Tabelle 4-11 aufgeführten Gehalte.

In Abbildung 4-40 (A) ist die Korrelation von Fru-Val mit dem HbA<sub>1c</sub>-Wert dargestellt. Diese beiden Parameter zeigen einen linearen Zusammenhang (Korrelationskoeffizient:  $r = 0,81$ ) und korrelieren mit einer hohen statistischen Signifikanz ( $\alpha < 0,001$ ). Die Streuung der Wertepaare um die Ausgleichsgerade könnte durch die unterschiedlichen analytischen Herangehensweisen in der Bestimmung des HbA<sub>1c</sub>-Werts bzw. des Fructosylvalins oder durch interindividuell unterschiedliche Anteile in der Glykierung der N-Termini der zwei Hämoglobinketten verursacht werden. Weiterhin ist für Urämiker bekannt, dass durch erhöhte Harnstoffgehalte im Blut eine Carbamylierung des Hämoglobins auftreten kann. Dadurch können bei einigen Bestimmungsmethoden falsch hohe HbA<sub>1c</sub>-Werte erhalten werden (Abschnitt 2.3.4.3).

Der Anstieg der Ausgleichsgeraden hat den Wert 1, wodurch zum Ausdruck kommt, dass bei einer Verdoppelung des HbA<sub>1c</sub>-Werts auch der Fructosylvalingehalt verdoppelt ist. Dieser Zusammenhang zeigt die Äquivalenz der beiden Parameter bzw. Bestimmungsmethoden. Die Ausgleichsgerade verläuft nicht durch den Koordinatenursprung. Der Achsenabschnitt liegt im positiven Bereich der Auftragung von Fru-Val. Wenn der HbA<sub>1c</sub>-Wert den Betrag Null annahme, läge trotzdem ein Gehalt für Fru-Val vor. Dieser Betrag kann mit dem Anteil des Fru-Vals erklärt werden, der von der  $\alpha$ -Kette des Hämoglobins stammt, da der HbA<sub>1c</sub>-Wert nur dem Fru-Val der  $\beta$ -Kette entspricht.

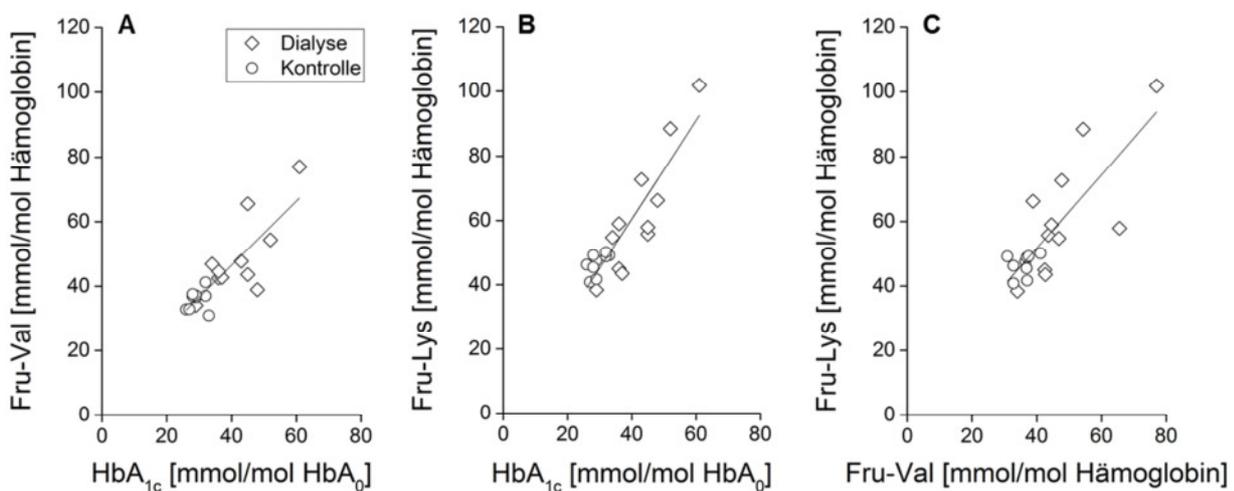


Abbildung 4-40: Korrelationen von Fru-Val mit dem HbA<sub>1c</sub>-Wert (A:  $y = 0,99 x + 6,81$ ;  $R = 0,81^{***}$ ), von N- $\epsilon$ -Fru-Lys mit dem HbA<sub>1c</sub>-Wert (B:  $y = 1,53 x - 0,64$ ;  $R = 0,74^{***}$ ) und N- $\epsilon$ -Fru-Lys von mit Fru-Val (C:  $y = 1,14 x + 6,26$ ;  $R = 0,72^{***}$ ), Ausgleichsgeraden bezogen auf alle Proben (Dialyse + Kontrolle).

#### Gehalte des Fructosyllysins in humanem Hämoglobin

Neben dem Fructosylvalin der N-Termini des Hämoglobins wurde das Fructosyllysins (Fru-Lys) quantifiziert. Der Gehalt von Fru-Lys in den Proben der Dialysepatienten lag zwischen 38 und 102 mmol/mol Hämoglobin und in den Proben der Kontrollgruppe zwischen 41 und

50 mmol/mol Hämoglobin. Die Mittelwerte der Fru-Lys-Gehalte der Gruppen unterschieden sich statistisch signifikant (Abbildung 4-39: C,  $\alpha < 0,05$ ).

Wie in Abschnitt 2.3.5.2 beschrieben und in Tabelle 2-8 zusammengefasst ist, unterscheiden sich die verfügbaren Angaben zu den Gehalten von Fru-Lys in Hämoglobin in den Publikationen. Ein Vergleich ist am ehesten für die normoglykämischen Kontrollgruppen der Studien möglich, da sich kein Einfluss von Krankheitsverläufen auf die Gehalte von Glykierungsprodukten auswirkt. In den untersuchten Blutproben wurde ein Mittelwert für Fru-Lys von 46,6 mmol/mol Hämoglobin ermittelt (Tabelle 4-11) und liegt damit etwas höher als der Mittelwert bei *Ahmed et al. (2005a)* von 37,0 mmol/mol Hämoglobin. Die Gehalte in den Studien von *Thornalley et al. (2003)* und *Penndorf et al. (2008)* lagen etwa doppelt so hoch (Tabelle 2-8).

Der mittlere Fru-Lys-Gehalt der Proben der Dialysepatienten lag etwa um Faktor 1,5 höher als für die Kontrollgruppe (Tabelle 4-11). *Ahmed et al. (2005a)* bestimmten für Typ-1-Diabetiker und *Penndorf et al. (2008)* für diabetische Urämiker ebenfalls im Mittel um Faktor 2 bzw. ca. 1,3 höhere Werte.

In Abbildung 4-40 (B) sind die Fru-Lys-Gehalte der Probanden gegen den HbA<sub>1c</sub>-Wert aufgetragen. Es ergab sich eine lineare Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten  $r = 0,74$  mit einer statistischen Signifikanz von  $\alpha < 0,001$ . Damit wurden proportional höhere Gehalte von Fru-Lys mit höheren Gehalten des HbA<sub>1c</sub>-Werts bestimmt. Der Anstieg der Ausgleichsgeraden hat den Betrag 1,5. Damit entspricht eine Verdoppelung des HbA<sub>1c</sub>-Werts einer Verdreifachung des Gehalts des Fru-Lys und es kann eine durchschnittlich um Faktor 1,5 höhere Reaktivität der Summe aller Lysinseitenketten im Vergleich zu den N-Termini abgeleitet werden.

In Abbildung 4-40 (C) ist die Korrelation ( $\alpha < 0,001$ ) der Gehalte von Fru-Val- und Fru-Lys dargestellt. Die Streuung der Wertepaare zeigt, dass individuelle Unterschiede zwischen den Hämoglobinproben der Probanden im Grad der Derivatisierung zwischen den N-Termini und den Lysinseitenketten bestehen. Die N-terminalen Amadori-Produkte sind schlechte Substrate der enzymatischen Deglykierung (Abschnitt 2.3.4.5). So können individuelle Unterschiede in der FN3K-Aktivität bei gleichem N-terminalen Glykierungsgrad zu unterschiedlichen Glykierungsgraden der Lysinseitenketten führen.

#### **4.3.6 N-Terminale Glyoxal-AGEs in humanem Hämoglobin**

##### *Gehalte von CM-Val*

Die Quantifizierung erfolgte nach der in Abschnitt 3.3.14 beschriebenen Methode. Die Gehalte von CM-Val in den Hämoglobinproben der Dialysepatienten lagen zwischen 1,2 und 3,2 mmol/mol Hämoglobin (Mittelwert: 1,96 mmol/mol Hämoglobin). Für die Kontrollgruppe wurden etwas geringere Gehalte von 0,8 bis 2,6 mmol/mol ermittelt (Mittelwert: 1,59 mmol/mol Hämoglobin; Tabelle 4-12). Damit wurden für die Dialysepatienten tendenziell

erhöhte Werte quantifiziert, aber die Mittelwerte der CM-Val-Gehalte der zwei Gruppen unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 4-41; A;  $\alpha > 0,05$ ).

Die Mittelwerte der CM-Val-Hämoglobingehalte der Kontrollgruppen in den Studien von *Uchimura et al. (2001)* und *Shimada et al. (2005)* lagen bei 0,8 bzw. 1,0 mmol/mol Hämoglobin (Tabelle 2-9). *Uchimura et al. (2001)* gaben für die Spannweite Werte zwischen 0,44 und 1,66 mmol/mol Hämoglobin an. Damit wurden für die Kontrollgruppen in diesen Studien im Vergleich zu dem Mittelwert von 1,6 mmol CM-Val/mol Hämoglobin (Tabelle 4-12) etwa um Faktor 2 niedrigere Werte detektiert.

*Uchimura et al. (2001)* und *Shimada et al. (2005)* verwendeten zur Quantifizierung von CM-Val-Hb in Blutproben einen Immuno-Assay. Dieser wurde über eine Blutprobe kalibriert, deren Antikörper nach der Spezifität auf das CM-Derivat der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins ausgewählt wurde (Abschnitt 2.3.6.1). Da die CM-Modifizierung der  $\alpha$ -Kette vermutlich nicht erfasst wurde und die Verteilung des CM-Vals zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette unbekannt ist, könnten die angegebenen Gehalte in diesen zwei Studien den Gesamtgehalt von CM-Val unterschätzen. Damit wären die geringeren mittleren Gehalte in den Kontrollgruppen zu erklären.

Als Patientengruppe wurden von *Uchimura et al. (2001)* und *Shimada et al. (2005)* Typ-II-Diabetiker untersucht. Die Diabetiker in der Studie von *Uchimura et al. (2001)* wiesen zusätzlich unterschiedliche Grade einer Nierenschädigung auf. Bei *Uchimura et al. (2001)* lagen die Mittelwerte bei 1,2 bzw. bei *Shimada et al. (2005)* bei 1,4 mmol CM-Val-Hämoglobin/mol Hämoglobin und die angegebene Spannweite bei *Uchimura et al. (2001)* zwischen 0,44 und 5,05 mmol/mol Hämoglobin (Tabelle 2-9). Die für die Dialysepatienten ermittelten CM-Val-Gehalte von 1,2 bis 3,2 mmol/mol Hämoglobin (Tabelle 4-12) liegen damit in der gleichen Größenordnung.

*Uchimura et al. (2001)* und *Shimada et al. (2005)* konnten zwischen ihren Probandengruppen signifikante Unterschiede in der N-terminalen CM-Derivatisierung des Hämoglobins finden, was vermutlich auf die im Vergleich deutlich größeren Probandenzahlen (300 bzw. 1500) zurückzuführen ist. Beide Autoren diskutierten die CM-Derivatisierung in Zusammenhang mit oxidativem Stress, da CM-Derivate durch oxidativen Abbau aus Fructosylderivaten entstehen können.

Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass beim oxidativen Abbau von Fru-Val und seinen Vorstufen neben CM-Val als weitere Produkte die GO-2(1H)-Pyrazinone entstehen können. Um also den Einfluss des oxidativen Stresses auf die Bildung N-terminaler AGEs bewerten zu können, sollte die Summe der von Glyoxal abgeleiteten N-terminalen AGEs untersucht werden. Da die GO-2(1H)-Pyrazinone bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure abgebaut und auch aus dem Fructosylderivat nachgebildet werden können, ist eine quantitative Bewertung schwierig. Dieser Zusammenhang wird im folgenden Abschnitt zu den Gehalten der GO-2(1H)-Pyrazinone weiter diskutiert.

Tabelle 4-12: Gehalte N-terminaler Glyoxal-AGEs in humanem Hämoglobin

MRP	Dialyse		Kontrolle	
	[mmol/mol Hämoglobin] <sup>#</sup>		[mmol/mol Hämoglobin] <sup>#</sup>	
CM-Val	1,96 ± 0,58	(1,2-3,2)	1,59 ± 0,59	(0,8-2,6)
GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon <sup>§</sup>	0,051 ± 0,012	(n.b.-0,07)	0,040 ± 0,021	(n.b.-0,08)
GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon <sup>§§</sup>	0,077 ± 0,018	(n.b.-0,10)	0,061 ± 0,032	(n.b.-0,12)
GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon <sup>§</sup>	0,030 ± 0,016	(0,01-0,07)	0,024 ± 0,017	(n.b.-0,05)
GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon <sup>§§</sup>	0,38 ± 0,20	(0,12-0,84)	0,31 ± 0,21	(n.b.-0,60)
Summe N-terminale GO-AGEs <sup>§§</sup>	2,41 ± 0,50	(1,7-3,4)	1,92 ± 0,41*	(1,3-2,6)

<sup>#</sup>Mittelwert ± Standardabweichung (Spannweite); n.b. nicht bestimmbar (kleiner als Bestimmungsgrenze, Tabelle 3-24); <sup>§</sup> ohne Berücksichtigung der Wiederfindung; <sup>§§</sup> mit Berücksichtigung der Wiederfindung (GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon: 66%, GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon: 8%, Abschnitt 4.3.2.1, Abbildung 4-25); Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Methoden: Abschnitt 3.7.8) mit dem Signifikanzniveau: \* ( $\alpha < 0,05$ ); \*\* ( $\alpha < 0,01$ ); \*\*\* ( $\alpha < 0,001$ ).

### Gehalte der GO-2(1H)-Pyrazinone

Die Quantifizierung der Gehalte der GO-2(1H)-Pyrazinone erfolgte nach der in Abschnitt 3.3.14 beschriebenen Methode. Bei der Diskussion der quantitativen Daten zu den GO-2(1H)-Pyrazinonen nach der Hydrolyse in 6 M Salzsäure muss beachtet werden, dass die von Glyoxal abgeleiteten 2(1H)-Pyrazinone sowohl instabil sind, als auch aus den N-terminalen Fructosylderivaten der Hämoglobinketten nachgebildet werden können (Abschnitt 4.3.2). Der Mittelwert der Gehalte des GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons lag für die Dialysepatienten bei 0,051 mmol/mol Hämoglobin und für die Kontrollgruppe bei 0,040 mmol/mol Hämoglobin. Die Mittelwerte der Gehalte des GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinons waren mit 0,030 mmol/mol Hämoglobin für die Dialysepatienten und 0,024 mmol/mol Hämoglobin für die Kontrollgruppe im Vergleich etwas niedriger. Für beide GO-2(1H)-Pyrazinone wurden zwar etwas geringere Mittelwerte für die Kontrollgruppe im Vergleich zu den Dialysepatienten ermittelt, aber diese unterscheiden sich nicht statistisch signifikant (Abbildung 4-41: B, C;  $\alpha > 0,05$ ).

Kunert (2009) hatte das GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon nach enzymatischer Hydrolyse mit Pronase E in humanem Hämoglobin quantifiziert. Die Gehalte lagen zwischen 0,5 mmol/mol Hämoglobin für die Kontrollgruppe und 4,7 mmol/mol Hämoglobin als höchstem Wert für diabetische Dialysepatienten. Diese Gehalte sind in der Größenordnung von CM-Val und sind im Vergleich um Faktor 10 bis 100 höher als die in dieser Arbeit nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure ermittelten Gehalte.

Für das GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon wurde eine Wiederfindung nach Hydrolyse in 6 M Salzsäure von nur 8% bestimmt (Abschnitt 4.3.2.1). Dieser starke aufarbeitungsinduzierte Verlust könnte die große Differenz erklären, wenn die potentielle Nachbildung aus dem Fuctosylderivat der  $\beta$ -Kette unberücksichtigt bleibt. Die Gehalte des GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinons würden dann bis zu 0,6 mmol/mol Hämoglobin für die Kontrollgruppe und bis zu 0,9 mmol/mol Hämoglobin für die Dialysepatienten betragen (Tabelle 4-12).

Da an der  $\alpha$ -Kette höhere Gehalte des GO-2(1H)-Pyrazinons detektiert wurden als an der  $\beta$ -Kette, obwohl die  $\beta$ -Kette 90% des Fru-Val trägt, ist zu vermuten, dass die Nachbildung der GO-2(1H)-Pyrazinone aus den Fructosylderivaten der humanen Hämoglobinketten während der Hydrolyse keinen so großen Einfluss hat, wie das Experiment zur Nachbildung ausgehend von einem Zusatz des Peptidderivats Fru-Val-His vorgibt (Abbildung 4-27). Wenn die Nachbildung am Hämoglobin quantitativ nicht relevant wäre, könnten die höheren Gehalte des GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons mit der deutlich höheren Wiederfindung von 66% (Abbildung 4-25) bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure erklärt werden. Zusätzlich ist aus den Experimenten zur Bildung der GO-2(1H)-Pyrazinone unter physiologischen Bedingungen in Abschnitt 4.2.2 (Abbildung 4-17) zu vermuten, dass der Unterschied in den Gehalten von CM-Val zu den GO-2(1H)-Pyrazinonen nicht größer als Faktor 10 zu erwarten wäre. Nach Berücksichtigung der Wiederfindungen (Abbildung 4-25) ergeben sich für die Mittelwerte der Summe der GO-2(1H)-Pyrazinongehalte der Dialysepatienten 0,46 mmol/mol Hämoglobin und für die Kontrollgruppe 0,37 mmol/mol Hämoglobin. Diese Werte sind nur um Faktor 4 bis 5 niedriger als die Mittelwerte der CM-Val-Gehalte (Tabelle 4-12).

Es zeigte sich, dass schwer zu beurteilen ist, welchen Einfluss der Abbau der GO-2(1H)-Pyrazinone bzw. deren Nachbildung aus den Fructosylvalinderivaten der Hämoglobinketten bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure auf die quantifizierbaren Gehalte hatte. Aber die Nachbildung scheint neben dem Abbau von untergeordneter Bedeutung zu sein. Unter dieser Annahme wurde die Wiederfindungsraten aus Abschnitt 4.3.2.1 als Korrekturfaktoren verwendet, um weiterführende Aussagen zu ermöglichen. In folgenden Arbeiten sollten die Mechanismen und Zusammenhänge zum Abbau bzw. der Nachbildung von GO-2(1H)-Pyrazinonen unter den Bedingungen der Hydrolyse in 6 M Salzsäure genauer untersucht werden.

#### *Summe N-terminaler Glyoxal-AGEs*

Beim oxidativen Abbau von Fru-Val und dessen Vorstufen können sowohl CM-Val als auch die GO-2(1H)-Pyrazinone entstehen. Um den Einfluss des oxidativen Stresses auf die Bildung N-terminaler AGEs bewerten zu können, müsste die Summe der von Glyoxal abgeleiteten N-terminalen AGEs untersucht werden. Da die GO-2(1H)-Pyrazinone bei der Hydrolyse in 6 M Salzsäure stark abgebaut werden und die Nachbildung aus N- $\alpha$ -Fructosylhämoglobin als untergeordnet angenommen wurde, erfolgte die Berechnung der Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs aus dem CM-Val-Gehalt und den um die Wiederfindung korrigierten Gehalten der GO-2(1H)-Pyrazinone (Tabelle 4-12). Der Vergleich der Mittelwerte der Gruppe der Dialysepatienten und der Kontrollgruppe hat ergeben, dass sich diese statistisch signifikant unterscheiden (Abbildung 4-41: D,  $\alpha < 0,05$ ). Die erhöhten Gehalte der N-terminalen Glyoxal-AGEs im Hämoglobin der Dialysepatienten, können aus dem für Dialysepatienten bekannten erhöhten oxidativen Stress resultieren (*Locatelli et al., 2003*).

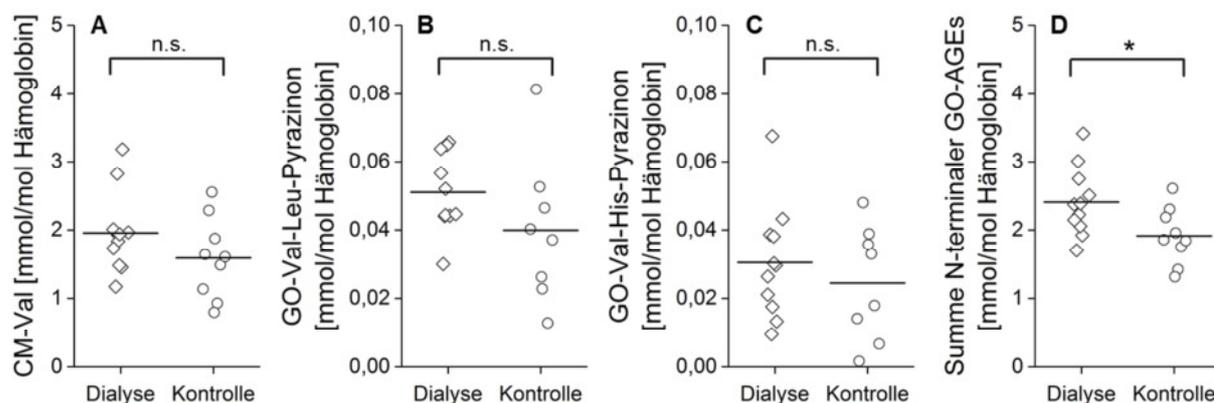


Abbildung 4-41: Gehalte N-terminaler Glyoxal-AGEs im Hämoglobin von Dialysepatienten (diabetisch und nicht-diabetisch) und einer Kontrollgruppe (normoglykämisch); (A) CM-Val, (B) GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon (ohne Korrektur um Wiederfindung), (C) GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon (ohne Korrektur um Wiederfindung), (D) Summe N-terminaler Glyoxal-AGEs (Korrektur der Gehalte der 2(1H)-Pyrazinone um die Wiederfindung); — Mittelwert; Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Methoden: Abschnitt 3.7.8) mit dem Signifikanzniveau: \* ( $\alpha < 0,05$ ); \*\* ( $\alpha < 0,01$ ); \*\*\* ( $\alpha < 0,001$ ); n.s. (nicht signifikant,  $\alpha > 0,05$ ).

### 4.3.7 N-Terminale Methylglyoxal-AGEs in humanem Hämoglobin

#### Gehalte von CE-Val

Für die Gruppe der Dialysepatienten wurden CE-Val-Gehalte von 0,05 bis 0,13 mmol/mol Hämoglobin und für die Kontrollgruppe 0,03 bis 0,09 mmol/mol Hämoglobin bestimmt. Die Mittelwerte unterschieden sich statistisch signifikant (Abbildung 4-42: A ;  $\alpha < 0,05$ ).

#### Gehalte der MGO-2(1H)-Pyrazinone

In Tabelle 4-13 sind die quantifizierte Gehalte der MGO-2(1H)-Pyrazinone angegeben. Für das MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon wurden in den Proben der Dialysepatienten Werte von nicht detektierbar bis 0,08 mmol/mol Hämoglobin und in den Proben der Kontrollgruppe von nicht detektierbar bis 0,03 mmol/mol Hämoglobin bestimmt. Für das MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon wurden Gehalte zwischen 0,06 und 0,21 mmol/mol Hämoglobin für Dialysepatienten und für die Kontrollgruppe von 0,05 bis 0,08 mmol/mol Hämoglobin ermittelt. Die Mittelwerte der Gruppen unterschieden sich für beide MGO-2(1H)-Pyrazinone statistisch signifikant (Abbildung 4-42: B, C,  $\alpha < 0,05$  bzw.  $\alpha < 0,01$ ).

Tabelle 4-13: Gehalte N-terminaler AGEs des Methylglyoxals in humanem Hämoglobin

MRP	Dialyse		Kontrolle	
	[mmol/mol Hämoglobin] <sup>#</sup>		[mmol/mol Hämoglobin] <sup>#</sup>	
CE-Val	0,089 ± 0,023	(0,05-0,13)	0,063 ± 0,022*	(0,03-0,09)
MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon	0,048 ± 0,022	(n.b.-0,08)	0,028 ± 0,007*	(n.b.-0,03)
MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon	0,106 ± 0,040	(0,06-0,21)	0,065 ± 0,010**	(0,05-0,08)
Summe N-terminale MGO-AGEs	0,239 ± 0,072	(0,14-0,40)	0,147 ± 0,035**	(0,10-0,20)

<sup>#</sup>Mittelwert ± Standardabweichung (Spannweite); n.b. nicht bestimmbar (kleiner als Bestimmungsgrenze, Tabelle 3-24); Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Methoden: Abschnitt 3.7.8) mit dem Signifikanzniveau: \* ( $\alpha < 0,05$ ); \*\* ( $\alpha < 0,01$ ); \*\*\* ( $\alpha < 0,001$ ).

### *Dicarbonylstress – Methylglyoxal-AGEs als Indikatoren bei Diabetes und terminaler Niereninsuffizienz*

Für die von Glyoxal abgeleiteten AGEs (CM-Derivate und GO-2(1*H*)-Pyrazinone) überwiegt vermutlich die Bildung über den oxidativen Abbau der Schiff'schen Base mit Glucose, des 1,2-Enaminols bzw. des Fructosylamins (Abschnitt 4.3.6). Dagegen ist bei der Bildung der von Methylglyoxal abgeleiteten AGEs die Reaktion von Aminosäuren mit freiem Methylglyoxal insbesondere in Erythrozyten als hauptsächlicher Bildungsweg anzusehen. Einerseits sollte die Bildung über 3-DG deutlich geringer ausfallen (Abbildung 4-63), da sich die Konzentrationen von Methylglyoxal und 3-DG in Erythrozyten nicht deutlich unterscheiden (Tabelle 2-5, Tabelle 2-6) und für Methylglyoxal eine 200-fach höhere Reaktivität (gegenüber Arginin) ermittelt wurde als für 3-DG (*Thornalley et al., 1999*). Andererseits liegt Glucose im Blutplasma von Normoglykämikern in etwa in einer Konzentration von 5 mmol/L vor (*Maessen et al., 2015*) und in Erythrozyten ist die Glucosekonzentration auf dem gleichen Niveau wie im Blutplasma (*Khera et al., 2008*). Die Konzentration von Methylglyoxal in Erythrozyten liegt, wie in Tabelle 2-5 angegeben, im Bereich von 0,1 bis 1,6  $\mu\text{mol/L}$  (*Karg et al., 2009*). Damit ergibt sich in Erythrozyten eine 50.000- bis 3.000-fach höhere Konzentration von Glucose zu Methylglyoxal. Zusammen mit der 20.000-fach höheren Reaktivität des Methylglyoxals (*Rabbani and Thornalley, 2014*) ist anzunehmen, dass Methylglyoxalderivate überwiegend direkt aus Methylglyoxal und nicht aus der Reaktion von Aminosäuren mit Glucose (Abbildung 2-3) gebildet werden.

Die Erhöhung der Konzentration von 1,2-Dicarbonylverbindungen wie Methylglyoxal in Zusammenhang mit Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Urämie über das normale physiologische Maß hinaus wird als „Dicarbonylstress“ bezeichnet (*Miyata et al., 2001*). Wenn die von Methylglyoxal abgeleiteten AGEs aus der Reaktion mit freiem Methylglyoxal gebildet werden, kann deren Gehalt in humanem Hämoglobin als Indikator für die mittlere Methylglyoxalkonzentration und damit den Dicarbonylstress in Erythrozyten dienen.

Aus Tabelle 2-6 wird ersichtlich, dass bei diabetischer Hyperglykämie (Diabetes Typ-I und Typ-II) sowie bei Urämie erhöhte Konzentrationen von Methylglyoxal im Blutplasma vorliegen. Die erhöhte Bildung von Methylglyoxal bei hyperglykämischen Stoffwechsellagen resultiert aus der begrenzten Kapazität der Glycolyse und damit verbunden erhöhten Konzentrationen von Triosephosphaten (Abschnitt 2.3.1.4 bzw. 2.3.2.4). Deshalb wurden auch in Erythrozyten von Diabetikern signifikant erhöhte Methylglyoxalgehalte quantifiziert (*Nicolay et al., 2006; Thornalley et al., 1989*).

Bei Urämie werden die 1,2-Dicarbonylverbindungen nicht über den Urin ausgeschieden, was ebenfalls zur Erhöhung der Plasmakonzentration führt. Die geringere Ausscheidungsrate führt zur Angleichung der extrazellulären an die intrazelluläre Konzentration und damit zu einem geringeren Konzentrationsgefälle. Dadurch wird die Diffusion des Methylglyoxals aus den Erythrozyten erschwert (*Karg et al., 2009*). Dieser Effekt erhöht bei diabetischen Urämikern

die Konzentration des Methylglyoxals in den Erythrozyten zusätzlich zur erhöhten intrazellulären Bildung (Abschnitt 2.3.2).

Für die Gehalte der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs (CE-Val, MGO-Val-Leu- und MGO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon) konnten signifikant höhere Werte in den Hämoglobinproben der Dialysepatienten quantifiziert werden (Abbildung 4-42: A, B, C). Damit können diese analytischen Parameter als Indikatoren für den „Dicarbonylstress“ in Bezug auf Methylglyoxal interpretiert werden. Auch für den Mittelwert der Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs der Gruppe der Dialysepatienten konnte eine statistisch signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt werden (Abbildung 4-42: D;  $\alpha < 0,01$ ). Dieses Ergebnis ist eine Bestätigung, dass diese unabhängig von individuellen Unterschieden in den Anteilen der drei quantifizierten N-terminalen Methylglyoxal-AGEs eine erhöhte mittlere Methylglyoxalkonzentration in Erythrozyten anzeigen können.

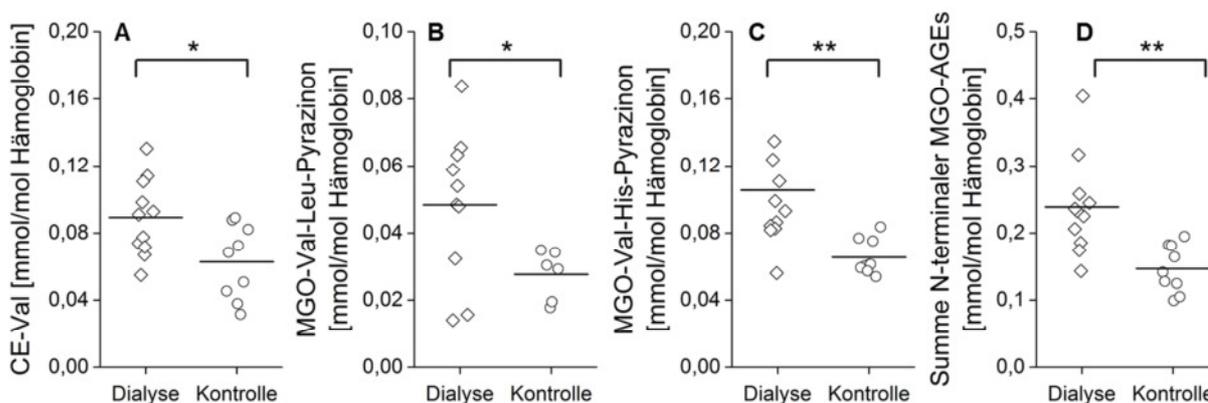


Abbildung 4-42: Gehalte N-terminaler Methylglyoxal-AGEs des Hämoglobins von Dialysepatienten (diabetisch und nicht-diabetisch) und einer Kontrollgruppe (normoglykämisch); (A) CE-Val, (B) MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon, (C) MGO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon, (D) Summe N-terminaler Methylglyoxal-AGEs; — Mittelwert; Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Methoden: Abschnitt 3.7.8) mit dem Signifikanzniveau: \* ( $\alpha < 0,05$ ); \*\* ( $\alpha < 0,01$ ); \*\*\* ( $\alpha < 0,001$ ); n.s. (nicht signifikant,  $\alpha > 0,05$ ).

#### 4.3.8 Gehalte der AGEs der Seitenketten von Lysin und Arginin in humanem Hämoglobin

Um die Gehalte der N-terminalen von Glyoxal und Methylglyoxal abgeleiteten AGEs in humanem Hämoglobin mit Gehalten der entsprechenden AGEs der Seitenketten von Lysin und Arginin vergleichen zu können, wurden CML, CEL und MG-H quantifiziert.

##### Gehalt von CML in humanem Hämoglobin

In den Proben der Dialysepatienten wurden CML-Gehalte von 5,2 bis 7,9 mmol/mol Hämoglobin und in den Proben der Kontrollgruppe von 3,4 bis 5,3 mmol/mol Hämoglobin bestimmt (Tabelle 4-14). Die Mittelwerte der CML-Gehalte der Gruppen unterschieden sich statistisch signifikant (Abbildung 4-43: A;  $\alpha < 0,001$ ).

Ein Vergleich des mittleren CML-Gehalts der Kontrollgruppe von 4,5 mmol/mol Hämoglobin mit den mittleren Gehalten bei *Thornalley et al. (2003)* von 3,0 mmol/mol Hämoglobin und

bei *Ahmed et al. (2005a)* von 3,3 mmol/mol Hämoglobin zeigt, dass die quantifizierten CML-Gehalte im Mittel etwa um Faktor 1,5 höher sind. Als Ursachen sind Unterschiede in der Vollständigkeit der Proteolyse bei der Probenaufarbeitung denkbar, da sowohl die MRPs als auch die Bezugsgröße Lysin enzymatisch freigesetzt und quantifiziert wurden. Ein Einfluss der Nachbildung von CML aus Fru-Lys durch oxidative Prozesse während der Proteolyse ist eher unwahrscheinlich. In Experimenten mit bovinem Serumalbumin (BSA) konnte zwar nachgewiesen werden, dass nicht nur bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure sondern auch bei der enzymatischen Hydrolyse eine Nachbildung von CML aus Fru-Lys stattfindet, aber die Nachbildung war nur sehr gering (*Hegele et al., 2008b*). Geringfügige Unterschiede im praktischen Vorgehen bei der enzymatischen Hydrolyse im Vergleich zu *Thornalley et al. (2003)* bzw. *Ahmed et al. (2005a)* sollten sich nicht auf die Ergebnisse ausgewirkt haben.

Tabelle 4-14: AGEs der Seitenketten von Lysin und Arginin in humanem Hämoglobin

AGE	Dialyse		Kontrolle	
	[mmol/mol Hämoglobin] <sup>#</sup>		[mmol/mol Hämoglobin] <sup>#</sup>	
CML	6,45 ± 0,79	(5,2-7,9)	4,45 ± 0,62***	(3,4-5,3)
CEL	3,18 ± 1,57	(1,8-7,4)	1,56 ± 0,52**	(1,0-2,7)
MG-H	3,13 ± 2,42	(1,4-8,9)	1,98 ± 1,03	(1,1-4,2)

<sup>#</sup>Mittelwert ± Standardabweichung (Spannweite); <sup>‡</sup> Berechnung bezogen auf alle 44 Lys bzw. 12 Arg in einem Hämoglobintetramer; Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Methoden: Abschnitt 3.7.8) mit dem Signifikanzniveau: \* ( $\alpha < 0,05$ ); \*\* ( $\alpha < 0,01$ ); \*\*\* ( $\alpha < 0,001$ ).

*Ahmed et al. (2005a)* fanden keine signifikanten Unterschiede im CML-Gehalt des Hämoglobins von Typ-I-Diabetikern im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Die signifikant höheren CML-Gehalte in den Proben der Dialysepatienten (Abbildung 4-43) könnten also vielmehr durch den bei terminaler Niereninsuffizienz charakteristischen oxidativen Stress (*Locatelli et al., 2003*) und weniger durch erhöhte Fructosyllysingehalte verursacht werden. Wie in Abschnitt 4.3.6 angegeben ist, konnte auch für die Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs eine entsprechende Erhöhung für die Dialysepatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bestimmt werden.

#### Gehalt von CEL und MG-H in humanem Hämoglobin

Von Methylglyoxal abgeleitete AGEs, wie CEL und MG-H, entstehen durch nicht-oxidative Reaktionsschritte (Abschnitt 2.1.3 bzw. 0) und im physiologischen System vermutlich hauptsächlich aus der Reaktion von Lysin bzw. Arginin mit freiem Methylglyoxal (Abschnitt 4.3.7).

Für CEL wurden in den Blutproben der Dialysepatienten Gehalte von 1,8 bis 7,4 mmol/mol Hämoglobin und für die Kontrollgruppe 1,0 bis 2,7 mmol/mol Hämoglobin quantifiziert (Tabelle 4-14). Die Mittelwerte der zwei Gruppen unterscheiden sich statistisch signifikant (Abbildung 4-43: B;  $\alpha < 0,01$ ). CEL könnte damit wie die N-terminalen Methylglyoxal-AGEs als Indikator für den „Dicarbonylstress“ in Bezug auf Methylglyoxal verwendet werden (Abschnitt 4.3.7).

Für Normoglykämiker haben *Thornalley et al. (2003)* 2,4 mmol/mol Hämoglobin und *Ahmed et al. (2005a)* 2,3 mmol/mol Hämoglobin bestimmt. Diese Mittelwerte sind etwas höher als der für die Kontrollgruppe ermittelte Wert von 1,6 mmol/mol Hämoglobin, aber in der gleichen Größenordnung (Tabelle 4-14). Für Typ-I-Diabetiker ermittelten *Ahmed et al. (2005a)* mit 3,0 mmol/mol Hämoglobin signifikant höhere Gehalte als für Normoglykämiker. Der CEL-Gehalt des Hämoglobins der Dialysepatienten lag mit 3,2 mmol/mol Hämoglobin auf dem gleichen Niveau (Tabelle 4-14).

In den Proben der Dialysepatienten wurden MG-H-Gehalte im Bereich von 1,4 bis 8,9 mmol/mol Hämoglobin und in den Proben der Kontrollgruppe 1,1 bis 1,42 mmol/mol Hämoglobin quantifiziert (Tabelle 4-14). Der Mittelwert der Gruppe der Dialysepatienten war um Faktor 1,5 höher als in der Kontrollgruppe, aber der Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $\alpha > 0,05$ ). In Abbildung 4-43 wird ersichtlich, dass der MG-H-Gehalt in den Proben zweier Probanden besonders hoch war. Die Gehalte der anderen Probanden unterschieden sich nicht so stark.

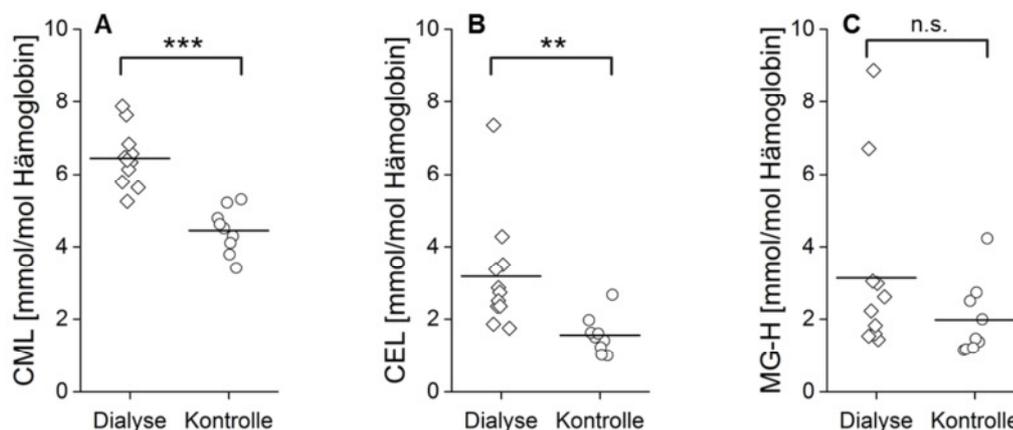


Abbildung 4-43: Gehalte von CML (A), CEL (B) und MG-H (C) des Hämoglobins von Dialysepatienten (diabetisch und nicht-diabetisch) und einer Kontrollgruppe (normoglykämisch);— Mittelwert; Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Methoden: Abschnitt 3.7.8) mit dem Signifikanzniveau: \* ( $\alpha < 0,05$ ); \*\* ( $\alpha < 0,01$ ); \*\*\* ( $\alpha < 0,001$ ); n.s. (nicht signifikant,  $\alpha > 0,05$ ).

Die von *Thornalley et al. (2003)* und *Ahmed et al. (2005a)* ermittelten Gehalte für MG-H1 im Hämoglobin von Normoglykämikern sind mit 14,6 mmol/mol Hämoglobin bzw. 31,4 mmol/mol Hämoglobin um Faktor 7 bis 16 höher als der für die Kontrollgruppe bestimmte Mittelwert für MG-H von 2,0 mmol/mol Hämoglobin (Tabelle 4-14). Da die Probenaufarbeitung und die Analytik nahezu nach dem gleichen Verfahren durchgeführt wurden, bleibt der Grund für die großen Unterschiede unklar.

Der Vergleich des MG-H1-Gehalts des Hämoglobins von Typ-1-Diabetikern und Normoglykämikern in der Untersuchung von *Ahmed et al. (2005a)* ergab einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte. Für die Dialysepatienten konnte keine signifikante Erhöhung des MG-H-Gehalts des Hämoglobins ermittelt werden (Abbildung 4-43). Für alle anderen MGO-AGEs (CE-Val, MGO-2(1H)-Pyrazinone, CEL) waren die Mittelwerte der Gruppen signifikant

verschieden. Die Bildung von MG-H an den Seitenketten des Arginins in Hämoglobin scheint also für Unterschiede in der Konzentration des Methylglyoxals in Erythrozyten weniger empfindlich zu sein.

### 4.3.9 Relative Glykierung der Derivatisierungsstellen

#### *Fructosylderivate*

Der absolute Gehalt des Fructosyllysins in den untersuchten Hämoglobinproben war etwa um ein Drittel höher als der Gehalt des Fructosylvalins (Tabelle 4-11). Wird der Gehalt der Derivate allerdings auf die absolute Anzahl der möglichen Derivatisierungsstellen (44 x Lysin bzw. 4 x Valin pro Hämoglobintetramer) bezogen, ergibt sich für Fructosylvalin ein Derivatisierungsgrad, der um Faktor 9 höher liegt als der für Fructosyllysine (Tabelle 4-15). Nach dieser Betrachtung wäre die Reaktivität des N-Terminus der Hämoglobinketten deutlich höher. Allerdings unterscheiden sich nicht nur die N-Termini der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Kette deutlich in ihrem Umsatz zum Amadori-Produkt, sondern auch die vielen möglichen Lysinseitenketten (*Shapiro et al., 1980*). Die Reaktivität der Derivatisierungsstellen müsste korrekterweise zwischen jedem einzelnen Lysin und zwischen den N-Termini unterscheiden.

#### *Glyoxal-AGEs*

Bei der Amadori-Umlagerung von der Schiff'schen Base zum Fructosylderivat wird die Bildung des 1,2-Enaminols als geschwindigkeitsbestimmender Schritt angesehen. Dieses 1,2-Enaminol als Übergangsverbindung der Gleichgewichtsreaktion kann leicht oxidiert werden (*Hofmann et al., 1999*). Die Fructosylderivate werden als vergleichsweise stabile Produkte angesehen und in Erythrozyten liegt stets ein Überschuss der Edukte (Glucose, freie Aminogruppen) vor, so dass die oxidative Bildung von CM-Derivaten als Nebenreaktion der Amadori-Umlagerung und weniger als Abbau von Fructosylderivaten angesehen werden kann (Abschnitt 2.1.3.2). Da beide Produkte vom gleichen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt abhängen, sollten allerdings genau wie bei einer Abbaureaktion die Gehalte des Nebenprodukts mit denen des Hauptprodukts korrelieren.

Für CML wurden 3-fach höhere Gehalte in humanem Hämoglobin quantifiziert als für CM-Val (Tabelle 4-12, Tabelle 4-14). Der Derivatisierungsgrad für CM-Val ist hingegen um Faktor 3 bis 4 größer als für CML (Tabelle 4-15). Der geringere Unterschied im Derivatisierungsgrad im Vergleich zu den Fructosylderivaten könnte darauf hindeuten, dass die Lysinseitenketten, die mit Glucose zu Fru-Lys reagieren, in höherem Maße der Oxidation ausgesetzt sind als die N-Termini.

In den Vergleich des Derivatisierungsgrades zu den CM-Derivaten mit Bezug zu den Gehalten der Fructosylderivate muss einbezogen werden, dass aus dem oxidativen Abbau des 1,2-Enaminols des N-terminalen Valins neben CM-Val auch die Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone als N-terminale Derivate entstehen können. Wie in den Abschnitten 4.3.2.1 und 4.3.2.2 beschrieben wurde, sind die Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure nicht

stabil bzw. können aus den N-terminalen Fructosylderivaten der Hämoglobinketten aufarbeitungsinduziert nachgebildet werden. Ausgehend von dem Extrembeispiel, dass bei der Hydrolyse des Hämoglobins keine Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone aus den Fructosylderivaten nachgebildet werden und der Verlust der Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone für die  $\beta$ -Kette 92% und für die  $\alpha$ -Kette 44% beträgt (Abbildung 4-25), wäre bei der Kontrollgruppe von einem Gehalt für das GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon von 0,15 mmol/mol Derivatisierungsstelle und für das GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon von 0,03 mmol/mol Derivatisierungsstelle auszugehen. In der Summe wäre der Derivatisierungsgrad von 0,18 mmol/mol Derivatisierungsstelle fast doppelt so hoch wie für CML. Für die Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs wäre der Derivatisierungsgrad dann um Faktor 4 bis 5 höher als für CML (Tabelle 4-15).

Tabelle 4-15: MRPs in humanem Hämoglobin – Derivatisierungsgrad der reaktiven Aminogruppen

MRP	Dialyse		Kontrolle	
	[mmol/mol Derivatisierungsstelle <sup>‡</sup> ] <sup>#</sup>		[mmol/mol Derivatisierungsstelle <sup>‡</sup> ] <sup>#</sup>	
Fru-Val	12,2 ± 3,1	(8,5-19,3)	9,0 ± 0,8**	(7,7-10,3)
Fru-Lys	1,41 ± 0,44	(0,87-2,31)	1,06 ± 0,08*	(0,93-1,14)
CM-Val	0,49 ± 0,15	(0,29-0,79)	0,40 ± 0,15	(0,20-0,64)
GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon <sup>§</sup>	0,026 ± 0,006	(nd-0,033)	0,020 ± 0,011	(nd-0,041)
GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon <sup>§</sup>	0,015 ± 0,008	(0,005-0,034)	0,012 ± 0,008	(nd-0,024)
Summe N-terminale GO-AGEs <sup>§</sup>	0,60 ± 0,12	(0,43-0,85)	0,48 ± 0,10*	(0,33-0,65)
CML	0,147 ± 0,018	(0,12-0,18)	0,101 ± 0,014***	(0,08-0,12)
CE-Val	0,022 ± 0,006	(0,014-0,033)	0,016 ± 0,005*	(0,008-0,022)
MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon	0,024 ± 0,011	(nd-0,042)	0,014 ± 0,004*	(nd-0,017)
MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon	0,053 ± 0,020	(0,028-0,104)	0,033 ± 0,005**	(0,027-0,042)
Summe N-terminale MGO-AGEs	0,060 ± 0,018	(0,04-0,10)	0,037 ± 0,009**	(0,03-0,05)
CEL	0,072 ± 0,036	(0,04-0,17)	0,035 ± 0,012**	(0,02-0,06)
MG-H	0,26 ± 0,20	(0,12-0,74)	0,17 ± 0,09	(0,10-0,35)

<sup>#</sup>Mittelwert ± Standardabweichung (Spannweite); <sup>‡</sup>Berechnung bezogen auf alle 44 Lys bzw. 12 Arg in einem Hämoglobintetramer; bei Val-Derivaten Berechnung bezogen auf 4 N-terminale Val in einem Hämoglobintetramer (auch bei Summe N-terminale GO- bzw. MGO-AGEs), bei Pyrazinonen bezogen auf zwei  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Ketten eines Hämoglobintetramers; <sup>§</sup> ohne Berücksichtigung der Wiederfindung; <sup>§</sup> mit Berücksichtigung der Wiederfindung (GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon: 66%, GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon: 8%, Abschnitt 4.3.2.1, Abbildung 4-25); Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Methoden: Abschnitt 3.7.8) mit dem Signifikanzniveau: \* ( $\alpha < 0,05$ ); \*\* ( $\alpha < 0,01$ ); \*\*\* ( $\alpha < 0,001$ ).

Auch aus Faktor 5 für die Glyoxal-AGEs im Vergleich zu Faktor 9 für die Fructosylderivate könnte ein stärkerer oxidativer Abbau an der Seitenkette des Lysins als am N-terminalen Valin gefolgert werden. Da sich das Fructosylvalin hauptsächlich an der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins und damit im Inneren des Moleküls befindet, aber Fructosyllysin überwiegend an der Oberfläche der Quartärstruktur des Hämoglobins liegt (*Shapiro et al., 1980*), könnten Derivate des Lysins für oxidative Reaktionen einfacher zugänglich sein.

Wenn andererseits die Bildung des CM-Derivats hauptsächlich als Nebenreaktion der Bildung und nicht des Abbaus des stabilen Fructosylderivats über die Retro-Amadori-Umlagerung angesehen wird, könnte die enzymatische Deglykierung (Abschnitt 2.3.4.5) für das geringere

Verhältnis von Fru-Lys zu CML verantwortlich sein. Dann müsste die Derivatisierung zu CML im Vergleich zu Fru-Lys besonders an Lysinseitenketten, deren Fructosylderivate gute Substrate der Deglykierungsenzyme darstellen, verhältnismäßig höher ausfallen.

### *Methylglyoxal-AGEs*

Die Seitenkette des Arginins reagiert besonders effektiv mit 1,2-Dicarbonylverbindungen wie Methylglyoxal und kann deshalb gut geeignet sein um die Belastung mit 1,2-Dicarbonylverbindungen zu bewerten. In einem physiologischen Modellsystem zeigten *Krause et al. (2004)*, dass die Reaktion der Seitenkette des Lysins mit Glyoxal im Vergleich zur Seitenkette des Arginins vernachlässigbar ist.

Die Gehalte von CEL und MG-H in den untersuchten Hämoglobinproben waren gleich groß (Tabelle 4-14). Da ein Hämoglobintetramer aber 44 Lysin und 12 Arginin enthält, ergibt sich für Arginin zu MG-H ein ca. 4-fach höherer Derivatisierungsgrad als für Lysin zu CEL (Tabelle 4-15). Bleiben äußere Faktoren wie die Molekülstruktur, die Zugänglichkeit und benachbarte funktionelle Gruppen unberücksichtigt, bestätigt dieses Ergebnis die hohe Reaktivität der Guanidinofunktion des Arginins gegenüber Methylglyoxal. Dass der Unterschied nicht noch größer ausfiel, kann möglicherweise mit der geringen Stabilität der Hydroimidazolone des Arginins begründet werden (*Ahmed et al., 2002*).

Der Gehalt von CE-Val lag zwischen den Gehalten für die MGO-2(1*H*)-Pyrazinone (Tabelle 4-13). Da CE-Val an beiden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten vorkommen kann, ergibt sich ein Derivatisierungsgrad des N-terminalen Valins aller vier Globinketten eines Hämoglobintetramers von 0,02 mmol CE-Val/mol Valin. Für das MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon der  $\alpha$ -Kette ergibt sich der gleiche und für das MGO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon ein etwa doppelt so großer Derivatisierungsgrad (Tabelle 4-15). Es liegt also ein höherer Umsatz zu den MGO-2(1*H*)-Pyrazinon vor. In welchem Verhältnis das CE-Val auf die beiden Hämoglobinketten verteilt ist, kann aus den vorliegenden analytischen Daten nicht geschlossen werden.

Der höhere Umsatz der N-Termini zu den 2(1*H*)-Pyrazinonen im Vergleich zum Carboxylalkylprodukt (CE-Val) unterscheidet sich zu den Ergebnissen aus der Modellinkubation der N-terminalen Dipeptide Val-Leu und Val-His mit Glyoxal (Abschnitt 4.2.2). Möglicherweise kann die Struktur der Dicarbonylverbindung die Verteilung in der Produktbildung beeinflussen. Bei der Reaktion mit Methylglyoxal kommen zwei relevante Stellen im Bildungsmechanismus in Frage (Abbildung 4-44). Einerseits kann der nukleophile Angriff der N-terminalen Aminogruppe an der Aldehyd- oder der Ketogruppe des Methylglyoxals erfolgen. Dabei kann das 1-Iminomethylglyoxal- oder das 2-Iminomethylglyoxalderivat entstehen. Wird das 1-Iminomethylglyoxalderivat gebildet, kann ausschließlich das 6-Methyl-2(1*H*)-pyrazinon entstehen. Aus dem 2-Iminomethylglyoxalderivat kann das 5-Methyl-2(1*H*)-Pyrazinon oder das CE-Derivat gebildet werden. Dieser Abzweig im Bildungsmechanismus ist die zweite Stelle, an der die Ausbildung der Anteile der beiden AGEs beeinflusst werden könnte. Neben der Struktur der 1,2-Dicarbonylverbindung könnten die Reaktionsbedingungen der Umge-

bung der reaktiven Aminogruppen *in vivo* die Anteile der N-terminalen Methylglyoxalderivate bestimmen.

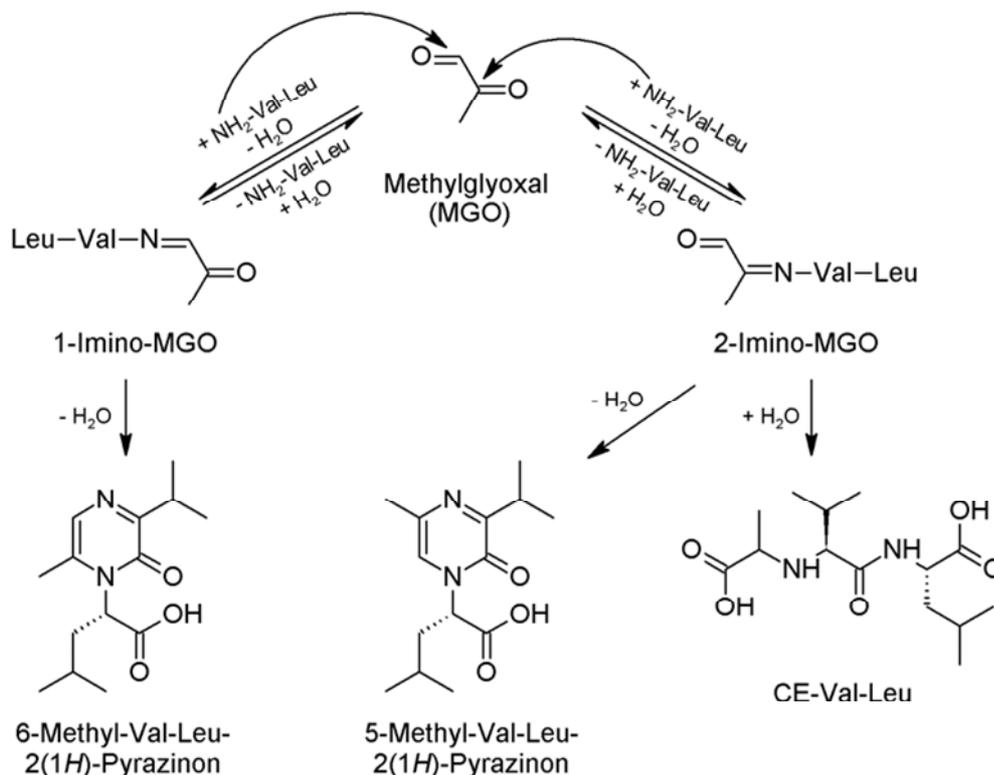


Abbildung 4-44: Bildung von MGO-2(1H)-Pyrazinonen und N- $\alpha$ -CE-Peptiden am Beispiel der Reaktion von Methylglyoxal mit Val-Leu

Ein Vergleich der Derivatisierung der N-Termini der Hämoglobinketten (Summe N-terminale MGO-AGEs) und der Seitenkette des Lysins (CEL) mit Methylglyoxal zeigt, dass der Derivatisierungsgrad etwa gleich ist (Tabelle 4-15). Der Derivatisierungsgrad von Arginin zu MG-H ist dagegen um etwa das 4-Fache höher. Die Guanidinfunktion der Seitenkette des Arginins kann somit als reaktivster Reaktionsort für Methylglyoxal und vermutlich auch andere Dicarbonylverbindungen in humanem Hämoglobin angesehen werden. Diese Erkenntnis ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Thornalley et al. (2003)* und *Ahmed et al. (2005a)*, auch wenn dort ein noch erheblich höherer Derivatisierungsgrad von Arginin zu MG-H1 quantifiziert wurde.

Möglicherweise kann genau diese hohe Reaktivität gemeinsam mit der relativ geringen Stabilität der Hydroimidazolone ein Grund sein, warum die Mittelwerte der MG-H-Gehalte der Probandengruppen nicht unterschieden werden konnten (Abschnitt 4.3.8). Für MG-H1 ist bekannt, dass es im Vergleich zu anderen Arginin-AGEs mit einer Halbwertszeit von 11 Tagen noch die höchste Stabilität unter physiologischen Modellbedingungen (pH = 7,4, 37 °C) aufweist (*Ahmed et al., 2002*). Im Vergleich zu einer Lebensdauer der Erythrozyten von 90 bis 120 Tagen (*Khera et al., 2015*) ist diese Halbwertszeit als relativ kurz einzuschätzen. CE-Derivate und MGO-2(1H)-Pyrazinone können hingegen als stabile Endprodukte angese-

hen werden. Damit könnten durch die hohe Reaktivität von Arginin und geringe Stabilität von MG-Hs zwar kurzfristige Erhöhungen oder über einen langen Zeitraum konstant hohe Methylglyoxalkonzentration registriert werden, aber starke Schwankungen über längere Intervalle könnten vermutlich nicht so empfindlich detektiert werden. Dafür wären die stabilen Methylglyoxal-AGEs besser geeignet.

#### 4.3.10 Unterscheidung der N-terminalen Glykierung nach $\alpha$ - und $\beta$ -Kette des Hämoglobins

Die Freisetzung der N-terminalen AGEs erfolgte mittels Hydrolyse mit 6 M Salzsäure. Dabei wurden alle Peptidbindungen gespalten. Da die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des Hämoglobins N-terminal mit einem Valin beginnen, können die Carboxyalkylderivate (CM-Val, CE-Val) nicht danach unterschieden werden, an welcher Kette sie gebunden waren. Bei den 2(1H)-Pyrazinonen reagieren die ersten beiden Aminosäuren der N-Termini der Hämoglobinketten zu AGEs. Deshalb können die kettenspezifischen 2(1H)-Pyrazinone einen Hinweis auf Unterschiede in der Reaktivität der N-Termini der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten geben.

##### *N-terminale Glyoxal-AGEs*

In den Abschnitten 4.3.6 und 0 wurde bereits beschrieben, dass höhere Gehalte für CM-Val als für die Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone quantifiziert wurden. Nach Verwendung der Wiederfindungsrate für die säurelabilen Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone ergab sich für die Kontrollgruppe ein Gehalt von 0,37 mmol/mol Hämoglobin. Der CM-Val-Gehalt lag bei 1,6 mmol/mol Hämoglobin und war damit um Faktor 4 höher (Tabelle 4-12). Für die Bildung der Glyoxal-AGEs des Dipeptids Val-His nach Umsatz mit Glyoxal unter physiologischen Bedingungen wurde ein etwas mehr als doppelt so hoher Umsatz zum CM-Derivat als zum 2(1H)-Pyrazinon beobachtet (Abbildung 4-17). Deshalb ist zu vermuten, dass auch der größte Teil des CM-Vals von den N-Termini der  $\beta$ -Ketten stammt.

Für den Gehalt des GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinons wurden mit 0,31 mmol/mol Hämoglobin 5-fach höhere Gehalte ermittelt als für den Gehalt des GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons mit 0,06 mmol/mol Hämoglobin (Tabelle 4-12). Da die Glyoxal-AGEs vermutlich überwiegend als Nebenprodukte der Amadori-Umlagerung gebildet werden, erscheint auf Grund des 10-fach höheren Gehalts des N-terminalen Fructosylderivats der  $\beta$ -Kette im Vergleich zur  $\alpha$ -Kette ein entsprechend höherer Gehalt der Glyoxal-AGEs der  $\beta$ -Kette plausibel.

##### *N-terminale Methylglyoxal-AGEs*

Die N-terminalen Methylglyoxal-AGEs werden aus der Reaktion der N-Termini der Hämoglobinketten mit freiem Methylglyoxal gebildet. Die Summe der Gehalte der MGO-2(1H)-Pyrazinone ist mit 0,093 mmol/mol Hämoglobin um Faktor 1,5 höher als der CE-Val-Gehalt mit 0,063 mmol/mol Hämoglobin (Kontrollgruppe, Tabelle 4-13). Das Verhältnis des Gehalts des N-terminalen Carboxyalkylderivats zum Gehalt der 2(1H)-Pyrazinone ist damit für die N-terminalen Methylglyoxal-AGEs umgekehrt und als für die N-terminalen Glyoxal-AGEs.

Genau wie für CM-Val kann für CE-Val nicht direkt festgestellt werden, in welchen Anteilen es von welcher der beiden Hämoglobinketten stammt. Deshalb bleibt die Bewertung der Reaktivität der N-Termini der beiden Hämoglobinketten gegenüber Methylglyoxal, trotz der Möglichkeit die Methylglyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone den Hämoglobinketten zuordnen zu können, unvollständig.

Vereinfacht von den Gehalten der MGO-2(1*H*)-Pyrazinone ausgehend, kann auf eine höhere Reaktivität des N-Terminus der  $\beta$ -Kette geschlossen werden. Genau wie bei den Inkubationsexperimenten unter physiologischen Bedingungen, wo die N-terminalen Dipeptide mit Glyoxal umgesetzt wurden (Abbildung 4-17), konnte ein doppelt so hoher Umsatz um Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon im Vergleich zum Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon festgestellt werden (Tabelle 4-13).

Da die Bildung der MGO-2(1*H*)-Pyrazinone nicht wie die der GO-2(1*H*)-Pyrazinone von der Bildung des Fructosylderivats abhängt, ist eine Bewertung der Reaktivität der N-Termini der Hämoglobinketten gegenüber der 1,2-Dicarbonylverbindung Methylglyoxal *in vivo* und der Vergleich zu den Modellexperimenten möglich. Auch wenn die Anteile von CE-Val nicht den Hämoglobinketten zugeordnet werden können, kann angenommen werden, dass das Inkubationsmodell unter physiologischen Bedingungen zum Umsatz von Dipeptiden mit 1,2-Dicarbonylverbindungen zu den 2(1*H*)-Pyrazinonen eine gute Näherung ist, um den Einfluss der ersten zwei Aminosäuren auf die Reaktivität der N-Termini zu bewerten.

Damit könnte möglicherweise grundsätzlich die Verwendung N-terminaler Dipeptide ausreichen, um die Reaktivität der N-Termini von Proteinen mit 1,2-Dicarbonylverbindungen zu AGEs zu vergleichen. Die Bildung der Fructosylderivate der N-Termini der Hämoglobinketten wird stark von ihrem Umgebungsmilieu beeinflusst (Abschnitt 2.3.4.4). Ein solcher Zusammenhang scheint für die Bildung der N-terminalen AGEs *in vivo* nicht relevant zu sein.

#### 4.3.11 Korrelationen der Gehalte von MRPs in Hämoglobinproben

Um Zusammenhänge zwischen den Gehalten der einzelnen MRPs in den Hämoglobinproben zu untersuchen, wurden die Daten in jeder der zwei Probandengruppen auf Korrelationen mit statistischer Signifikanz geprüft. Ein Vergleich der Korrelationen der MRP-Gehalte der Hämoglobinproben zwischen den Gruppen kann helfen Erkenntnisse zu physiologischen Zusammenhängen zu gewinnen. Durch die Korrelationen wurden statistische Zusammenhänge hergestellt, die Hinweise auf ursächliche Zusammenhänge geben können.

Da die Parameter MGO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon, MG-H und CEL für die Gruppe der Dialysepatienten und MG-H für die Kontrollgruppe nicht normalverteilt waren, wurde zur Prüfung auf Korrelationen mit diesen Parametern der Test nach Spearman verwendet. Alle anderen Kombinationsmöglichkeiten wurden mit dem Test nach Pearson auf Korrelation geprüft.



Da die einzelnen N-terminalen Glyoxal-AGEs bzw. die einzelnen N-terminalen Methylglyoxal-AGEs jeweils als konkurrierende Produkte angesehen werden können, wurden auch die Summen der N-terminalen Glyoxal-AGEs bzw. der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs auf Korrelationen untersucht.

In Tabelle 4-16 und Tabelle 4-17 sind die Korrelationskoeffizienten inklusive der zugehörigen Signifikanzniveaus für die MRP-Gehalte der Hämoglobinproben der Kontrollgruppe bzw. der Dialysepatienten zusammengefasst.

#### 4.3.11.1 Korrelationen der Gehalte der Fructosylderivate in den Hämoglobinproben der Kontrollgruppe

Im Gegensatz zur Gesamtheit der untersuchten Probanden (Abbildung 4-40) konnten für die Gehalte der Amadori-Produkte (Fru-Val, HbA<sub>1c</sub>-Wert, Fru-Lys) der Kontrollgruppe keine gemeinsamen Korrelationen ermittelt werden (Tabelle 4-16). Durch die kleinen Spannweiten der Glykierungsparameter in der Gruppe der Normoglykämiker kann schon die geringfügig größere Streuung eines der Parameter die Signifikanz einer Korrelation verhindern. So können interindividuell variierende Aktivitäten intrazellulärer Deglykierungsenzyme (Fructosamininasen, Abschnitt 2.3.4.5) insbesondere die Fru-Lys-Gehalte des Hämoglobins beeinflussen (Delpierre et al., 2006; Krause et al., 2006). Auch zwischen Fru-Val und dem HbA<sub>1c</sub>-Wert konnte keine Korrelation ermittelt werden. Wie bereits in Abschnitt 4.3.5 diskutiert wurde, könnten interindividuell unterschiedlich hohe Anteile des Fru-Val-Gehalts an der  $\alpha$ -Kette des Hämoglobins eine entsprechende Streuung verursachen.

#### 4.3.11.2 Korrelationen der Gehalte der Glyoxal-AGEs in den Hämoglobinproben der Kontrollgruppe

Für die Gehalte der Glyoxal-AGEs in den Hämoglobinproben der Kontrollgruppe wurden signifikante Korrelationen mit den Gehalten der Fructosylderivate bestimmt (Tabelle 4-16). In Abbildung 4-45 sind die Korrelationen der Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs zu Fru-Val (A), von CM-Val zu Fru-Val (B) sowie von CML zu Fru-Lys (C) dargestellt. Für die Korrelation von CM-Val zu Fru-Val könnte vermutet werden, dass eine Nachbildung von CM-Val aus Fru-Val bei der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure einen aufarbeitungsidizierten Zusammenhang bewirken könnte. Da aber CML und Fru-Lys nach enzymatischer Hydrolyse analysiert wurden und nur eine minimale Nachbildung von CM-Val aus Fru-Val beobachtet wurde (Abschnitt 4.3.2.2), kann diese Vermutung verworfen werden.

Der statistische Zusammenhang der Gehalte der Glyoxal-AGEs mit den Fructosylderivaten lässt sich mechanistisch begründen, da die Glyoxal-AGEs als oxidative Nebenprodukte der Amadori-Umlagerung entstehen (Abbildung 4-71). Da das N-terminale CM-Val mechanistisch mit der Bildung von Fru-Val in Zusammenhang steht, ist nachvollziehbar, dass CM-Val mit Fru-Val aber nicht zwingend mit Fru-Lys korreliert. Dass CML aber sowohl mit Fru-Lys als auch Fru-Val korreliert, ist kein Widerspruch sondern eine Bestätigung des Zusammen-

hangs, denn die Bildungsraten von Fru-Val und Fru-Lys hängen beide direkt von der intrazellulären Glucosekonzentration ab. *Ahmed et al. (2005a)* konnten die beschriebenen Korrelationen der Glyoxal-AGEs (CML, G-H1) mit den Fructosylderivaten (HbA<sub>1c</sub>-Wert, Fru-Lys) für Normoglykämiker (n = 12) nicht nachweisen. Deshalb sollte die Reproduzierbarkeit des Zusammenhangs mit einer größeren Probandenzahl geprüft werden.

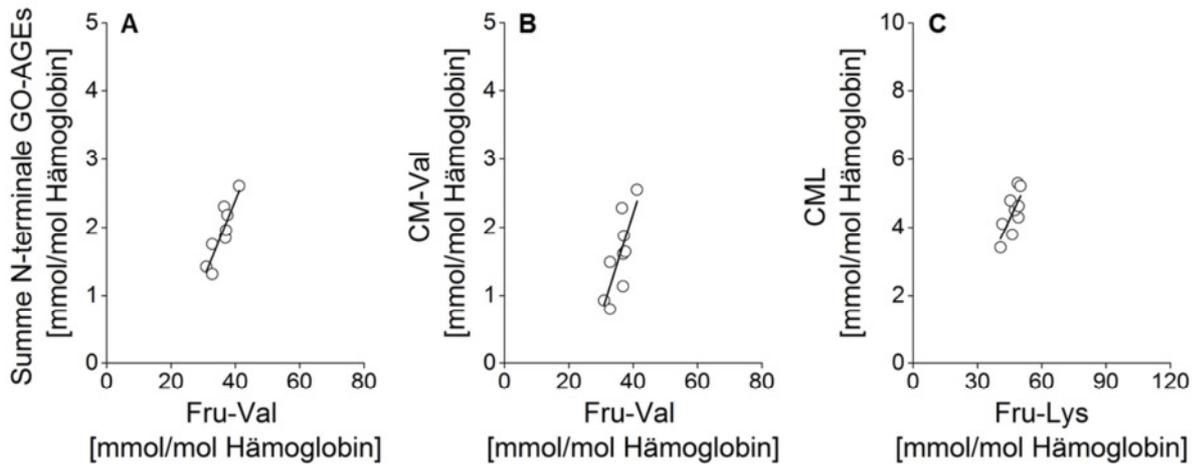


Abbildung 4-45: Darstellung der Korrelationen der Summe N-terminaler Glyoxal-AGEs (Summe CM-Val, GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit Fru-Val (A:  $y = 0,116x - 2,351$ ;  $R = 0,89^{**}$ ), von CM-Val mit Fru-Val (B:  $y = 0,148x - 3,725$ ;  $R = 0,79^*$ ) und von CML mit Fru-Lys (C:  $y = 0,136x - 1,860$ ;  $R = 0,73^*$ ).

Für den HbA<sub>1c</sub>-Wert konnten keine signifikanten Korrelationen bestimmt werden, obwohl dieser in gleicher Weise wie Fru-Val und Fru-Lys von der mittleren Glucosekonzentration abhängt. Die eindeutige Quantifizierung der Fructosylderivate lieferte folglich Daten, die besser geeignet sind, um Zusammenhänge in der Glykierung zu erkennen.

Für die Summe der Gehalte der N-terminalen Glyoxal-AGEs wurde keine signifikante Korrelation zu den CML-Gehalten ermittelt. In Abbildung 4-46 (A) ist aber zu erkennen, dass mit einer größeren Anzahl der Probanden ein signifikanter Zusammenhang zu erwarten ist.

Eine Besonderheit in den Korrelationen der MRP-Gehalte der Hämoglobinproben der Kontrollgruppe wurde für die Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone beobachtet. Die Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone korrelierten nicht mit Fru-Val und ergaben negative Korrelationen zu CM-Val. Für das GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon wurden auch negative Korrelationen zu CE-Val und dem MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon ermittelt (Tabelle 4-16). Die Korrelationen der Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone mit CM-Val sind in Abbildung 4-46 (B, C) dargestellt. In Proben mit geringeren Gehalten der Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone wurden höhere Gehalte von CM-Val und umgekehrt in Proben mit höheren Gehalten der Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone niedrigere Gehalte von CM-Val ermittelt. Für die negative Korrelation zu den Methylglyoxal-AGEs besteht vermutlich kein ursächlicher Zusammenhang und der statistische Zusammenhang wird von der guten Korrelation von CE-Val bzw. des MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons mit CM-Val erzeugt.

Eine physiologische Erklärung für den mechanistischen Zusammenhang, der die negative Korrelation zwischen den Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinonen und CM-Val verursacht, könnte möglicherweise über den individuellen Grad des oxidativen Stresses gefunden werden. Die Spanne der Gehalte der N-terminalen Glyoxal-AGEs in der Kontrollgruppe ist sehr groß. Der höchste Wert des CM-Val-Gehalts des Hämoglobins ist etwa um Faktor 3 größer als der niedrigste. Bei den Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinonen ist der Faktor größer 5. Wird der Gehalt der N-terminalen Glyoxal-AGEs als Maß der oxidativen Nebenreaktion der Bildung von Fru-Val betrachtet, muss auf Grund der großen Unterschiede der Gehalte der Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs zwischen den Probanden ebenfalls von stark unterschiedlichen oxidativen Bedingungen ausgegangen werden. Aus dem Zwischenprodukt Iminoglyoxal, für dessen Bildung ein oxidativer Schritt notwendig ist (Abbildung 2-11, g, j), können sowohl Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone als auch CM-Val gebildet werden (Abbildung 4-71). Ein Reaktionsweg mit einem zweiten oxidativen Schritt (oxidative  $\alpha$ -Spaltung) führt ausschließlich zur Bildung des CM-Derivats (Abbildung 2-11, k). Bei deutlich höheren oxidativen Bedingungen in den Erythrozyten eines Individuums wären also nicht nur insgesamt erhöhte Gehalte der Glyoxal-AGEs zu erwarten, sondern ein Reaktionsweg über zwei oxidative Teilschritte könnte einen größeren Anteil an der Bildungsbilanz ausmachen.

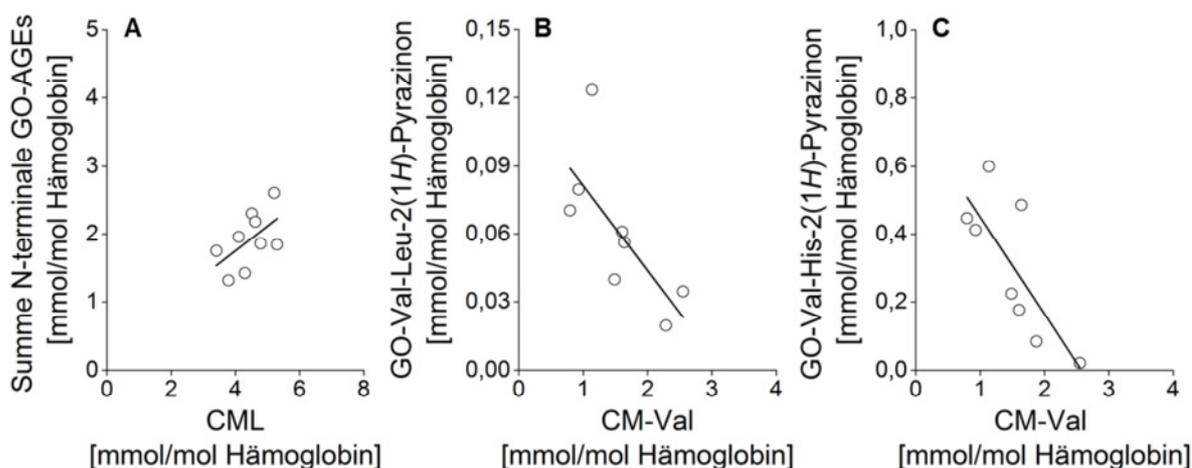


Abbildung 4-46: Darstellung der Korrelation der Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs (Summe CM-Val, GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon, GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon) mit CML (A:  $y = 0,368 x + 0,280$ ;  $R = 0,56^{n.s.}$ ), der negativen Korrelationen des GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinons mit CM-Val (B:  $y = -0,038 x + 0,119$ ;  $R = -0,72^*$ ) und des GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons mit CM-Val (C:  $y = -0,286 x + 0,737$ ;  $R = -0,77^*$ ); Gehalte der GO-2(1*H*)-Pyrazinone unter Berücksichtigung der Wiederfindung.

Die positive Korrelation der Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs zu CM-Val und auch zu CE-Val sowie Fru-Val wird durch den großen Anteil von CM-Val an der Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs bestimmt und ist deshalb kein Widerspruch zu den negativen Korrelationen unter den N-terminalen Glyoxal-AGEs.

Neben einer physiologischen Erklärung kann auch eine aufarbeitungsinduzierte Ursache diskutiert werden. In Abschnitt 4.3.2.1 wurde beschrieben, dass insbesondere die von Glyoxal abgeleiteten 2(1*H*)-Pyrazinone bei der Hydrolyse in 6 M Salzsäure abgebaut werden können.

Ein mögliches Abbauprodukt ist CM-Val (Abbildung 4-26). Wenn in einer Probe ein besonders starker Abbau der Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone stattfindet, ist mit einer starken Nachbildung von CM-Val zu rechnen. Proben mit geringen Gehalten der Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone würden höhere Gehalte von CM-Val enthalten und umgekehrt. Über diesen Zusammenhang wäre eine negative Korrelation zu erklären. In Abbildung 4-47 (A) sind die Gehalte der Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone gegeneinander aufgetragen und es wurde eine signifikante positive Korrelation festgestellt. Zusammen mit der negativen Korrelation zu CM-Val wird dadurch die Vermutung des aufarbeitungsinduzierten Abbaus unterstützt. Da der Schwankungsbereich der Gehalte der Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone sehr groß ist, können die Ursachen bei der Aufarbeitung als beträchtlich eingeschätzt werden. In folgenden Arbeiten sollte erneut ein Augenmerk auf die Abbaubarkeit der 2(1*H*)-Pyrazinone, insbesondere der von Glyoxal abgeleiteten 2(1*H*)-Pyrazinone, unter den Bedingungen der Hydrolyse in 6 M Salzsäure gelegt werden. Vor diesem Hintergrund scheint die Verwendung der Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs zur Bewertung statistischer Zusammenhänge mit anderen AGEs um so sinnvoller. Als Beleg dafür kann die höhere statistische Signifikanz der Korrelation der Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs zu Fru-Val im Vergleich zu CM-Val/Fru-Val (Tabelle 4-16 bzw. Abbildung 4-45) gesehen werden.

In Abbildung 4-47 (B) sind die Gehalte des GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons gegen die Fru-Val-Gehalte aufgetragen. Zu erwarten wäre ein linearer Zusammenhang mit einer positiven Korrelation, da Glyoxal-AGEs als Nebenprodukte der Bildung des Amadori-Produkts gesehen werden können. Statt dessen ist eine starke Streuung der Gehalte des GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons ohne signifikante Korrelation zu sehen. Die Auftragung der Gehalte des GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinons gegen die Fru-Val-Gehalte ergab ein vergleichbares Bild (nicht gezeigt). Auch diese Beobachtung spricht für aufarbeitungsinduzierte Effekte.

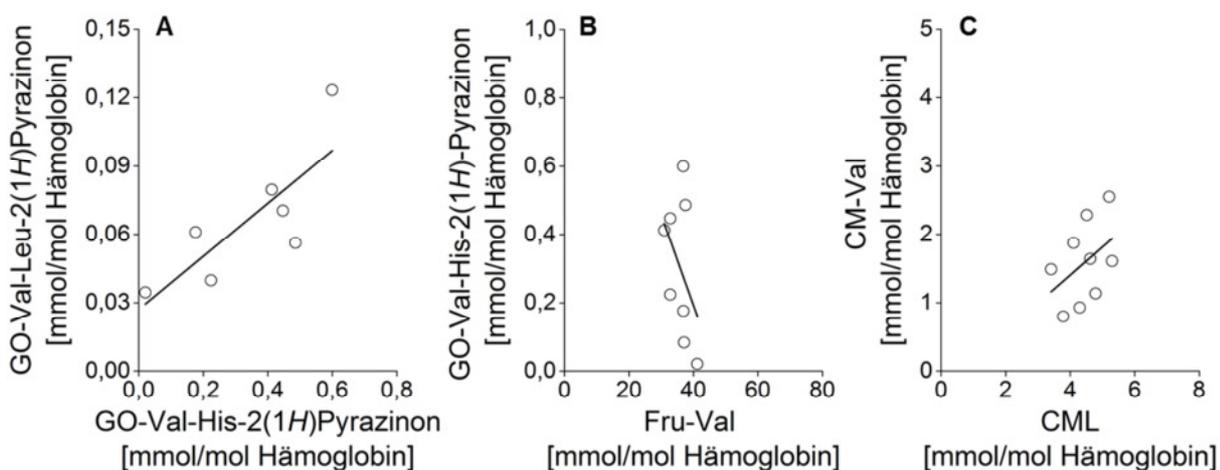


Abbildung 4-47: Darstellung der Auftragung (Gehalte in Hämoglobinproben der Kontrollgruppe) des GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinons gegen das GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon (A:  $y = 0,116 x + 0,027$ ;  $R = 0,80^*$ ), des GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinons gegen Fru-Val (B:  $y = -0,027 x + 1,253$ ;  $R = 0,42^{n.s.}$ ), von CM-Val gegen CML (C:  $y = 0,410 x - 0,236$ ;  $R = 0,43^{n.s.}$ ); Gehalte der GO-2(1*H*)-Pyrazinone unter Berücksichtigung der Wiederfindung.

In Abbildung 4-47 (C) sind die Gehalte von CM-Val gegen CML aufgetragen. Aus der Darstellung ist eine positive Korrelation zu vermuten, allerdings scheint ein systematischer Fehler das Muster in der Verteilung der Wertepaare zu verursachen. An dieser Stelle kann ebenfalls der bereits diskutierte aufarbeitungsinduzierte Effekt verantwortlich sein. In Abbildung 4-46 (A) ist die Auftragung der Gehalte der Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs gegen die Gehalte von CML in den Proben der Kontrollgruppe dargestellt. Durch die Zusammenfassung der N-terminalen Glyoxal-AGEs zu einem Parameter scheint der mögliche Einfluss der Aufarbeitung partiell kompensiert zu werden. Da der Abbau der Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone vermutlich nicht vollständig zu CM-Val erfolgt, kann vermutet werden, dass die tatsächlichen Gehalte der Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone in den Hämoglobinproben höher als die hier dargestellten Gehalte lagen.

#### 4.3.11.3 Korrelationen der Gehalte der Methylglyoxal-AGEs in den Hämoglobinproben der Kontrollgruppe

Für die Gehalte von CE-Val und die Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs wurden signifikante Korrelationen zu den Fru-Val-Gehalten ermittelt (Tabelle 4-16, Abbildung 4-48: A, B). Eine signifikante Korrelation der CEL-Gehalte mit den Gehalten von Fru-Lys konnte zwar nicht ermittelt werden, aber die Graphik in Abbildung 4-48 (C) zeigt, dass ein entsprechender Zusammenhang zu vermuten ist. *Ahmed et al. (2005a)* fanden keine Korrelation zwischen Fru-Lys und CEL in Hämoglobinproben von Normoglykämikern. Die Reproduzierbarkeit der Korrelation von Fructosylderivaten mit den Methylglyoxal-AGEs bei Normoglykämikern sollte deshalb an einer größeren Probandenzahl überprüft werden.

Die Korrelation der Glykierung durch Glucose und der Bildung von Methylglyoxal-AGEs bei Normoglykämikern könnte ausdrücken, dass schon geringe Unterschiede in der mittleren Glucosekonzentration in den Erythrozyten erhöhte Methylglyoxalgehalte und damit erhöhte Gehalte von Methylglyoxal-AGEs verursachen können. Für Diabetiker ist bekannt, dass bei hyperglykämischen Stoffwechsellagen aus der Anreicherung der Triosephosphate als Intermediate der Glycolyse eine erhöhte Konzentration von Methylglyoxal resultiert (Abschnitte 2.3.1.4 bzw. 4.3.7). Zwischen Normoglykämikern bestehen nur kleine Unterschiede in der mittleren Glucosekonzentration. Deshalb wäre eigentlich keine Anreicherung der Triosephosphate mit einer erhöhten Bildung von Methylglyoxal zu erwarten. Sollte der Zusammenhang aber tatsächlich bestehen, könnten geringe interindividuelle Unterschiede der postprandialen Glucosekonzentration im Blutplasma, in der Glucoseaufnahme der Erythrozyten (Glycation Gap, Abschnitt 2.3.4.3) oder der Kapazität der Glycolyse plausible Ursachen sein. Da die 1,2-Dicarbonylverbindung Methylglyoxal im Vergleich zu Glucose eine deutlich höhere Reaktivität aufweist (*Rabbani and Thornalley, 2014*), könnten größere Unterschiede in den Gehalten der Methylglyoxal-AGEs um Faktor 2 bis 3 im Vergleich zu Faktor 1,3 bei den Fructosylderivaten erklärt werden (Abbildung 4-48).

Die Diagramme in Abbildung 4-49 mit den Auftragungen der Gehalte der MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinone, MGO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinone und von MG-H gegen die Gehalte der Fructosylderivate zeigen, dass sich für diese Methylglyoxal-AGEs keine Korrelationen ergaben. Eventuell sind nicht alle Methylglyoxal-AGEs des Hämoglobins in gleicher Weise als sensitive Parameter zur Detektion von physiologischen Zusammenhängen geeignet. Insbesondere für die N-terminalen Methylglyoxal-AGEs zeigte sich allerdings, dass die Verwendung der Summe der Gehalte sinnvoll sein kann (Abbildung 4-48: A), da mehrere Produkte aus dem gleichen Intermediat entstehen und als konkurrierende Produkte angesehen werden können (Abbildung 4-44). Individuelle Unterschiede in der Ausbildung des Verhältnisses der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs werden dadurch ausgeglichen. Wie bereits an anderer Stelle diskutiert wurde (Abschnitt 0), könnten die CE-Derivate und die Methylglyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone als stabile Endprodukte bessere Indikatoren für im Mittel erhöhte Methylglyoxalkonzentrationen als MG-H sein.

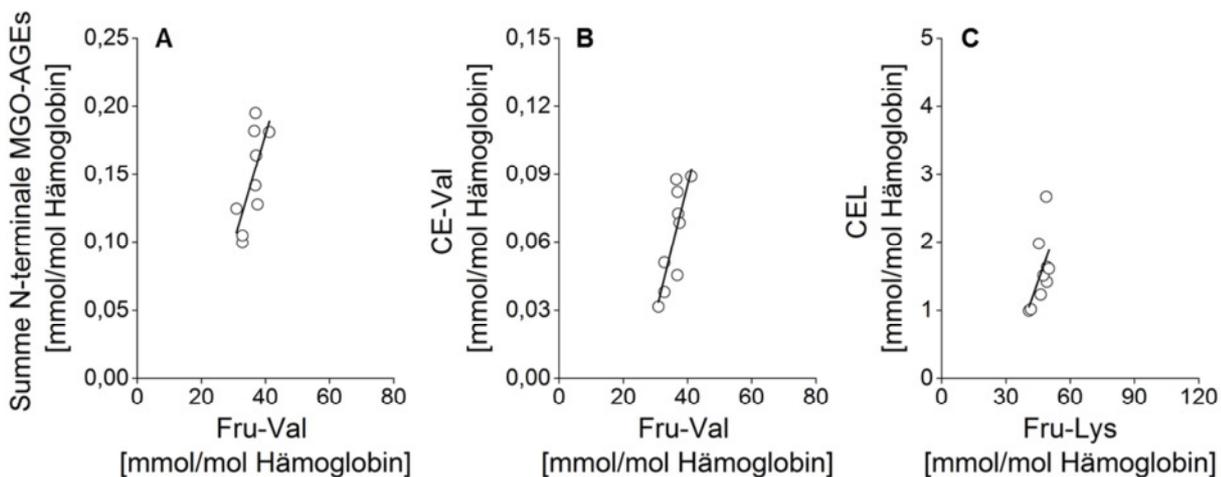


Abbildung 4-48: Korrelationen der Summe N-terminaler Methylglyoxal-AGEs (Summe CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon) mit Fru-Val (A:  $y = 0,0080x - 0,1405$ ;  $R = 0,71^*$ ), von CE-Val mit Fru-Val (B:  $y = 0,0057x - 0,1428$ ;  $R = 0,82^{**}$ ) und von CEL mit Fru-Lys (C:  $y = 0,088x - 2,55$ ;  $R = 0,57^{n.s.}$ ).

Ein Vergleich der Diagramme in Abbildung 4-48 und Abbildung 4-49 zeigt, dass die breiten Verteilungen der Gehalte der Methylglyoxal-AGEs unabhängig von den Fructosylderivaten und unabhängig von einer Korrelation wichtige Schlussfolgerungen zulassen. Während die relative Spannweite der Fructosylderivate bezogen auf deren absoluten Gehalt gering ist, sind die höchsten Werte der Gehalte der einzelnen Methylglyoxal-AGEs um Faktor 2 bis 3 höher als die niedrigsten Werte. Diese Verteilungen sind dabei unabhängig davon, ob die einzelnen Methylglyoxal-AGEs gegen Fru-Val, Fru-Lys oder den  $HbA_{1c}$ -Wert aufgetragen werden. Die breite Spanne der Gehalte der Methylglyoxal-AGEs des Hämoglobins passen hervorragend zu der breiten Spanne, die für die Konzentration von Methylglyoxal in den Erythrozyten von Normoglykämikern bestimmt wurde (Tabelle 2-5). Für die stark variierenden Gehalte der Methylglyoxal-AGEs unabhängig von einer Korrelation mit den Fructosylderivaten könnten interindividuell unterschiedliche Aktivitäten des Glyoxalase-Systems (Abschnitt 2.3.2.5) oder

des Kreatingehalts in den Erythrozyten (*Delanghe et al., 1989; Löbner et al., 2015*) als entscheidende Einflussfaktoren vermutet werden.

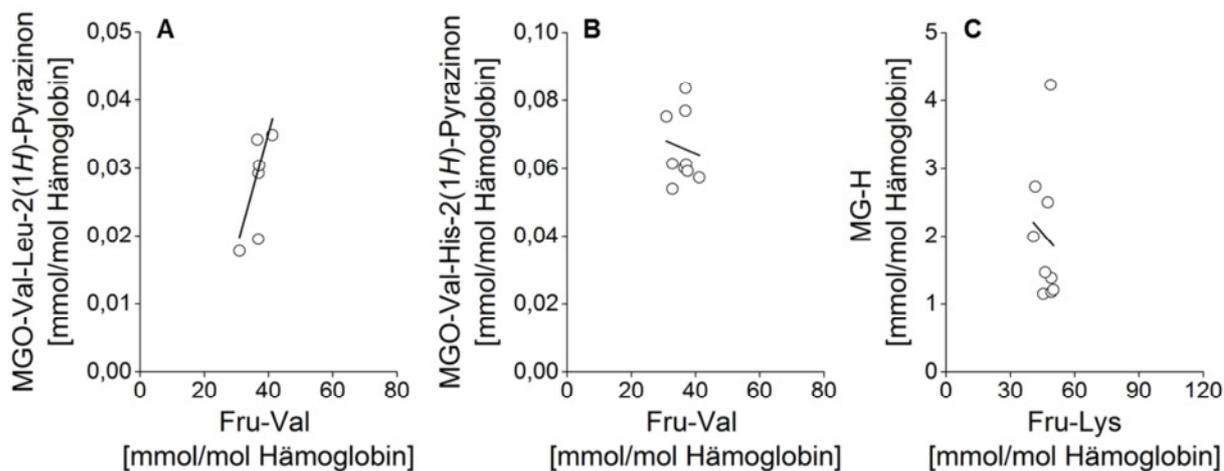


Abbildung 4-49: Korrelation des MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons mit Fru-Val (A:  $y = 0,0017 x - 0,0328$ ;  $R = 0,74^{n.s.}$ ), des MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinons mit Fru-Val (B:  $y = -0,0004 x + 0,805$ ;  $R = 0,13^{n.s.}$ ) und von MG-H mit Fru-Lys (C:  $y = -0,037 x + 3,712$ ;  $R = 0,12^{n.s.}$ ).

In beiden Fällen wäre zu erwarten, dass Korrelationen zwischen den unterschiedlichen Methylglyoxal-AGEs bestehen, da freies Methylglyoxal durch das Glyoxalase-System abgebaut wird bzw. durch Kreatin gebunden werden kann. Es konnten zwar keine signifikanten Korrelationen zwischen der Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs und CEL oder MG-H ermittelt werden, aber die Gehalte von CE-Val und des MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons bzw. des MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinons und von CEL korrelierten signifikant (Tabelle 4-16). Weiterhin zeigen die Auftragungen in Abbildung 4-50, dass eine Korrelation bei einer größeren Probandenzahl insbesondere für die stabilen N-terminalen Methylglyoxal-AGEs mit CEL nachweisbar sein könnte (Abbildung 4-50: A). Eine Korrelation mit dem über die Zeit weniger stabilen MG-H (Abschnitt 0) ist dagegen weniger wahrscheinlich (Abbildung 4-50: B, C).

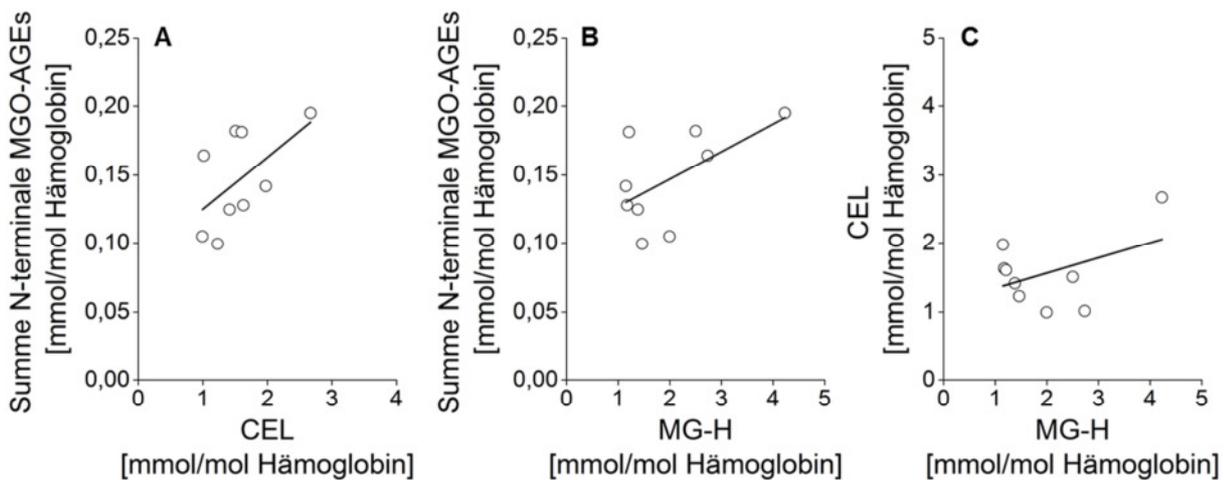


Abbildung 4-50: Korrelationen der Summe N-terminaler Methylglyoxal-AGEs (Summe CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit CEL (A:  $y = 0,038x + 0,087$ ;  $R = 0,57^{n.s.}$ ) bzw. mit MG-H (B:  $y = 0,020x + 0,107$ ;  $R = 0,57^{n.s.}$ ), von CEL mit MG-H (C:  $y = 0,221x + 1,121$ ;  $R = 0,44^{n.s.}$ ).

#### 4.3.11.4 Korrelationen der Gehalte der Glyoxal-AGEs mit denen der Methylglyoxal-AGEs in den Hämoglobinproben der Kontrollgruppe

Sehr interessant sind die Korrelationen der Gehalte der Glyoxal- mit denen der Methylglyoxal-AGEs. Beispielsweise korrelierten die Gehalte für CM-Val mit CE-Val, CML mit CEL, aber auch die Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs mit CML signifikant (Tabelle 4-16, Abbildung 4-51: B, C). Die Korrelationen sind also nicht auf die Derivatisierungsstellen beschränkt. Für die Summe der Gehalte der N-terminalen Glyoxal-AGEs und die Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs konnte keine signifikante Korrelation bestimmt werden, aber die Darstellung in Abbildung 4-51 (A) zeigt, dass mit einer größeren Probandenzahl ein signifikanter Zusammenhang möglich ist.

Da sowohl die Glyoxal-AGEs als auch die Methylglyoxal-AGEs mit den Fructosylderivaten korrelierten, war eine Korrelation zwischen den AGEs zu erwarten. Die Bildung beider Produktgruppen kann grundsätzlich von der mittleren Glucosekonzentration beeinflusst werden. So werden aus Glucose die Fructosylderivate gebildet, als deren Nebenprodukte durch oxidativen Abbau die Glyoxal-AGEs (CM-Derivate, Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone) entstehen. Andererseits entsteht Methylglyoxal als Nebenprodukt des Abbaus der Glucose in der Glycolyse und die Methylglyoxal-AGEs (CE-Derivate, Methylglyoxal-2(1H)-Pyrazinone, MG-H) aus dem freien Methylglyoxal.

Für Normoglykämiker sind nur geringe interindividuelle Unterschiede in der mittleren Glucosekonzentration in den Erythrozyten zu erwarten und es konnten keine Korrelationen zwischen den Gehalten der Fructosylderivate in den Hämoglobinproben der Normoglykämiker festgestellt werden. So ist zu vermuten, dass der Zusammenhang in den Bildungsmechanismen der Glyoxal- und Methylglyoxal-AGEs durch einen zweiten Verknüpfungspunkt beeinflusst wird.

In Abschnitt 2.3.2.7 ist beschrieben, wie die Abwehr gegen oxidativen Stress und gegen den Dicarbonylstress über Glutathion verbunden sind. Beide Abwehrstrategien der Zelle benötigen und verbrauchen reduziertes Glutathion. Über diese Verknüpfung können eine erhöhte oxidative Bildung von Glyoxal-AGEs und eine erhöhte Bildung von Methylglyoxal-AGEs, wegen des geringeren Abbaus des Methylglyoxals durch das Glyoxalasesystem, parallel stattfinden. Dabei ist erstaunlich, dass dieser Zusammenhang schon bei Normoglykämikern feststellbar sein könnte.

Da bei Diabetikern sowohl eine breite Spanne in den Gehalten der Fructosylderivate als auch der intrazellulären Methylglyoxalkonzentration zu erwarten ist, wäre eine Korrelation von Glyoxal- und Methylglyoxal-AGEs zu vermuten. In der Studie von *Ahmed et al. (2005a)* wurde eine Korrelation zwischen CML und CEL weder in der Kontrollgruppe noch bei Typ-I-Diabetikern festgestellt. Da keine Darstellung der Verteilung der Wertepaare publiziert wurde, kann nicht verglichen werden, ob in der Studie von *Ahmed et al. (2005a)* eine Korrelation zwischen CML und CEL zu vermuten und nur nicht statistisch signifikant war. Deshalb sollte der Zusammenhang in weiteren Studien untersucht werden. Die Berücksichtigung einer größeren Anzahl von Parametern und insbesondere der N-terminalen AGEs könnte dabei von Vorteil sein.

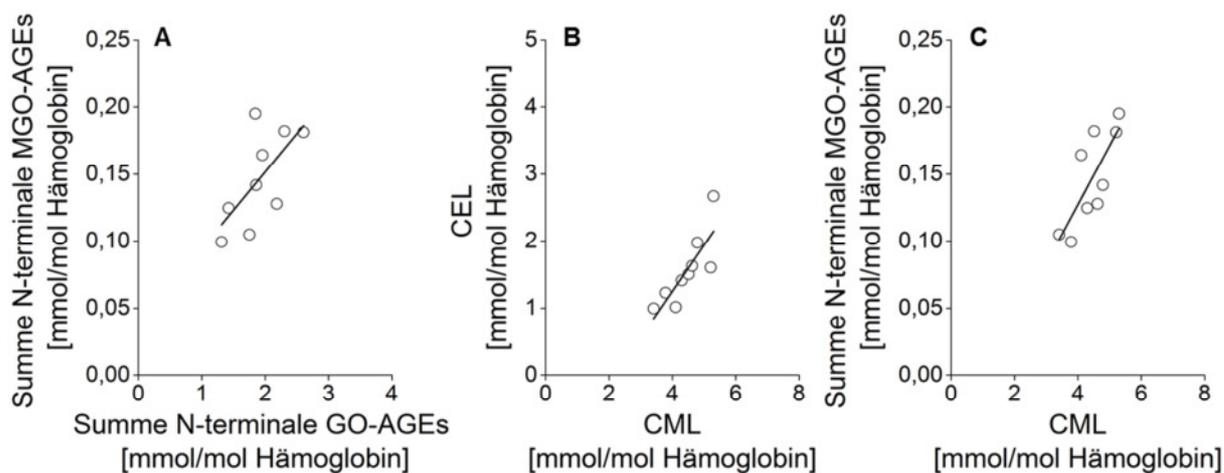


Abbildung 4-51: Korrelationen der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs (Summe CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit CM-Val (A:  $y = 0,057x + 0,0376$ ;  $R = 0,66^{n.s.}$ ), von CEL mit CML (B:  $0,689x - 1,505$ ;  $R = 0,83^{**}$ ) und der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs (Summe CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit CML (C:  $y = 0,044x - 0,049$ ;  $R = 0,78^*$ ).

#### 4.3.11.5 Korrelationen der Gehalte der Fructosylderivate in den Hämoglobinproben der Dialysepatienten

In Abschnitt 4.3.5 wurde bereits die Korrelation der Gehalte des N-terminalen Amadori-Produkts (Fru-Val, HbA<sub>1c</sub>-Wert) und des Amadori-Produkts der Seitenkette des Lysins (Fru-Lys) für alle Probanden (Dialysepatienten + Kontrollgruppe) nachgewiesen. Im Unterschied zur Kontrollgruppe ist die Spannweite der Gehalte der Fructosylderivat bei den Dialysepatienten deutlich größer. Deshalb ergaben sich statistisch signifikante Korrelationen zwischen Fru-

Val, Fru-Lys sowie dem HbA<sub>1c</sub>-Wert innerhalb dieser Gruppe (Tabelle 4-17). Die Korrelationen bedeuten, dass alle drei Parameter zur Bewertung der Glykierung des Hämoglobins durch Glucose äquivalente Bezugsgrößen darstellen.

#### 4.3.11.6 Korrelationen der Gehalte der Glyoxal-AGEs in den Hämoglobinproben der Dialysepatienten

Unter den von Glyoxal abgeleiteten AGEs konnten keine Korrelationen ermittelt werden. Auch die Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs korrelierte nicht mit CML (Abbildung 4-52: A). Die Korrelation der Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs mit CM-Val war zu erwarten, da CM-Val den überwiegenden Anteil dieses Summenparameters ausmacht (Abschnitt 4.3.6).

Es ist davon auszugehen, dass der überwiegende Anteil der Glyoxal-AGEs als Nebenprodukte der Amadori-Umlagerung gebildet wird. Für die Dialysepatienten konnte aber keine Korrelation zwischen den Amadori-Produkten und den Glyoxal-AGEs festgestellt werden (Abbildung 4-52: B, C). Dieses Ergebnis könnte dahingehend interpretiert werden, dass das Ausmaß der Glykierung durch Glucose nicht wie in der Kontrollgruppe der entscheidende Einflussfaktor für die Bildung der Glyoxal-AGEs ist. Die Gehalte der Glyoxal-AGEs der Hämoglobinproben der Dialysepatienten werden vermutlich viel stärker durch das individuelle Ausmaß oxidativer Prozesse bestimmt.

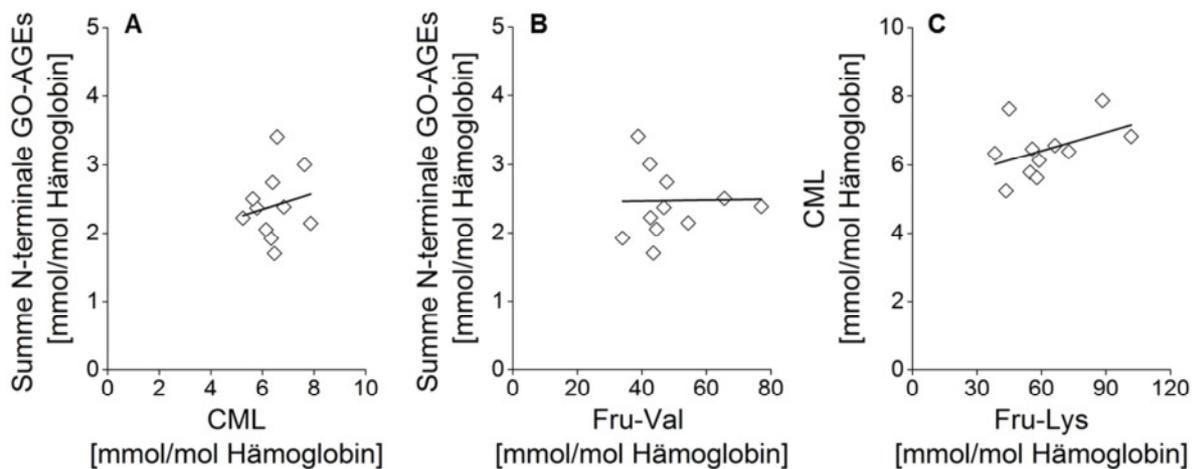


Abbildung 4-52: Korrelationen der Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs (Summe CM-Val, GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit CML (A:  $y = 0,119 x + 1,638$ ;  $R = 0,19^{n.s.}$ ), der N-terminalen Glyoxal-AGEs (Summe CM-Val, GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit Fru-Val (B:  $y = -0,0007 x + 2,4398$ ;  $R = 0,02^{n.s.}$ ) und von CML mit Fru-Lys (C:  $y = 0,018 x + 5,335^{n.s.}$ ).



*Ahmed et al. (2005a)* konnten bei einem Vergleich des CML-Gehalts des Hämoglobins von Typ-I-Diabetikern mit einer normoglykämischen Kontrollgruppe keine signifikante Erhöhung feststellen, obwohl der HbA<sub>1c</sub>-Wert und der Gehalt für Fru-Lys im Hämoglobin deutlich erhöht waren. Die Hyperglykämie mit deutlich höheren Gehalten der Fructosylderivate allein ohne einen erhöhten oxidativen Stress muss also nicht zu erhöhten Gehalten von CM-Derivaten bzw. Glyoxal-AGEs führen.

Der Gehalt der Fructosylderivate ist ein Maß der Glykierung, hängt aber nicht nur von der mittleren Glucosekonzentration sondern auch vom mittleren Erythrozytenalter ab. Geringe Gehalte der Fructosylderivate bedeuten also nicht automatisch, dass keine Hyperglykämie vorliegen kann. So könnte bei einem Dialysepatienten mit einem stark verringerten mittleren Erythrozytenalter trotz Hyperglykämie ein geringer Fructosylgehalt vorliegen (Abschnitt 2.3.4.3). Noch komplexer wird dieser Zusammenhang, durch den bei Dialysepatienten erhöhten oxidativen Stress (*Locatelli et al., 2003*). So kann dieser zusätzlich zu einer hohen, niedrigen oder maskierten Hyperglykämie hoch oder niedrig sein. Auf Grund der Kombinationsmöglichkeiten ist ein direkter Zusammenhang der Verteilung der Fructosylderivate und der Glyoxal-AGEs im Sinne einer Korrelation unwahrscheinlich. Die Graphik in Abbildung 4-52 zeigt eine entsprechend große Streuung der Wertepaare der Gehalte der N-terminalen Glyoxal-AGEs gegenüber Fru-Val (B) bzw. von CML gegenüber Fru-Lys (C). So traten bei Probanden mit moderaten Gehalten der Fructosylderivate niedrige bis hohe Gehalte der Glyoxal-AGEs auf, wobei die Verteilung insbesondere bei den N-terminalen Glyoxal-AGEs breit ausfiel.

#### 4.3.11.7 Korrelationen der Gehalte der Methylglyoxal-AGEs in den Hämoglobinproben der Dialysepatienten

Unter den Methylglyoxal-AGEs konnten außer für die Methylglyoxal-2(1H)-Pyrazinone keine Korrelationen ermittelt werden. Zusätzlich wurden Korrelationen aller N-terminalen Methylglyoxal-AGEs mit der Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs bestimmt. Da CE-Val und die Methylglyoxal-2(1H)-Pyrazinone jeweils zu relevanten Anteilen in die Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs eingehen, war dieses Ergebnis zu erwarten.

Bemerkenswert sind die negativen Korrelationen des MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinons und der Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs mit den Fructosylderivaten und dem HbA<sub>1c</sub>-Wert (Abbildung 4-53). Für CEL und MG-H konnte kein signifikanter Zusammenhang zu den Amadori-Produktgehalten bestimmt werden. In Abbildung 4-54 (A, B) sind die Gehalte der Hämoglobinproben der Dialysepatienten für CEL und MG-H gegen Fru-Lys aufgetragen. Für CEL könnte bei einer größeren Probenanzahl ebenfalls eine negative Korrelation entstehen.

Die negative Korrelation bedeutet, dass das Hämoglobin von Dialysepatienten mit besonders hohen Amadori-Produktgehalten geringe Gehalte der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs bzw. mit niedrigen Amadori-Produktgehalten besonders hohe Gehalte der N-terminalen

Methylglyoxal-AGEs aufwies. Dieser Zusammenhang ist genau invers zu der positiven Korrelation der Amadori-Produktgehalte mit den Gehalten der Methylglyoxal-AGEs in den Hämoglobinproben der Kontrollgruppe (Abbildung 4-48).

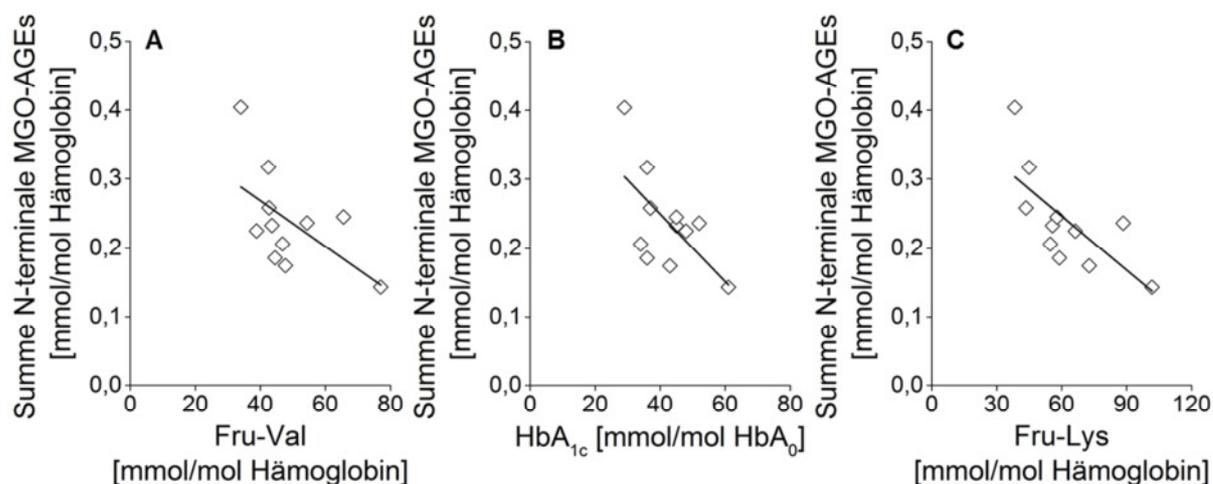


Abbildung 4-53: Korrelationen der Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs (Summe CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit Fru-Val (A:  $y = -0,0033x + 0,4003$ ;  $R = 0,58^{n.s.}$ ), der Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs (Summe CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit dem HbA<sub>1c</sub>-Wert (B:  $y = -0,0049x + 0,4454$ ;  $R = -0,63^*$ ) sowie der Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs (Summe CE-Val, MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon) mit Fru-Lys (C:  $y = -0,0026x + 0,4023$ ;  $R = -0,71^*$ ).

Bei Dialysepatienten kann auf Grund des geringeren mittleren Alters der Erythrozyten, ein niedriger Gehalt der Fructosylderivate trotz einer erhöhten mittleren Glucosekonzentration auftreten (Abschnitt 2.3.4.3). Bei Hyperglykämie kann die Kapazität der Glycolyse überschritten werden und so eine Anreicherung von Triosephosphaten in der Zelle stattfinden. Diese Anreicherung führt durch den Zerfall der Triosephosphate zur erhöhten Bildung von Methylglyoxal (Abschnitt 2.3.1.4). Erhöhte intrazelluläre Methylglyoxalgehalte in Erythrozyten wurden bereits für nicht-diabetische Urämiker ermittelt (Tabelle 2-5). Bei Hyperglykämie sollten diese noch stärker erhöht sein. Diese erhöhten Methylglyoxalgehalte können dann trotz eines durchschnittlichen Amadori-Produktgehalts zu erhöhten Gehalten der Methylglyoxal-AGEs führen.

Ohne genauere Informationen über einen möglicherweise vorliegenden Diabetes mellitus bei den Dialysepatienten könnte also vermutet werden, dass bei den Probanden mit hohen Gehalten der Fructosylderivate das mittlere Erythrozytenalter entsprechend höher war. Ein hohes Erythrozytenalter spricht für einen besser funktionierenden Stoffwechsel und könnte so mit einem weniger stark ausgeprägten Dicarbonylstress durch Methylglyoxal charakterisiert sein. Die Gehalte der Methylglyoxal-AGEs wären entsprechend geringer. Umgekehrt könnte bei Patienten mit einem normalniedrigen Gehalt der Fructosylderivate ein stark verringertes Erythrozytenalter vorliegen. Zwar wäre dann die Zeit für die Bildung von AGEs verkürzt, aber da als Ursache für das geringe Erythrozytenalter ein schlecht funktionierender Stoff-

wechsel oder eine ineffektive Blutreinigung zu vermuten ist, könnte der Dicarboxylstress auch in den Erythrozyten massiv erhöht sein.

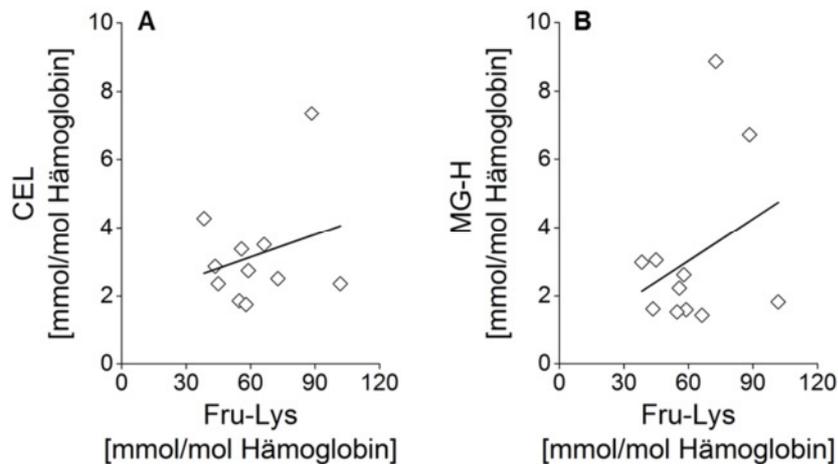


Abbildung 4-54: Korrelationen von CEL mit Fru-Lys (A:  $y = 0,022 x + 1,819$ ;  $R = 0,27^{n.s.}$ ) und von MG-H mit Fru-Lys (B:  $y = 0,041 x + 0,561$ ;  $R = 0,33^{n.s.}$ ).

Um diese Theorie zu bestätigen müsste das mittlere Alter der Erythrozyten oder eine verdeckte Hyperglykämie ermittelt werden. Die Bestimmung des Erythrozytenalters ist aufwendig (Khera et al., 2015). Aber die Hyperglykämie könnte über die klassische Bestimmung der Nüchternblutglucose und einen Glucosetoleranztest erfolgen. Wird dann eine Diskrepanz zwischen dem Ergebnis dieser Tests zum HbA<sub>1c</sub>-Wert bzw. dem Gehalt der Fructosylderivate festgestellt, kann von einer entsprechend verdeckten Hyperglykämie und gleichzeitig einem verringerten mittleren Erythrozytenalter ausgegangen werden.

#### 4.3.12 Zusammenfassung zur N-terminalen Glykierung des Hämoglobins

##### *Gehalte der analysierten MRPs in humanen Hämoglobinproben*

Zur Einordnung der Probandengruppen wurden neben den AGEs auch die Gehalte der *Fructosylderivate* der N-Termini (Fru-Val), der Seitenkette des Lysins (N-ε-Fru-Lys) sowie der HbA<sub>1c</sub>-Wert bestimmt. Die Mittelwerte aller drei Glykierungsparameter waren bei der Gruppe der Dialysepatienten signifikant höher. Bei sechs der Dialysepatienten konnte neben der Urämie das Vorliegen eines Diabetes mellitus vermutet werden.

Nicht für die einzelnen N-terminalen *Glyoxal-AGEs* aber für deren Summe und für CML konnten signifikant höhere Mittelwerte für die Dialysepatienten ermittelt werden. Nicht nur wegen des mechanistischen Zusammenhangs zur Bildung des Fructosylderivats, sondern auch wegen des bei Dialysepatienten erhöhten oxidativen Stresses (Locatelli et al., 2003) war eine solche Beobachtung zu erwarten.

Für CE-Val, die Methylglyoxal-2(1H)-Pyrazinone sowie die Summe dieser drei N-terminalen *Methylglyoxal-AGEs* unterschieden sich die Mittelwerte der Probandengruppen statistisch signifikant. Desweiteren unterschieden sich die Probandengruppen hinsichtlich der CEL-

Gehalte aber nicht der Gehalte von MG-H signifikant. Dieses Ergebnis mit einer geringen Probandenzahl gibt einen ersten Hinweis, dass die Methylglyoxal-AGEs (außer MG-H) des Hämoglobins eine Einschätzung des mittleren Dicarbonylstress über einen längeren Zeitraum ermöglichen können.

#### *Relative und kettenspezifische Glykierung*

Wird der Grad der Derivatisierung in Bezug zur Anzahl der möglichen Derivatisierungsstellen berechnet, ergab sich für Fru-Val ein 9-fach höherer Derivatisierungsgrad als für Fru-Lys und für die Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs ein um Faktor 4 bis 5 höherer Derivatisierungsgrad als für CML. Für den Derivatisierungsgrad der Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs wurde der gleiche Wert wie für CEL bestimmt. Der Derivatisierungsgrad von Arginin zu MG-H war dagegen um Faktor 4 höher, was die hohe Reaktivität des Arginins gegenüber 1,2-Dicarbonylverbindungen bestätigt.

Da die 2(1H)-Pyrazinone die ersten zwei Aminosäuren in ihre Struktur einschließen, können sie auch nach der Hydrolyse mit 6 M Salzsäure den Hämoglobinketten zugeordnet werden. Für das GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon wurde im Vergleich zum GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon ein 5-fach höherer Gehalt bestimmt. Wegen des 10-fach höheren Gehalts des Fructosylvalins an der  $\beta$ -Kette ist ein entsprechend höherer Gehalt nachvollziehbar. Für das MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon wurde ein doppelt so hoher Gehalt wie für das MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon ermittelt, was dem Ergebnis aus den Modellexperimenten unter physiologischen Bedingungen entspricht.

#### *Korrelationen der Gehalte der MRPs der Hämoglobinproben*

Zwischen Fru-Val, Fru-Lys sowie dem HbA<sub>1c</sub>-Wert konnten für die *Kontrollgruppe* keine Korrelationen ermittelt werden. Die CM-Derivate korrelierten mit den Fructosyl-Derivaten, was wegen deren gemeinsamem Bildungsmechanismus zu erwarten war. Die Gehalte von CE-Val und auch die Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs korrelierten signifikant mit Fru-Val, weshalb schon bei Normoglykämikern ein Zusammenhang der intrazellulären Konzentration des Methylglyoxals mit der Glucosekonzentration bestehen könnte. Die Korrelationen zwischen einigen der Glyoxal- und der Methylglyoxal-AGEs könnten aus den jeweiligen Korrelationen mit den Fructosylderivaten oder aus der Verknüpfung der zellulären Abwehr gegen oxidativen Stress und des Glyoxalase-Systems über das reduzierte Glutathion resultieren.

Im Unterschied zur Kontrollgruppe wiesen die Gehalte der Fructosylderivate bei den *Dialysepatienten* eine große Spanne auf und so konnten Korrelationen zwischen Fru-Val, Fru-Lys sowie dem HbA<sub>1c</sub>-Wert ermittelt werden. Unter den Glyoxal-AGEs sowie zwischen den Glyoxal-AGEs und den Fructosylderivaten konnten keine Korrelationen bestimmt werden. Als Ursachen sind ein unterschiedlich stark ausgeprägter oxidativer Stress sowie das verringerte Erythrozytenalter bei den Dialysepatienten zu vermuten. Die N-terminalen Methylglyoxal-AGEs korrelierten untereinander. Für CEL und MG-H konnten dagegen keine Korrelatio-

nen ermittelt werden. Bemerkenswert sind die negativen Korrelationen der Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs mit den Fructosylderivaten. Dieser Zusammenhang könnte entstehen, wenn niedrige Gehalte der Fructosylderivate aus einem verringerten Erythrozytenalter resultieren, das wiederum durch erhöhten oxidativen und Dicarbonylstress bei Urämiakern verursacht wird.

#### 4.4 N-terminale Glykierung in Backwaren

Zur Bildung und zum Vorkommen N-terminaler AGEs in Lebensmitteln ist bisher wenig bekannt. Untersuchungen zum Vorkommen von Carboxyalkylverbindungen in Lebensmitteln stützen sich fast ausschließlich auf die Derivate CML und CEL der Seitenkette des Lysins (Abschnitt 2.2.2). Für eine quantitative Betrachtung bzw. eine Einschätzung der prozessinduzierten Bildung von AGEs in Lebensmitteln ist diese Strategie grundsätzlich sinnvoll, da in den meisten Lebensmitteln der überwiegende Anteil der Aminosäuren in Form langkettiger Proteine vorliegt. Um allerdings die Gesamtgehalte von AGEs in Lebensmitteln besser abschätzen zu können sollten auch N-terminale AGEs berücksichtigt werden. Insbesondere in Lebensmitteln mit einem hohen Anteil freier Aminosäuren und kurzkettiger Peptide könnten N-terminale Carboxyalkylverbindungen und 2(1H)-Pyrazinone quantitativ relevant sein und so zur Gesamt-AGE-Last von Lebensmitteln beitragen. Insbesondere für thermisch stark belastete pflanzliche Lebensmittel konnte die quantitative Relevanz N-terminaler Amadori-Produkte, die Vorstufe von AGEs, nachgewiesen werden (Abschnitt 2.2.1).

2(1H)-Pyrazinone wurden erstmals in Zwischenprodukten der Zuckerherstellung identifiziert (*Prey and Petershofer, 1968*). Zum Vorkommen in Lebensmittelsystemen sind aus der wissenschaftlichen Literatur bisher ausschließlich Modellexperimente bekannt. *Izzo & Ho (1992)* und *Oh et al. (1992)* charakterisierten die Pyrazinone als aromaaktive Verbindungen (Abschnitt 2.2.3).

Darüberhinaus untersuchte *Kunert (2009)* die Bildung von 2(1H)-Pyrazinonen in Backexperimenten. Für die Bildung des Glyoxal-2(1H)-Pyrazinons des Tripeptids Gly-Ala-Phe aus der Reaktion mit Glucose wurde ein pH-Wert von 7,8, ein  $a_w$ -Wert von 0,84 und eine hohe Temperatur als optimale Reaktionsbedingungen ermittelt. Dabei muss aber beachtet werden, dass aus drei Messpunkten mit Hilfe einer Software die optimalen Parameter simuliert wurden. Es wurden Messwerte für die Pyrazinonbildung bei den drei  $a_w$ -Werten 0,17, 0,53 und 0,84 bestimmt. Dabei wurde die höchste Intensität bei  $a_w = 0,84$  an der oberen Grenze des Modells ermittelt. Der optimale  $a_w$ -Wert gilt also nur in den Grenzen des Modells als optimal. Entsprechend modellabhängig muss der optimale pH-Wert betrachtet werden, da die Messwerte bei pH = 7,4 und 8,2 etwa die gleiche Intensität besitzen. Das Optimum bei pH = 7,8 ergibt sich folglich nur aus dem zu Grunde gelegten mathematischen Modell. Die Temperatur wurde mit den Werten 90, 100 und 110 °C variiert und die ermittelte Intensität stieg linear mit der Temperatur. Allgemeiner interpretiert bedeuten diese Ergebnisse, dass ein pH-Wert im

Basischen, ein hoher  $a_w$ -Wert und eine hohe Temperatur günstig für die Pyrazinonbildung waren.

In Modellbrötchen, die einer typischen Rezeptur entsprachen und zusätzlich das Tripeptid Gly-Ala-Phe enthielten, wies *Kunert (2009)* in den Krusten der ungelauten Brötchen ausschließlich das Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinon und in den Krusten gelaugter Brötchen ausschließlich das Methylglyoxal-2(1*H*)-Pyrazinon nach. In den Krumen der Brötchen konnten keine 2(1*H*)-Pyrazinone detektiert werden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte das Ziel der folgenden Experimente sein, weitere Erkenntnisse über die Bildung von 2(1*H*)-Pyrazinonen bzw. N-terminaler AGEs unter Backbedingungen zu gewinnen. Neben den 2(1*H*)-Pyrazinonen wurden die entsprechenden N-terminalen Carboxyalkylderivate quantifiziert um einen besseren Überblick über die Bildung und das Vorkommen N-terminaler AGEs zu gewinnen. Die Rahmenbedingungen, wie sie bei der Herstellung von Backwaren angewendet werden, sind auf Grund hoher Erhitzungstemperaturen und einem hohen Kohlenhydratgehalt gut geeignet, um die AGE-Bildung unter lebensmittelrelevanten Bedingungen zu untersuchen.

#### 4.4.1 Bildung N-terminaler AGEs im Stärke-Peptid-Backmodell

Im Stärke-Peptid-Backmodell wurde die Abhängigkeit des Produktspektrums N-terminaler AGEs vom pH-Wert des Teiges untersucht. Der pH-Wert in Teigen bzw. Backwaren liegt etwa im Bereich von pH = 5 bis 9 und in Sauerteigen kann der pH-Wert bis auf 4 absinken. In Abschnitt 3.3.1 sind pH-Werte handelsüblicher Backwaren angegeben. Für die Backexperimente wurden Teige aus Stärke (8 g), 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (7 ml) und Val-Leu (35  $\mu$ mol), wie in Abschnitt 3.8.1 beschrieben, mit den voreingestellten pH-Werten 5,6, 7,4 und 8,2 hergestellt und erhitzt. Als exemplarischer pH-Wert von Weizenbrötchen und damit im unteren Bereich wurde pH = 5,6 gewählt. pH = 8,2 entspricht dem pH-Wert der Kruste von Laugenbrötchen und repräsentiert den oberen Bereich der pH-Werte von Backwaren. Als mittlerer Wert wurde pH = 7,4 gewählt, was eine abgestufte Bewertung der pH-Abhängigkeit der Produktbildung im Basischen und einen Vergleich zu den experimentellen Ergebnissen unter physiologischen Bedingungen ermöglichen kann.

Um herauszufinden, wie das Produktspektrum N-terminaler AGEs in Backwaren zusammengesetzt ist, wurden einfache Teige aus Weizenstärke hergestellt. Die verwendete Stärke hat den Vorteil weder Proteine noch Aminosäuren zu enthalten, so dass nach Zusatz eines Dipeptids ein definiertes Reaktionssystem entsteht. Der zugesetzte Gehalt des Dipeptids (4,4 mmol/kg Stärke) entsprach in etwa dem Anteil der  $\alpha$ -Aminogruppen freier Aminosäuren bezogen auf den Stärkeanteil in Weizenmehl. Der Gehalt freier Aminosäuren wurde mittels Aminosäureanalyse quantifiziert (*Werner, 2011*). In Weizenmehl sind neben den Aminogruppen freier Aminosäuren weitere reaktive Aminogruppen durch N-terminale Aminogruppen in Peptiden und Proteinen bzw. Seitenketten des Lysins verfügbar.

In wissenschaftlichen Publikationen wurde die Bildung von Dicarbonylverbindungen in Erhitzungsmodellen unter Verwendung von Maltose in Lösung bzw. in Abwesenheit von Wasser untersucht. Wie in Abschnitt 2.1.2.2 beschrieben ist, wurden unterschiedliche Zusammensetzungen der gebildeten Dicarbonylverbindungen gefunden. In dem hier eingesetzten Stärketeig ist zum Anfang der Erhitzung Wasser vorhanden. Doch nach der Erhitzungszeit von 20 Minuten bei 220 °C ist das Wasser vollständig verdampft (Wassergehalt 1,3%) und die Konsistenz entspricht einer Kruste (*Werner, 2011*).

In Erhitzungssystemen mit Wasser wurde 3-DPs als quantitativ wichtigste Dicarbonylverbindung bestimmt und es wurden höhere Gehalte für Glyoxal als Methylglyoxal nachgewiesen. Bei trockener Erhitzung hingegen, war das 1,4-Didesoxyglucoson die quantitativ wichtigste Dicarbonylverbindung und es wurde mehr Methylglyoxal als Glyoxal detektiert (*Hollnagel & Kroh, 2000, 2002*). Das verwendete Stärke-Peptid-Backmodell unterscheidet sich zu den Modellexperimenten von *Hollnagel & Kroh (2000, 2002)* nicht nur in der Auswahl der Temperatur (220 °C statt 100 °C) sondern auch darin, dass es kein abgeschlossenes System ist. So ermöglichte die offene Schale das Entweichen von Wasser und flüchtigen Dicarbonylverbindungen wie Glyoxal und Methylglyoxal.

#### 4.4.1.1 Dicarbonylverbindungen im Stärke-Peptid-Backmodell

Die Teige wurden, wie in Abschnitt 3.8.1 beschrieben, hergestellt und erhitzt. Zur Charakterisierung des Reaktionssystems wurden die im Teig enthaltenen Dicarbonylverbindungen nach Derivatisierung mit OPD quantifiziert (Abschnitt 3.3.10). Mit dieser Methode wurden die freien sowie möglicherweise die reversibel in Schiff'schen Basen gebundenen Dicarbonylverbindungen erfasst.

In Abbildung 4-55 sind die Chromatogramme eines erhitzten Stärketeigs mit bzw. ohne Zusatz des Peptids Val-Leu und ein Chromatogramm der Chinoxalinstandards dargestellt. Es wird ersichtlich, dass aus der Stärke unter den verwendeten Reaktionsbedingungen auch ohne Zusatz des katalytischen Amins (c) vergleichbare Konzentrationen und Verhältnisse der Dicarbonylverbindungen entstanden. 3-DPs ist die quantitativ wichtigste Dicarbonylverbindung. Neben 3-DPs, 3-DG, Glyoxal und Methylglyoxal ist eine große Zahl weiterer Peaks zu erkennen, die auf ein komplexes Spektrum von Chinoxalinen und damit Dicarbonylverbindungen hinweist.

Das Stärke-Peptid-Backmodell kann als Übergangsmodell von einem wasserreichen Zustand am Beginn zu einem trockenen Zustand zum Ende der Erhitzungszeit verstanden werden. Die dominierende Dicarbonylverbindung 3-DPs mit Konzentrationen von 1,6 bis 4,2 mmol/kg Trockenmasse deutet aber darauf hin, dass die Bildung der Dicarbonylverbindungen eher einem Modellsystem in Lösung entspricht.

Die Bildung freier Dicarbonylverbindungen wird durch den pH-Wert beeinflusst (*Martins and van Boekel, 2005*). Deshalb wurden Stärke-Peptid-Teige bei unterschiedlichen pH-Werten

untersucht und nach der Erhitzung die Dicarbonylverbindungen 3-DPs, Glyoxal und Methylglyoxal quantifiziert.

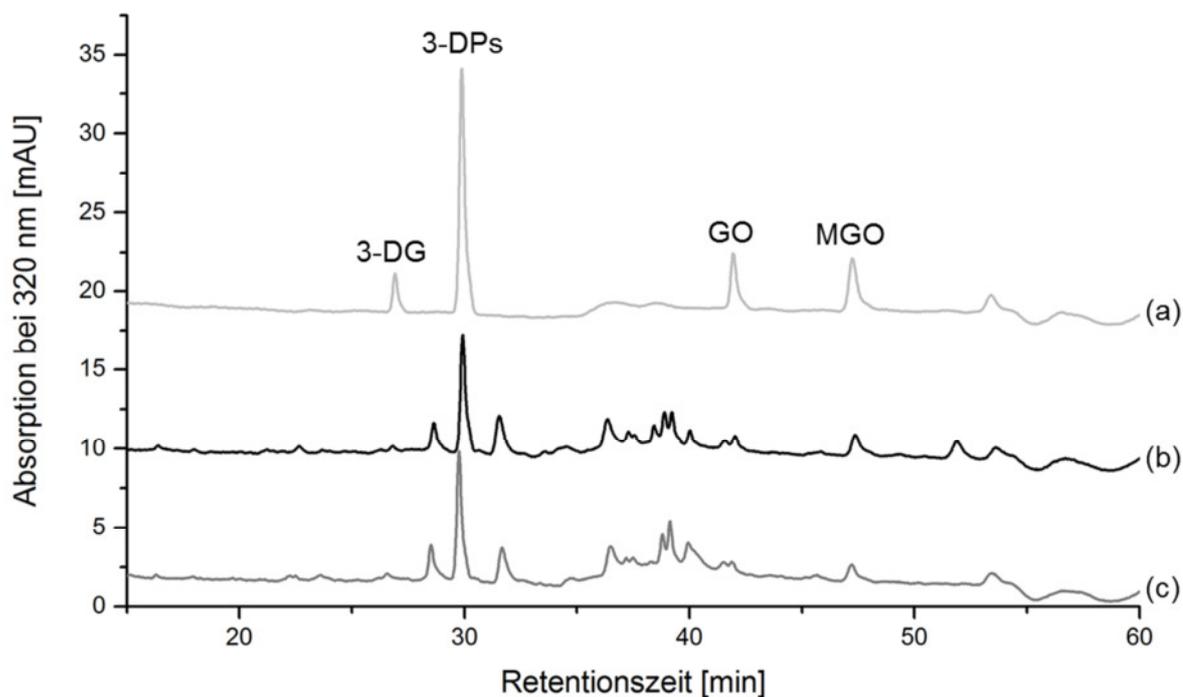


Abbildung 4-55: RP-HPLC-Chromatogramme des Stärke-Peptid-Backmodells (220°C, pH = 7,4, 20 min) detektiert bei 320 nm von (a) Chinoxalinstandards, (b) Stärkekruste mit Zusatz von Val-Leu, (c) Stärkekruste ohne Zusatz von Val-Leu; 3-DG, 3-DPs, GO und MGO entsprechen den Peaks der abgeleiteten Chinoxaline.

Für 3-DPs wurden die höchsten Gehalte bei pH = 5,6 gefunden. Im leicht basischen bei pH = 7,4 bzw. pH = 8,2 lagen die Werte etwas niedriger (Abbildung 4-57, A). Die Bildung von 3-DPs wurde von *Hollnagel & Kroh (2002)* und *Smuda & Glomb (2011)* als eine basisch katalysierte Reaktion nach dem Mechanismus der Retro-Claisen-Reaktion bzw. einer  $\beta$ -Dicarbonylspaltung erklärt (Abbildung 2-5). Die basische Katalyse kann als Ursache gesehen werden, warum die Gehalte in den Proben bei pH = 8,2 höher waren als bei pH = 7,4. Die Bildung bei leicht saurem pH muss über einen modifizierten Reaktionsweg verlaufen.

In Abbildung 4-56 sind zwei mechanistische Vorschläge zur Bildung von 3-DPs im Sauren gezeigt. In Abbildung 4-56 (A) ist eine protonen-katalysierte  $\beta$ -Dicarbonylspaltung formuliert. Dabei erfolgt nach Protonierung des Amins der nukleophile Angriff am C-1 der 1-Imino-3-oxo-Form des 1-Amino-1,4-dideoxyglucosons durch ein Molekül Wasser. Der anschließende Reaktionsschritt zur Spaltung des Moleküls kann durch die Protonierung der Hydroxylgruppe an C-3 erleichtert werden. Aus den Spaltprodukten kann durch Hydrolyse Ameisensäure und durch Oxidation 3-DPs gebildet werden. Der Mechanismus in Abbildung 4-56 (B) verläuft über eine Retro-Aldol-Spaltung, wobei als Reaktionsprodukt statt Ameisensäure Formaldehyd entsteht. Über eine Quantifizierung der Nebenprodukte Ameisensäure bzw. Formaldehyd könnte ermittelt werden, ob einer der beschriebenen Mechanismen im Stärke-Peptid-Backmodell bei Saurem pH-Wert relevant ist.

Der höhere Gehalt des 3-DPs im sauren hängt vermutlich weniger von einer erhöhten Bildung, aber stärker von einer erhöhten Stabilität ab. *Martins & van Boekel (2005)* fanden in Reaktionsansätzen mit Glucose und Glycin mit höherem pH-Wert eine stärkere Bildung von 3-DG und 1-DG, aber auch eine geringere Stabilität. Für Methylglyoxal wurden entsprechend mit höheren pH-Werten stets höhere Gehalte gefunden.

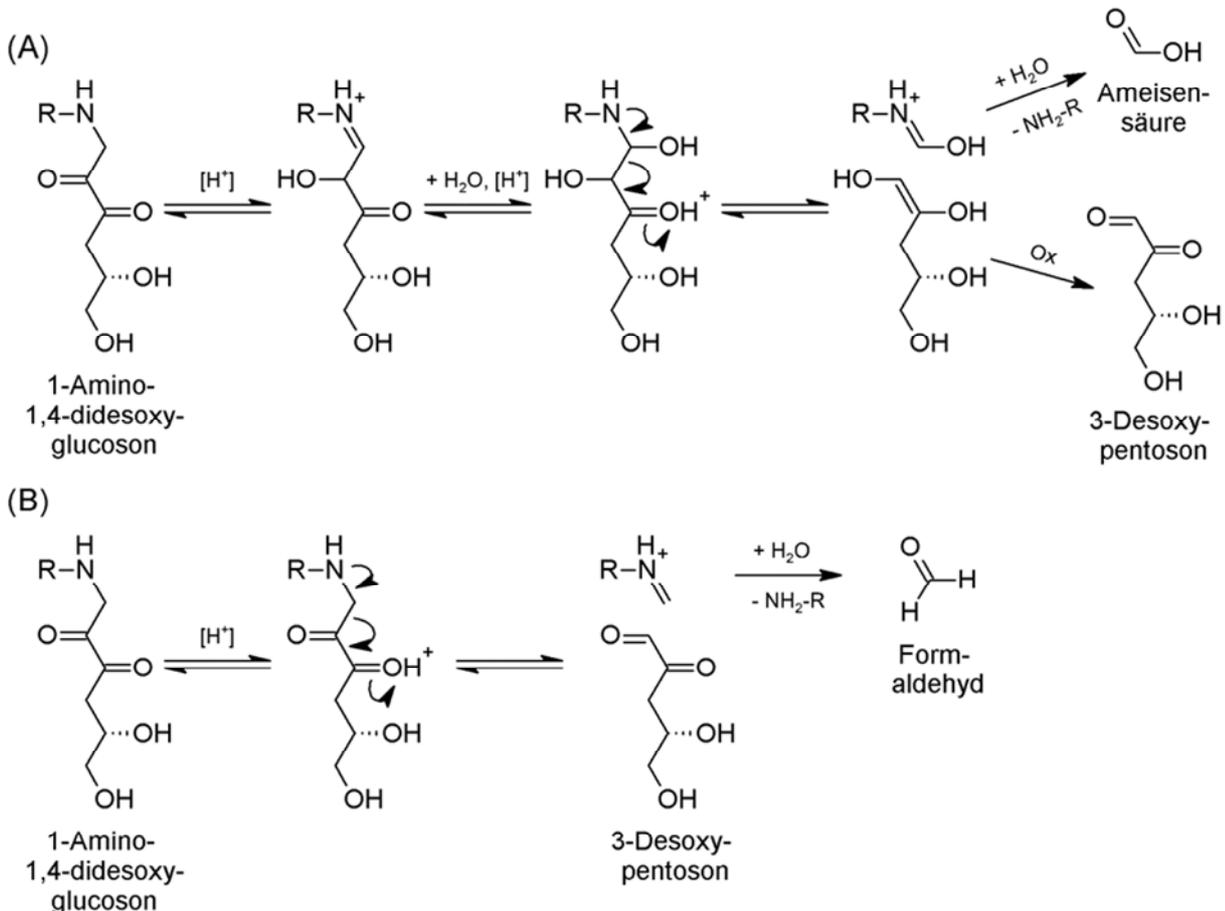


Abbildung 4-56: Bildung von 3-DPs aus dem 1-Amino-1,4-dideoxyglucoson im Sauren; (A) hydrolytische beta-Dicarbonylspaltung; (B) Retro-Aldol-Spaltung

Der höheren Stabilität im Sauren steht ein verstärkter Abbau zu Furfural gegenüber (*Belitz et al., 2008*). Der quantifizierbare Gehalt des Furfurals bei pH = 5,6 lag allerdings nur bei 0,2 mmol/kg Stärkekruste und damit deutlich niedriger als der Gehalt des 3-DPs (*Werner, 2011*). Da Furfural eine flüchtige Verbindung ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass signifikante Anteile in die Gasphase übergegangen und damit verloren waren. Auf Grund des komplexen Produktspektrums, der vielfältigen Abbauewege und der Möglichkeit des Verlusts der flüchtigen Abbauprodukte war eine Bilanzierung hier nicht möglich.

Die Struktur der kurzkettigen Dicarbonylverbindungen Glyoxal und Methylglyoxal unterscheidet sich nur um eine Methylgruppe und die Siedepunkte liegen mit 50 °C für Glyoxal und 72 °C für Methylglyoxal im Vergleich zur Backtemperatur von 220 °C eng beieinander. Deshalb ist zu vermuten, dass die Flüchtigkeit der Verbindungen deren Konzentration im

Reaktionssystem in vergleichbarem Maß verringert und deshalb ihr relatives Verhältnis repräsentativ sein sollte.

Die Graphik in Abbildung 4-57 zeigt, dass für Glyoxal und Methylglyoxal mit höherem pH-Wert höhere Gehalte ermittelt wurden. Insbesondere für Glyoxal scheint aber entscheidend begünstigend zu sein, dass der pH-Wert im Basischen liegt, da die Gehalte von pH = 7,4 zu pH = 8,2 nicht weiter anstiegen. Die höheren Gehalte von Methylglyoxal um Faktor 1,5 bis 2 in Bezug auf Glyoxal belegen, dass ein Mischsystem im Vergleich zu den Modellen von *Hollnagel & Kroh (2000, 2002)* vorlag. Da im wasserhaltigen System 3-DPs als quantitativ wichtigste Dicarbonylverbindung gefunden wurde, aber höhere Gehalte für Glyoxal im Vergleich zu Methylglyoxal detektiert wurden.

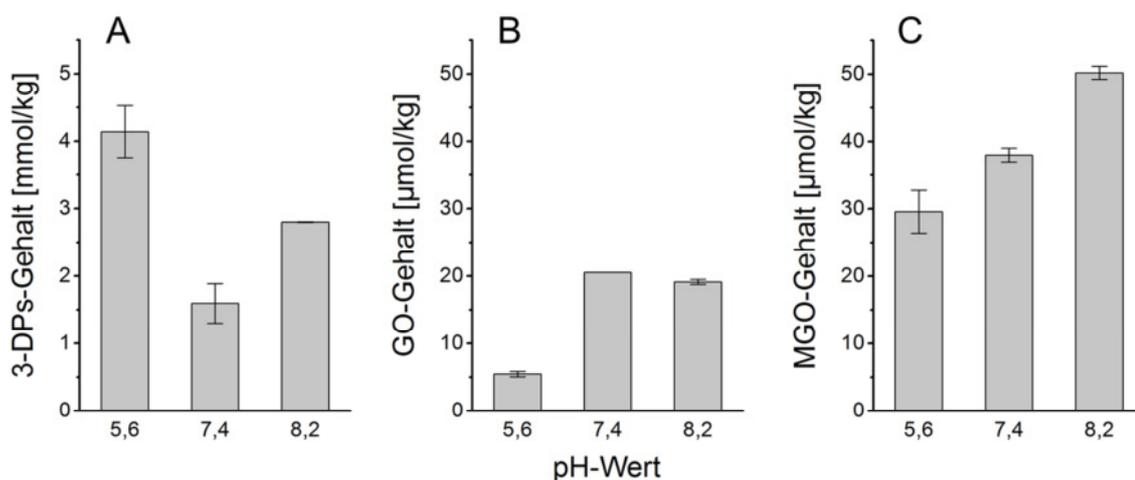


Abbildung 4-57: Gehalte von 3-DPs (A), Glyoxal (B) und Methylglyoxal (C) in Stärkekrusten in Abhängigkeit vom pH-Wert

#### 4.4.1.2 Quantifizierung N-terminaler AGEs in Stärkekrusten

Die Quantifizierung der Pyrazinone erfolgte wie in Abschnitt 3.3.13 beschrieben über die Intensität des UV-Signals bei 320 nm. Zur Zuordnung der Peaks wurde zusätzlich die für Pyrazinone charakteristische Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$ ) aufgezeichnet. In Abbildung 4-58 sind exemplarisch die Chromatogramme eines GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinonstandards (a), einer Stärkekruste mit zugesetztem Val-Leu (b) und einer Stärkekruste ohne Zusatz von Val-Leu (c) bei  $\lambda = 320 \text{ nm}$  dargestellt. In der Inkubationsprobe ohne Zusatz des Dipeptids (c) konnten die Val-Leu-2(1H)-Pyrazinone nicht detektiert werden.

Da für das MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon kein Referenzstandard zur Verfügung stand, wurde dieses über die Kalibrierung des GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons quantifiziert. Die beiden Pyrazinone unterscheiden sich ausschließlich durch eine Methylgruppe, so dass sich deren molare Extinktionskoeffizienten nur minimal unterscheiden sollten. *Krause et al. (2004)* gaben für das GO-2(1H)-Pyrazinon des Tripeptids Gly-Ala-Phe einen molaren Extinktionskoeffizienten von  $49001 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  bei dem UV-Maximum  $\lambda_{\text{UV, max}} = 322 \text{ nm}$  und für das MGO-2(1H)-Pyrazinon des gleichen Peptids einen molaren Extinktionskoeffizienten

von  $46001 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  bei dem UV-Maximum  $\lambda_{\text{UV, max}} = 336 \text{ nm}$  an. Da die UV-Maxima nicht weit auseinander liegen und breit sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Quantifizierung des MGO-2(1*H*)-Pyrazinons über die Kalibrierung des entsprechenden GO-2(1*H*)-Pyrazinons nur zu einer geringen Unterschätzung führt. Die Identität der untersuchten Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinone wurde zusätzlich mittels LC-MS/MS überprüft (Abbildung 4-59).

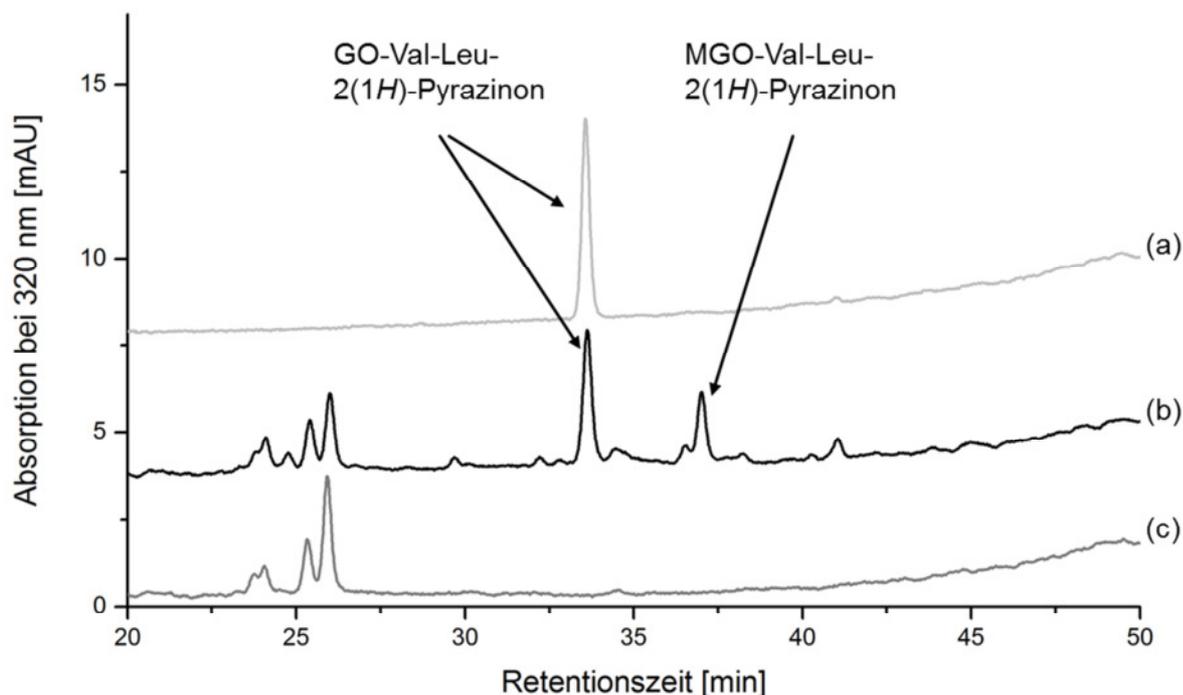


Abbildung 4-58: RP-HPLC-Chromatogramme des Stärke-Peptid-Backmodells ( $220^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ , 20 min) detektiert bei  $\lambda = 320 \text{ nm}$  von (a) GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon-Standard, (b) Stärkekruste mit Zusatz von Val-Leu, (c) Stärkekruste ohne Zusatz von Val-Leu.

In Abbildung 4-59 sind die LC-MS/MS-Chromatogramme einer Stärkekruste mit und ohne Zusatz von Val-Leu dargestellt. Als N-terminale AGEs wurden CM-Val-Leu, CE-Val-Leu, das GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon und MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon detektiert. Zur Bestätigung der Identität wurden Standardadditionsexperimente durch Zusatz der synthetisierten und charakterisierten Referenzstandards durchgeführt. In Abbildung 4-59 ist die entsprechende Zunahme der Peakflächen zu sehen. Eine Ausnahme ist das MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon, für das kein Standard zur Verfügung stand, weshalb keine Zunahme der Peakfläche zu erkennen ist. Die AGEs konnten ausschließlich in der Probe mit Peptidzusatz detektiert werden. Mit der LC-MS/MS-Methode wurden CM-Val-Leu und CE-Val-Leu wie in Abschnitt 3.3.11 beschrieben mittels authentischer Kalibrierstandards quantifiziert.

Die verwendeten Massenübergänge sind charakteristisch für die Substanzgruppen. Bei CM-Val-Leu und CE-Val-Leu entspricht der Massenverlust von  $m/z = 159$  einer typischen Peptidfragmentierung mit Abspaltung von CO-Leu. Der weitere Verlust von  $m/z = 46$  entspricht er Abspaltung von HCOOH aus der eingeführten Carboxylgruppe des Carboxylalkylprodukts. Bei den 2(1*H*)-Pyrazinonen kann der Massenverlust von  $m/z = 44$  mit der Decarboxylierung (Abspaltung von  $\text{CO}_2$ ) am C-Terminus des ursprünglichen Dipeptids

erklärt werden. Der Masseverlust von  $m/z = 116$  entspricht der Abspaltung der kompletten Kohlenstoffkette der zweiten Aminosäure des Dipeptids unter Erhalt der Pyrazinongrundstruktur, in der der Aminostickstoff der zweiten Aminosäure zurückbleibt (in diesem Beispiel:  $131 (\text{Leu}) - 15 (-\text{NH}_2) = 116$ ). Durch die Verwendung der charakteristischen Massenübergänge konnte das MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon auch ohne Referenzstandard eindeutig zugeordnet werden. Die beschriebenen Massenübergänge sind in Abbildung 4-60 als Formelschema dargestellt.

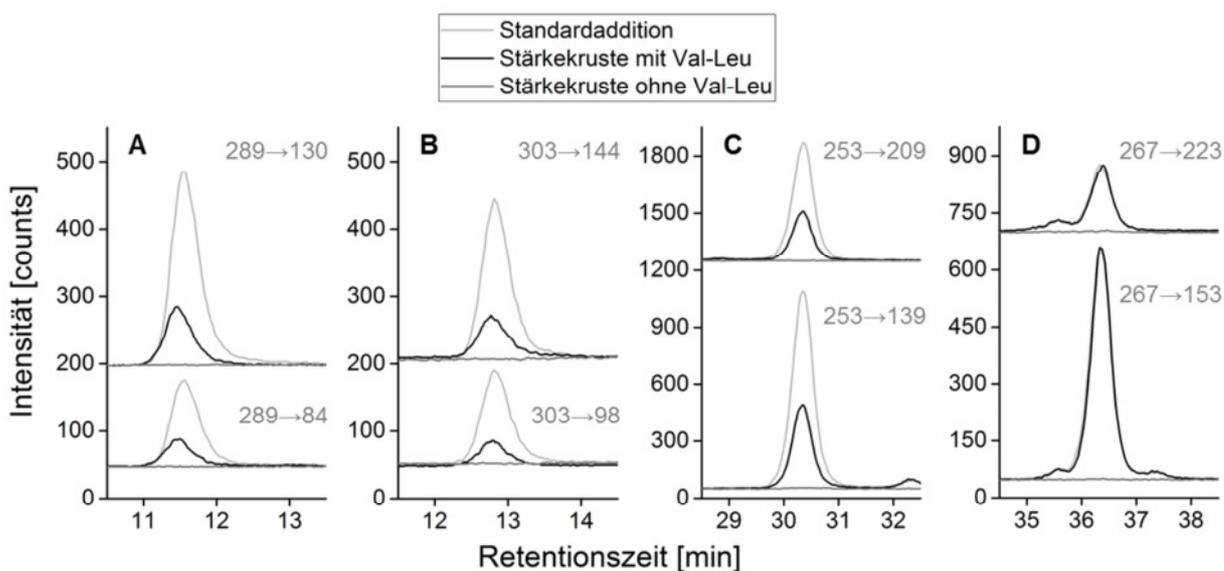


Abbildung 4-59: LC-MS/MS-Chromatogramme zur Identifizierung N-terminaler AGEs im Stärke-Peptid-Backmodell (220°C, pH = 7,4); zwei charakteristische Massenübergänge jedes Analyten in einer Stärkekruste mit Val-Leu, einer Stärkekruste ohne Val-Leu und einer Standardadditionsprobe nach Zusatz des jeweiligen authentischen Referenzstandards zu der Probe mit Val-Leu (außer D); A – CM-Val-Leu, B – CE-Val-Leu, C – GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon, D – MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die zwei nebeneinander auftretenden vom Methylglyoxal abgeleiteten Pyrazinone weder chromatographisch, noch über ihre Fragmentierung in der Massendetektion unterschieden werden konnten. Alle quantitativen Angaben in dieser Arbeit sind als Summe des 5-Methyl- und des 6-Methyl-2(1*H*)-pyrazinons zu verstehen.

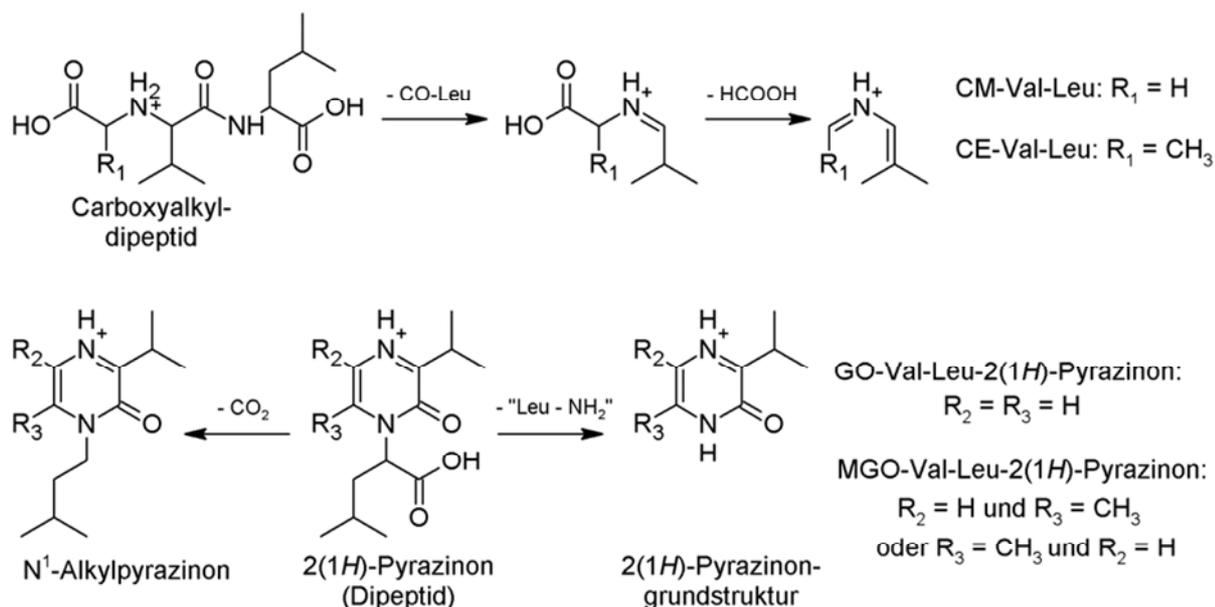


Abbildung 4-60: Interpretation der charakteristischen Massenübergänge von N-terminalen Dipeptid-AGEs (oben: Carboxyalkyldipeptid, unten: 2(1H)-Pyrazinon) in der ESI-MS/MS-Detektion am Beispiel von Val-Leu

#### 4.4.1.3 Gehalte N-terminaler AGEs in Stärkekrusten

In Abbildung 4-61 sind die Gehalte der N-terminalen AGEs von Val-Leu in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Sowohl die von Glyoxal bzw. Methylglyoxal abgeleiteten 2(1H)-Pyrazinone als auch die entsprechenden N-terminalen CM- und CE-Derivate konnten nach Umsetzung des Dipeptids mit Stärke unter Backbedingungen nachgewiesen werden.

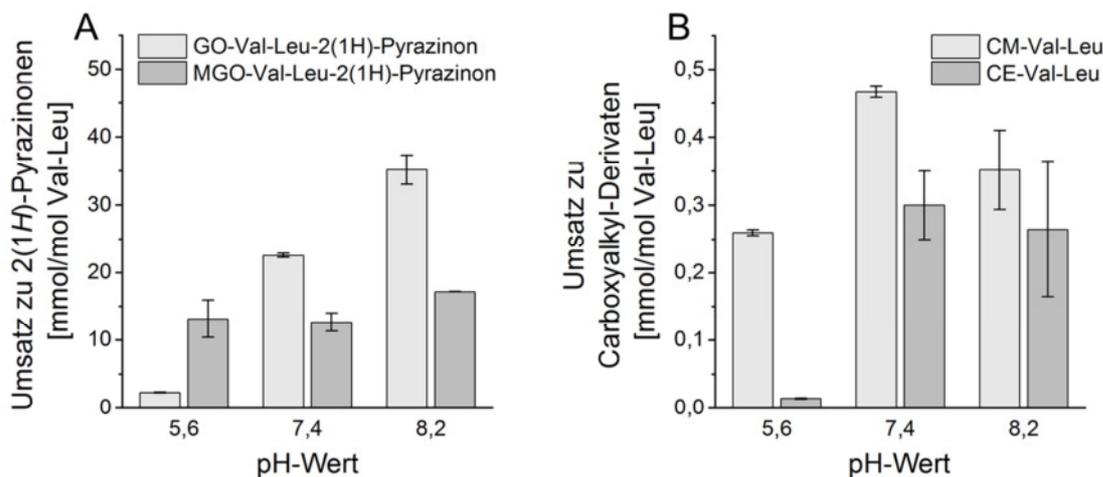


Abbildung 4-61: Gehalte der Glyoxal- und Methylglyoxal-AGEs (A: GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinone und MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinone; B: CM-Val-Leu und CE-Val-Leu) im Stärke-Peptid-Backmodell in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die pH-abhängige Bildung der vier betrachteten AGEs zeigt, dass wie schon bei Glyoxal und Methylglyoxal tendenziell höhere Gehalte bei basischen pH-Werten gebildet wurden. Weiterhin zeigte sich, dass für die 2(1H)-Pyrazinone unter den eingesetzten Reaktionsbedingungen je nach pH-Wert etwa 10- bis 100-fach höhere Gehalte als für die entsprechenden CM- und

CE-Derivate bestimmt werden konnten. Diese Beobachtung führt zu der Erkenntnis, dass die Bildung von Pyrazinonstrukturen an N-Termini von Peptiden und Proteinen unter Backbedingungen gegenüber Carboxyalkylverbindungen deutlich bevorzugt sein kann. Der Umsatz von Val-Leu zu den 2(1*H*)-Pyrazinonen liegt in Summe bei 1 bis 5%. Zum Vergleich konnte *Kunert (2009)* in Krusten von Brötchen einen Umsatz von zugesetzten Tripeptiden von 0,1 bis maximal 3% beobachten. Die Umsätze im Stärke-Peptid-Backmodell sind damit als relativ hoch, aber plausibel einzuschätzen.

Wie in Abschnitt 2.1.3.2 und 2.1.3.3 beschrieben ist, unterscheiden sich die Bildungswege von Glyoxal- und Methylglyoxal-AGEs erheblich. Trotzdem konnten in dem untersuchten Backmodell für die freien Dicarbonylverbindungen sowie für die jeweils abgeleiteten Pyrazinone und Carboxyalkylderivate Gehalte in den gleichen Größenordnungen detektiert werden. Dass trotz höherer Gehalte für Methylglyoxal niedrigere Gehalte der Methylglyoxal-AGEs als der Glyoxal-AGEs ermittelt wurden, kann beispielsweise mit der höheren Reaktivität des Glyoxals (*Krause, 2005*) oder der direkten Bildung des Iminoglyoxals aus dem Glycosyl-Amin oder dem Amadori-Produkt (Abschnitte 2.1.3.2 bzw. 2.1.3.3) erklärt werden.

Tabelle 4-18: Gehalte N-terminaler AGEs in Stärkekrusten in Abhängigkeit vom pH-Wert

AGEs	pH-Wert					
	5,6	7,4	8,2	5,6	7,4	8,2
	[μmol/kg Stärkekruste] <sup>#</sup>			[mg/kg Stärkekruste] <sup>#</sup>		
GO-Val-Leu-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinon	11	109	169	2,8	27,4	42,8
MGO-Val-Leu-2(1 <i>H</i> )-Pyrazinon	63	61	83	16,9	16,2	22,0
CM-Val-Leu	1,3	2,3	1,7	0,4	0,7	0,5
CE-Val-Leu	0,1	1,5	1,3	0,1	0,4	0,4

<sup>#</sup>Mittelwert aus einer Doppelbestimmung.

Die im Vergleich zu den AGEs geringe Konzentration der Dicarbonylverbindungen Glyoxal und Methylglyoxal in den Stärkekrusten kann darauf hinweisen, dass die Bildungswege der AGEs nur nebenrangig über die freien, kurzkettigen Dicarbonylverbindungen als direkte Precursoren verliefen. So wurde bei pH = 7,4 für Glyoxal ein Gehalt von  $20,5 \pm 0,1$  μmol/kg Trockenmasse und für das GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon von  $108,6 \pm 1,5$  μmol/kg Trockenmasse ermittelt.

In Tabelle 4-18 sind die Gehalte der N-terminalen AGEs in den Stärkekrusten in mg/kg angegeben. Damit wird ein Vergleich mit den Gehalten von CML und CEL in Lebensmitteln (Abschnitt 2.2.2.1 bzw. Tabelle 2-4) möglich. In Backwaren wurden Gehalte für CML im Bereich von 10 bis 90 mg/kg und für CEL von 5 bis 15 mg/kg ermittelt. Ein Vergleich mit den Gehalten der N-terminalen AGEs in den Stärkekrusten zeigt, dass N-terminale AGEs in Backwaren und vermutlich so auch in anderen Lebensmitteln in der gleichen Größenordnung erwartet werden können. Die eingesetzten Gehalte von Val-Leu in den Stärkekrusten entsprechen dem molaren Gehalt freier Aminosäuren in Weizenmehl (Abschnitt 4.4.1). Damit blieben die N-α-Aminogruppen der Proteine und Peptide unberücksichtigt. Die Größenord-

nung der Gehalte der N-terminalen AGEs in den Stärkekrusten könnte folglich die Gehalte in Backwaren noch unterschätzen.

#### 4.4.1.4 Abhängigkeit der Bildung der Glyoxal-AGEs vom pH-Wert

Die Bildung des GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinons war höher mit höherem pH-Wert. Die Gehalte von CM-Val-Leu waren bei pH = 7,4 höher als bei pH = 5,6, aber bei pH = 8,2 wieder etwas geringer. Die Bildung von CM-Val-Leu zeigte damit eine vergleichbare Abhängigkeit vom pH-Wert wie die Bildung von freiem Glyoxal (Abbildung 4-57). Entgegen dieser geringeren Produktbildung bei pH = 8,2 im Vergleich zu pH = 7,4 wurde für das GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon ein deutlicher Anstieg ermittelt. Das bedeutet, dass zwei Effekte diskutiert werden können. Einerseits war die Bildung der AGEs in Summe im Basischen grundsätzlich begünstigt. Als Begründung dient hier die im Basischen stärkere Bildung und geringere Stabilität des Amadori-Produkts (Abschnitt 2.1.1.6) sowie die höhere Neigung von C-6- und C-5-Dicarbonylverbindungen zur Fragmentierung (Abschnitt 2.1.2). Andererseits war mit zunehmend basischem Milieu die Bildung des 2(1*H*)-Pyrazinons gegenüber der Bildung des Carboxyalkylderivats und von freiem Glyoxal bevorzugt.

Eine mechanistische Betrachtung der Bildungswege führt unweigerlich über den von *Hollnagel & Kroh (2000)* aufgestellten Peeling-off-Mechanismus (Abbildung 2-4). Die zentrale Zwischenverbindung ist das 1-Amino-1,4-didesoxyglucoson. Die Triebkraft deren Bildung aus Oligosacchariden ist in der guten Abgangsgruppe an C-4 zu sehen.

Aus dem 1-Amino-1,4-didesoxyglucoson können über die 1-Imino-Form das Iminoglyoxal als Übergangsverbindung (Abbildung 4-62) oder über die oxidative  $\alpha$ -Spaltung direkt CM-Derivate (*Davidsek et al., 2006b*) entstehen. Aus dem Iminoglyoxal kann durch Zyklisierung ein GO-2(1*H*)-Pyrazinon (Abbildung 2-13) bzw. über die Mechanismen der Cannizarro-Reaktion (Abbildung 2-10: e) oder mittels Hydratisierung und Enolisierung das CM-Derivat gebildet werden (Abbildung 2-10: d). In den jeweiligen Mechanismen zur Bildung der N-terminalen Glyoxal-AGEs ausgehend vom Iminoglyoxal sind Tautomerisierungsschritte nötig. Deshalb kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass diese im basischen katalysiert sein können. Entsprechend konnte *Krause (2005)* bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Reaktion eines Tripeptids mit Glyoxal deutlich höhere Umsätze des Peptids im Basischen finden.

Der Bildungsweg über das Iminoglyoxal als gemeinsames Intermediat zu den beiden AGEs legt nahe, dass die verringerte Bildung von CM-Val-Leu bei pH = 8,2 und die gleichzeitig erhöhte Bildung des GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinons in direktem Zusammenhang stehen. Da aus dem Iminoglyoxal Glyoxal hydrolytisch freigesetzt werden kann, wäre der geringere Gehalt von Glyoxal (Abbildung 4-57) ebenfalls über die erhöhte Bildung des GO-2(1*H*)-Pyrazinons bei pH = 8,2 erklärbar. Mit zunehmend basischem pH-Wert scheint also der Umsatz des Iminoglyoxals zum GO-2(1*H*)-Pyrazinon gegenüber der Bildung des CM-Derivats und des freien Glyoxals bevorzugt zu sein (Abbildung 4-64).

Die geringere Bildung von Glyoxal, CM-Val-Leu und GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon bei pH = 5,6 steht vermutlich mit der höheren Bildung von 3-DPs im Sauren in Verbindung, da sowohl das Iminoglyoxal (Abbildung 4-62) als auch das 3-DPs (Abbildung 4-56) aus dem 1-Amino-1,4-dideoxyglucoson entstehen. Aus 3-DPs können Glyoxal und Glyoxal-AGEs nicht direkt gebildet werden.

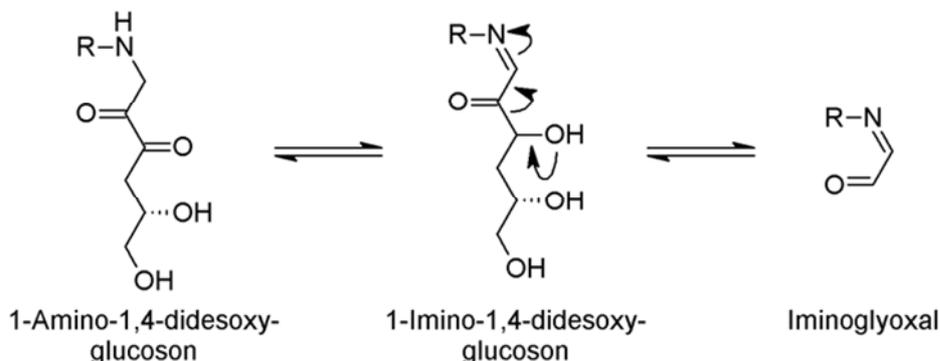


Abbildung 4-62: Bildung von Iminoglyoxal durch Retro-Aldol-Spaltung der 1-Imino-2-Oxo-3-Hydroxy-Form des 1-Amino-1,4-dideoxyglucosons in Anlehnung an *Hofmann et al. (1999)*.

#### 4.4.1.5 Abhängigkeit der Bildung der Methylglyoxal-AGEs vom pH-Wert

Für das MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon wurden im Stärke-Peptid-Backmodell vergleichbare Gehalte bei pH = 5,6 und 7,4 gefunden. Bei pH = 8,2 wurden noch etwas höhere Gehalte quantifiziert (Abbildung 4-61: A). Die Gehalte von CE-Val-Leu waren im Basischen höher als im Sauren und bei pH = 8,2 etwas geringer als bei pH = 7,4, was der pH-Abhängigkeit der Bildung von CM-Val-Leu entspricht. Bei CE-Val-Leu fielen aber die Gehalte bei pH = 5,6 besonders gering aus (Abbildung 4-61: B). Die Summe der Gehalte der Methylglyoxal-AGEs zeigte eine vergleichbare pH-Abhängigkeit wie die Gehalte von Methylglyoxal, die mit höherem pH-Wert höher waren (Abbildung 4-57). Um die pH-Abhängigkeit der Bildung der Methylglyoxal-AGEs und speziell die besonders geringe Bildung des CE-Derivats im Sauren zu diskutieren, können unterschiedliche mechanistische Varianten betrachtet werden.

Wie bereits in Abbildung 2-5 und Abbildung 4-56 beschrieben wurde, kann aus 1-Amino-1,4-dideoxyglucoson das 3-DPs gebildet werden. Erfolgt anschließend an einer der Carbonylfunktionen des 3-DPs ein nukleophiler Angriff durch ein Amin, ist nach Retro-Aldol-Spaltung zwischen C-3 und C-4 die Bildung des 1- oder des 2-Iminomethylglyoxals möglich (Abbildung 4-63). Genau wie nach der Reaktion von freiem Methylglyoxal mit einem Amin (Abbildung 4-44) können dann aus 1-Iminomethylglyoxal das 6-Methyl-2(1*H*)-pyrazinon bzw. aus 2-Iminomethylglyoxal das 5-Methyl-2(1*H*)-pyrazinon sowie das CE-Peptid entstehen.

Da die Bildung von 3-DPs als quantitativ wichtigste, freie Dicarbonylverbindung gezeigt werden konnte (Abbildung 4-55), ist die Bildung der Methylglyoxal-AGEs über diesen Weg wahrscheinlich. Die höchsten Gehalte für 3-DPs wurden bei pH = 5,6 gefunden. Die Summe

der Gehalte der Methylglyoxal-AGEs war im leicht Sauren zwar nicht entsprechend höher als im Basischen, aber es konnte auch keine geringere Produktbildung wie für die Glyoxal-AGEs beobachtet werden (Abbildung 4-61). Eine geringere Produktbildung im Sauren kann über eine langsamere Fragmentierung der Kohlenhydratkette erklärt werden, da die Keto-Enol-Tautomerie als wichtiger Reaktionsschritt im Basischen katalysiert wird. Vermutlich wurde die potentiell geringere Bildung der Methylglyoxal-AGEs im Sauren durch eine höhere Verfügbarkeit von 3-DPs kompensiert.

Zur Diskussion der deutlich niedrigeren Gehalte von CE-Val-Leu unter sauren Reaktionsbedingungen können zwei Reaktionsschritte berücksichtigt werden. Erstens kann die Bildung des CE-Derivats durch eine pH-Abhängigkeit der Bildung des 1- bzw. des 2-Iminomethylglyoxals beeinflusst werden, da CE-Val-Leu nur aus dem 2-Iminomethylglyoxal entstehen kann (Abbildung 4-63).

Ausgehend von der Reaktion mit 3-DPs könnte im Sauren die Ketofunktion an C-2 des 3-DPs wegen der höheren Verfügbarkeit von Protonen stärker hydratisiert vorliegen und so zu einem geringeren Teil für einen nukleophilen Angriff durch die Aminogruppe von Val-Leu zur Verfügung stehen. Dadurch könnte sich das Verhältnis von 1- zu 2-Iminomethylglyoxal hin zu 1-Iminomethylglyoxal verschieben.

Ein alternativer Bildungsweg im Sauren könnte direkt von dem am reduzierenden Ende der Polysaccharidkette gebundenen Imin (Schiff'sche) ausgehen. Im Sauren könnte die Dehydratisierung an C-3 gegenüber der nach dem Peeling-off-Mechanismus zu erwartenden Abspaltung der Saccharidkette an C-4 einen größeren Anteil bekommen. Dabei kann aus dem 1,2-Enaminol durch Dehydratisierung an C-3 peptidgebundenen 3-DG (mit Polysaccharidrest an C-4) entstehen, im zweiten Schritt die Retro-Aldol-Spaltung zwischen C-3 und C-4 erfolgen und das 1-Iminomethylglyoxal formuliert werden (Abbildung 2-3: A).

Zweitens ist vermutlich auch die Bildung des CE-Derivats und des 5-Methyl-2(1*H*)-Pyrazinons aus dem 2-Iminomethylglyoxal pH-abhängig (Abbildung 4-63). Da sowohl für die Zyklisierung zum 2(1*H*)-Pyrazinon (Abbildung 2-13) als auch für die Reaktion zum Carboxyalkylderivat über Hydratisierung und Enolisierung bzw. die Cannizarro-Reaktion (Abbildung 2-10: e, d) eine Katalyse durch Hydroxidionen bzw. Basen beschrieben werden kann, ist schwer einzuschätzen, ob die sauren Reaktionsbedingungen die Bildung des CE-Derivats stärker beeinträchtigen. Allerdings wurde für die Bildung von CM-Val-Leu und des GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinons genau die gegenteilige Tendenz beobachtet. Das Verhältnis der Gehalte der beiden Derivate ergab eine vergleichsweise höhere Bildung des CM-Derivats im Sauren als im Basischen.

Damit kann wegen des deutlich geringeren Gehalts von CE-Val-Leu und des gleich großen Gehalts der Methylglyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone im Sauren wie im Basischen vermutet werden, dass die pH-Abhängigkeit des Verhältnisses von 1- zu 2-Iminomethylglyoxal die entscheidende Ursache ist.

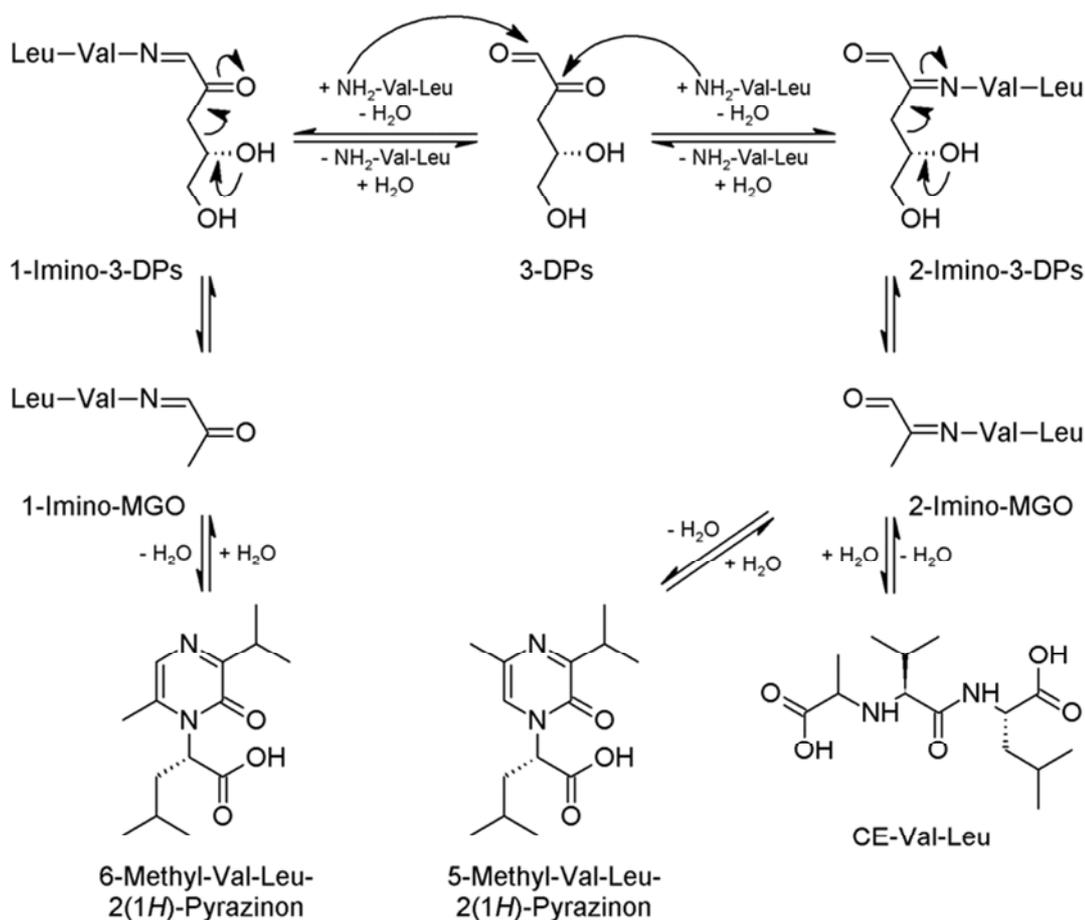


Abbildung 4-63: Bildung des 6-Methyl- bzw. 5-Methyl-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinons sowie von CE-Val-Leu aus der Reaktion von Val-Leu mit 3-DPs

#### 4.4.1.6 Einfluss der Verfügbarkeit von Wasser auf die Anteile der von Glyoxal bzw. Methylglyoxal abgeleiteten AGEs

Unabhängig vom Einfluss des pH-Werts fallen die grundsätzlich höheren Gehalte der 2(1H)-Pyrazinone im Vergleich zu den entsprechenden Carboxyalkylderivaten in einer Größenordnung von Faktor 10 bis 100 auf. Dieser Effekt lässt sich möglicherweise durch die überwiegend trockenen Reaktionsbedingungen mit zunehmender Reaktionszeit erklären. Wie in Abbildung 4-64 und Abbildung 4-63 dargestellt ist, ist für die Bildung des CM- bzw. CE-Derivats aus dem Iminoglyoxal bzw. 2-Iminomethylglyoxal ein Molekül Wasser nötig, wogegen bei der Bildung der 2(1H)-Pyrazinone ein Molekül Wasser frei wird.

Ein Beleg für diese mechanistische Erklärung ist der Vergleich der Verteilung der GO-AGEs im Backmodell mit der Inkubation von Val-Leu mit Glyoxal unter physiologischen Bedingungen (Abschnitt 4.2.2). Es zeigt sich, dass im Backmodell bei  $\text{pH} = 7,4$  um Faktor 40 höhere Gehalte des Pyrazinons im Vergleich zum CM-Derivat gebildet wurden, aber das GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon und das CM-Val-Leu in Lösung bei  $\text{pH} = 7,4$  und milder Temperatur in gleichen Gehalten entstanden.

Mit der gleichen Argumentation lässt sich begründen, warum vermutlich nur geringe Mengen des Glyoxals aus dem Iminoglyoxal bzw. des Methylglyoxals aus 1- und 2-Iminomethylglyoxal frei wurden. Auch für die Hydrolyse ist Wasser notwendig.

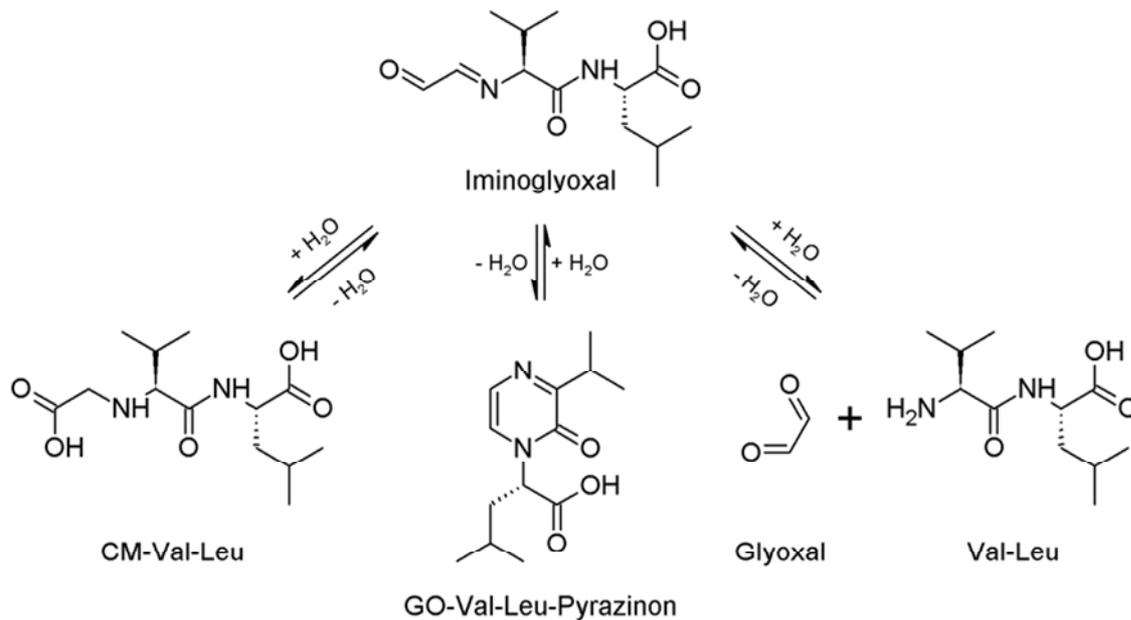


Abbildung 4-64: Bildung von CM-Val-Leu, GO-Val-Leu-Pyrazinon und freien Glyoxals aus dem Iminoglyoxal

#### 4.4.1.7 Fazit aus dem Stärke-Peptid-Backmodell

Die Erkenntnis von *Kunert (2009)* aus den Modellexperimenten mit einem Tripeptid und Glucose bei definiertem  $a_w$ -Wert, dass ein basischer pH-Wert die Bildung des Glyoxal-2(1H)-Pyrazinons befördert, konnte auch im Stärke-Peptid-Backmodell bestätigt werden. Zusätzlich wurde der gleiche Effekt auf die Bildung des Methylglyoxal-2(1H)-Pyrazinons nachgewiesen.

Das Ergebnis von *Kunert (2009)* aus Experimenten mit Backwaren, dass in der Kruste von gelaugten Brötchen ausschließlich das Methylglyoxal-2(1H)-Pyrazinon und in der Kruste des ungelauhten Brötchens ausschließlich das Glyoxal-2(1H)-Pyrazinon detektierbar waren, kann mit diesem Experiment nicht belegt werden, da beide Pyrazinone bei allen pH-Werten in Konzentrationen der gleichen Größenordnung quantifiziert wurden. Die Beobachtung von *Kunert (2009)* ist möglicherweise auf Unterschiede in den Bildungswegen der Precusoren zurückzuführen, da die Brötchen aus Hefeteig und damit einem deutlich komplexeren System bestanden.

In diesem Abschnitt zur Untersuchung des Einflusses des pH-Werts auf die Bildung der N-terminalen AGEs im Stärke-Peptid-Backmodell wurde postuliert, dass die Verfügbarkeit von Wasser für die Anteile der 2(1H)-Pyrazinone bzw. Carboxyalkylderivate entscheidend ist. Diesem mechanistischen Vorschlag soll im folgenden Abschnitt in einem alternativ konzipierten Modell nachgegangen werden.

#### 4.4.2 Bildung N-terminaler MRPs im Glucose-Peptid-Backmodell

Um weitere Erkenntnisse zur Bildung N-terminaler Maillard-Produkte unter Backbedingungen zu gewinnen, wurden ein Krumen- und ein Krustenmodell eingesetzt (Abschnitt 3.8.2). Mit den zwei Modellen sollte genauer darauf eingegangen werden, welchen Einfluss die Verfügbarkeit von Wasser auf die Bildung der N-terminalen Amadori-Produkte und die von Glyoxal abgeleiteten N-terminalen AGEs hat. Dabei wurde jeweils die gleiche Mischung aus Glucose (5  $\mu\text{mol}$ ), Peptid (5  $\mu\text{mol}$ ), mikrokristalliner Cellulose (0,5 g) und 0,1 M Natriumphosphatpuffer (1 mL, pH = 5,6) verwendet. Der pH-Wert 5,6 wurde gewählt, weil er sowohl dem pH-Wert der Krume als auch der Kruste einer Backware auf Basis von Weizenmehl und Hefe (Brötchen, Weißbrot) entspricht (Abschnitt 3.3.1).

Das eine Modell sollte den Bedingungen in der Krume ähneln, weshalb in einem abgeschlossenen Gefäß erhitzt wurde. Dadurch war trotz einer Erhitzungstemperatur von 100 °C und 40 Minuten Erhitzungszeit stets Wasser verfügbar. Die Konsistenz ähnelte dabei einem Teig. Das zweite Modell bestand aus den gleichen Komponenten, nur dass das Wasser aus der Probe nach Vermischung der Bestandteile und vor der Inkubation mittels Gefriertrocknung entfernt wurde und soll den Erhitzungsbedingungen der Krustenoberfläche in einem Backprozess entsprechen. Die Erhitzung erfolgte in einem offenen Gefäß für 40 Minuten bei 120 °C, der Oberflächentemperatur eines Brötchens bei einer Backofentemperatur von ca. 180 °C (Müller, 2012).

Die mikrokristalline Cellulose wurde eingesetzt um eine Teigartige Konsistenz zu erhalten. Cellulose ist ein verhältnismäßig unreaktives Polysaccharid (Kunert, 2009), aber es kann nicht ausgeschlossen werden, dass reaktive Dicarbonylverbindungen freigesetzt werden bzw. die reduzierenden Enden ebenfalls mit den Dipeptiden reagieren können und damit die Gehalte der detektierbaren MRPs beeinflusst werden.

Da schon Kunert (2009) in Backexperimenten z.T. deutliche Unterschiede in der Produktbildung von Pyrazinonen an den zwei Tripeptiden Gly-Ala-Phe und Phe-Gly-Gly quantifizieren konnte (Faktor 10), wurden die Backexperimente im Glucose-Peptid-Backmodell mit den fünf Dipeptiden Val-Leu, Val-His, Val-Ser, Val-Tyr und Val-Glu durchgeführt. Damit sollte ermittelt werden, ob sich neben den Reaktionsbedingungen auch die Aminosäuresequenz auf die Ausbildung der N-terminalen Amadori-Produkte und AGEs auswirkt.

##### 4.4.2.1 Quantifizierung von Amadori-Produkten im Glucose-Peptid-Backmodell

Durch den Einsatz von Glucose als Reaktionspartner für Dipeptide war es leicht möglich durch Extraktion freie Amadori-Produkte sowie matrixarme Probelösungen zu erhalten, um die Bildung von Amadori-Produkten zu untersuchen. Die Fructosylvalylpeptide wurden durch Hydrolyse mit 8 M Salzsäure in FM-Val überführt und dieses mittels RP-HPLC-UV (Abschnitt 3.3.9) quantifiziert. Da der Umsatz der Fructosylderivate der fünf Dipeptide zu FM-

Val nach der Hydrolyse mit Salzsäure bekannt war (Abschnitt 4.1.2), konnte auf die Konzentration der Fructosyldipeptide in den Erhitzungsproben zurückgeschlossen werden.

Abbildung 4-65 zeigt die Chromatogramme von Proben des Krustenmodells. Es sind eine Inkubationsprobe (b), ein Blindwert mit Zusatz von Val-Leu aber ohne den Zusatz von Glucose (c), ein Blindwert mit Zusatz von Glucose, aber ohne den Zusatz von Val-Leu (d) sowie zum Vergleich das Chromatogramm eines FM-Val-Standards (a) dargestellt. Bei der Retentionszeit von FM-Val im Chromatogramm des Standards ist ein deutlicher Peak in der Inkubationsprobe zu sehen. Aber auch im Blindwert des Krustenmodells ohne Zusatz von Glucose tritt ein Peak für FM-Val auf (c). Im Blindwert ohne Peptid konnte kein FM-Val detektiert werden (d).

Die Konzentration im Blindwert mit Peptid aber ohne Glucose wurde auf 0,6 mmol FM-Val/mol Val-Leu bestimmt, was etwa einem Viertel im Vergleich zu 2,2 mmol FM-Val/mol Val-Leu nach Zusatz von Glucose entspricht. Eine Bildung von FM-Val in Blindwertversuchen des Krustenmodells mit Zusatz von Val-Leu, aber ohne Zusatz von Glucose konnte nicht nachgewiesen werden. Als Kohlenhydratquelle ist im Inkubationsansatz des Blindwerts nur die mikrokristalline Cellulose enthalten. Müller (2012) konnte zeigen, dass in der mikrokristallinen Cellulose zwar ein geringer Gehalt Glucose nachweisbar war, dieser aber nicht quantitativ zur Bildung von FM-Val in den Blindproben beitragen konnte. Würde die Glucose vollständig zum Amadori-Produkt bzw. FM-Val umgesetzt ergäbe sich nur ein Gehalt von ca. 0,02 mmol FM-Val/mol Val-Leu.

Offensichtlich ist das Peptid ebenso in der Lage mit der Cellulose, wie im Stärke-Peptid-Backmodell mit der Stärke, zu reagieren. Dabei entsteht ein Amadori-Produkt mit dem Cellulosemakromolekül als Kohlenhydrat Rest. Vor der Umsetzung der Amadori-Produkte zu FM-Val in 8 M Salzsäure erfolgte eine wässrige Extraktion. Dabei sollten nur Amadori-Produkte kurzkettiger Kohlenhydrate extrahierbar sein, weshalb makromolekular gebundene Amadori-Produkte vermutlich nicht erfasst wurden.

Als Quellen für die quantifizierbaren FM-Val-Gehalte im Blindwert ohne Glucose kommen beispielsweise an extrahierbare Oligosaccharide gebundene Amadori-Produkte oder das 1-Amino-1,4-dideoxyglucoson in Frage. In der mikrokristallinen Cellulose könnten schon vor der Erhitzung Saccharidketten mit einer geringen Anzahl an Monomeren vorgelegen haben oder diese konnten bei der Erhitzung durch die Spaltung längerer Ketten entstehen. Das 1-Amino-1,4-dideoxyglucoson kann bei der Erhitzung über den Peeling-off-Mechanismus aus den makromolekular gebundenen Amadori-Produkten entstanden sein (Abschnitt 2.1.2.2).

Bei der Umsetzung des wässrigen Extrakts mit 8 M Salzsäure können Amadori-Produkte der Oligosaccharide wegen der guten Abgangsgruppe an C-4 bzw. das 1-Amino-1,4-dideoxyglucoson, das bereits an C-4 dehydratisierte Zwischenprodukt im Bildungsmechanismus von FM-Derivaten (Hollnagel and Kroh, 2000), vermutlich effektiver zu FM-Val reagieren als das Amadori-Produkt der Glucose. Daraus würde folgen, dass der schon deutlich

geringere FM-Val-Gehalt im Blindwert ohne Glucose aus einem geringeren Gehalt der Vorstufen entstand.

Wenn davon ausgegangen wird, dass sich die Reaktivität des jeweiligen Dipeptids gegenüber Glucose bzw. Cellulose nicht unterscheidet, wird der detektierte Gehalt der Fructosyl-Amadori-Produkte als FM-Val zwar durch die Nebenreaktion mit Cellulose erhöht, aber sollte den Vergleich der Umsätze der Dipeptide zu den Amadori-Produkten nicht verfälschen. Außerdem ist zu vermuten, dass der Umsatz eines Peptids mit der Cellulose in Inkubationsproben mit Glucose in Konkurrenz geringer ausfällt als in Blindproben ohne Glucose. Da das Modell für alle verwendeten Peptide identisch ist, können die quantifizierten Gehalte verglichen werden.

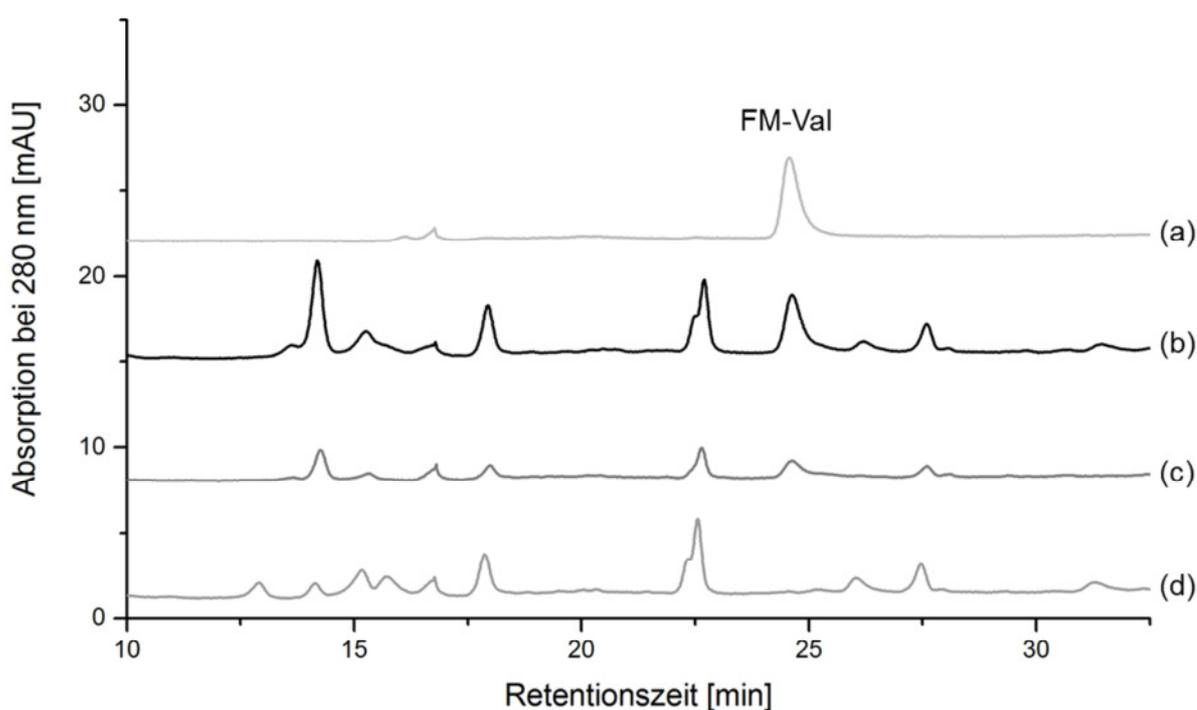


Abbildung 4-65: RP-HPLC-Chromatogramme des Glucose-Peptid-Backmodells (Kruste, 120 °C, pH = 5,6, 40 min) detektiert bei 280 nm von (a) FM-Val-Standard, (b) Probe mit Zusatz von Val-Leu und Glucose, (c) Probe mit Zusatz von Val-Leu, aber ohne Zusatz von Glucose, (d) Probe ohne Zusatz von Val-Leu, aber mit Zusatz von Glucose.

#### 4.4.2.2 Gehalte der Amadori-Produkte im Glucose-Peptid-Backmodell

In Abbildung 4-66 sind die quantifizierten Gehalte der Amadori-Produkte der Dipeptide bestimmt als FM-Val nach Hydrolyse mit 8 M Salzsäure und nach Korrektur der Gehalte um den Amadori-Produkt-spezifischen Umsatzfaktor (Tabelle 4-2) angegeben. Im Krustenmodell wurden im Vergleich zum Krumenmodell um ca. einen Faktor 10 höhere Gehalte der Amadori-Produkte quantifiziert.

Die höhere Temperatur im Krustenmodell von 120 °C im Vergleich zu 100 °C im Krumenmodell sollte sich förderlich ausgewirkt haben, aber vermutlich keinen Unterschied in dieser Größenordnung verursachen. Es ist zu vermuten, dass die Verfügbarkeit von Wasser einen

großen Einfluss hatte. Denn die Bildung der Schiff'schen Base als Vorstufe des Amadori-Produkts ist eine Kondensationsreaktion (Abbildung 2-1). Wenn das Reaktionswasser im trockenen, offenen System verdampfte und so aus dem Gleichgewicht entfernt wurde, war die Rückreaktion der in Lösung labilen Schiff'schen Base zum Zucker und Peptid nicht möglich. Dieser Effekt stellt vermutlich eine wichtige Triebkraft für die deutlich stärkere Bildung des Amadori-Produkts im Krustenmodell dar.

Daneben ist ein relevanter Einfluss der Gefriertrocknung bei der Probenvorbereitung auf den quantitativen Unterschied der Amadori-Produkt-Gehalte zwischen dem Krustenmodell und dem Krumenmodell zu vernachlässigen. Die Überprüfung ergab Gehalte, die nicht detektierbar waren oder um zwei Zehnerpotenzen unter den Gehalten nach Erhitzung lagen.

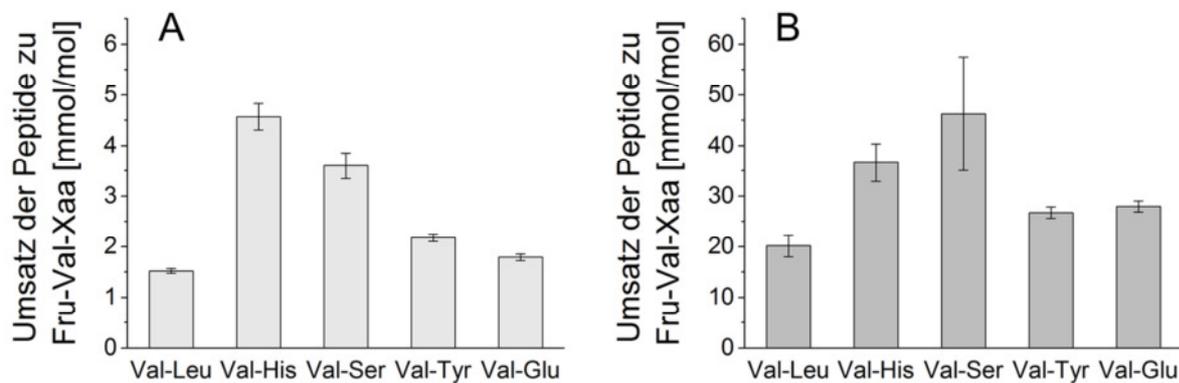


Abbildung 4-66: Quantitative Daten zur Bildung der Fru-Val-Xaa-Dipeptide in Inkubationen des Glucose-Peptide-Modells nach 40 min (Kruste (A): 100 °C, geschlossen, mit Wasser; Kruste (B): 120 °C, offen, nach Gefriertrocknung); Fehlerindikatoren geben die Spannweite aus einer Zweifachbestimmung an.

#### 4.4.2.3 Vergleich der Umsatzraten der Dipeptide zu den Amadori-Produkten

Der Umsatz der Dipeptide zu den Amadori-Produkten war im Krumenmodell (Abbildung 4-66) etwa 10-fach höher als im physiologischen Modell (PBS-Puffer, pH = 7,4, 37 °C, 24 h; Abbildung 4-6) und im Krustenmodell 10-fach höher als im Krumenmodell. Dabei wurde in allen Modellen das gleiche Verhältnis und die gleichen Konzentrationen von Glucose und Peptid eingesetzt. Trotz dieser großen Unterschiede im Gesamtumsatz und in den Reaktionsbedingungen ergaben sich in jedem der drei Modelle Umsatzraten der einzelnen Dipeptide zu den Amadori-Produkten, die jeweils in der gleichen Größenordnung lagen. Im Detail traten dann je nach Modell geringe Unterschiede in den individuellen Umsatzraten der Dipeptide auf.

Die Verhältnisse der Gehalte der Amadori-Produkte der einzelnen Dipeptide im Krumenmodell entsprachen weitestgehend dem Umsatz der initialen Phase der Inkubationen unter physiologischen Bedingungen (Abbildung 4-7). Einzig der Gehalt für Val-Leu war niedriger. Im Krumenmodell lag eine deutlich höhere Erhitzungstemperatur vor, aber die Inkubationsproben wurden auch deutlich kürzer erhitzt. Die Bildung der Amadori-Produkte unter Krustenbedingungen kann vermutlich ebenfalls als initiale Phase betrachtet werden (Müller, 2012).

Tabelle 4-19: Gegenüberstellung des  $pK_S$ -Werts bzw. der Nukleophilie der N-terminalen Aminogruppe der Dipeptide mit der Reaktivität zu den Amadori-Produkten und N-terminalen AGEs in den Backmodellen (Krumme, Kruste)

Reihenfolge der $pK_S$ -Werte (Abschnitt 4.1.3)	Val-Tyr	<	Val-Leu	=	Val-Ser	<	Val-His	≤	Val-Glu
	7,61	<	7,75	=	7,75	<	7,96	≤	7,99
Aufsteigende Reihenfolge der Gehalte (Abbildung 4-7) im physiologischen Modell:									
Amadori-Produkt	Val-Glu	<	Val-Tyr	<	Val-Leu	=	Val-Ser	<	Val-His
Aufsteigende Reihenfolge der Gehalte im Krumenmodell:									
Amadori-Produkt	Val-Leu	<	Val-Glu	<	Val-Tyr	<	Val-Ser	<	Val-His
CM-Derivat	Val-Leu	<	Val-Tyr	<	Val-Ser	<	Val-His	=	Val-Glu
GO-2(1H)-Pyrazinon	Val-Glu	<	Val-Leu	<	Val-Tyr	<	Val-His	<<	Val-Ser
Summe der AGEs	Val-Leu	<	Val-Tyr	<	Val-Ser	<	Val-His	=	Val-Glu
Aufsteigende Reihenfolge der Gehalte im Krustenmodell:									
Amadori-Produkt	Val-Leu	<	Val-Tyr	≤	Val-Glu	<	Val-His	<	Val-Ser
CM-Derivat	Val-Leu	<	Val-His	<	Val-Tyr	<	Val-Ser	<	Val-Glu
GO-2(1H)-Pyrazinon	Val-His	<	Val-Ser	<	Val-Glu	<	Val-Leu	<	Val-Tyr
Summe der AGEs	Val-His	<	Val-Ser	<	Val-Leu	=	Val-Glu	<	Val-Tyr

Die Inkubationen im Krumenmodell wurden bei  $pH = 5,6$  durchgeführt, wo die N-terminalen Aminogruppen aller fünf Dipeptide vollständig protoniert vorliegen sollten. Trotzdem folgte der Umsatz zu den Amadori-Produkten der Ordnung der  $pK_S$ -Werte der N-terminalen Aminogruppe (Tabelle 4-19). Da dem höheren  $pK_S$ -Wert einer Aminogruppe eine höhere Nukleophilie bzw. Basizität entspricht, kann vermutet werden, dass die höhere Basizität auch im Krumenmodell die geschwindigkeitsbestimmende Tautomerisierung zum 1,2-Enaminol katalysieren konnte (Abbildung 4-8). Die geringe Reaktivität von Val-Glu wurde bereits in Abschnitt 4.2.1.3 diskutiert. Warum Val-Leu im Krumenmodell eine geringere Reaktivität im Vergleich zum physiologischen Modell zeigte, kann an dieser Stelle nicht erklärt werden.

Die Gehalte der Amadori-Produkte im Krustenmodell stimmten nicht mit der aufsteigenden Reihe der  $pK_S$ -Werte bzw. der Nukleophilie überein (Tabelle 4-19). Eine Ursache ist darin zu sehen, dass die Bildung der Amadori-Produkte im Krustenmodell nach 40 Minuten nicht mehr in der initialen Phase war. Wie Müller (2012) zeigen konnte, sanken die Gehalte der Amadori-Produkte bereits nach 10 bis 15 minütiger Erhitzungszeit wieder. Die quantifizierbaren Gehalte nach 40 Minuten in Abbildung 4-66 wurden also nicht nur von der Reaktivität der Dipeptide zu den Amadori-Produkten sondern auch der Stabilität der jeweiligen Amadori-Produkte beeinflusst. Als weiterer Grund für die frühe Stagnation der Zunahme der Gehalte der Amadori-Produkte kann im trockenen Modell auch die verringerte Mobilität der Edukte angesehen werden.

#### 4.4.2.4 Bildung N-terminaler AGEs im Glucose-Peptid-Backmodell

Für die Bildung der Amadori-Produkte wurde diskutiert, dass diese nicht nur aus der Reaktion der N-terminalen Aminogruppe der Dipeptide mit Glucose gebildet wurden sondern auch aus

der Reaktion mit der Cellulose entstehen können. Entsprechend ist davon auszugehen, dass auch ein Teil der N-terminalen Glyoxal-AGEs den Schiff'schen Basen bzw. Oligosaccharid-Amadori-Produkten der Cellulose als Ausgangsverbindungen gebildet wurde.

Der größte Teil der Amadori-Produkte entstand aus der Glucose, aber die Amadori-Produkte der Cellulose sind als weniger stabil einzuschätzen. Durch die Abspaltung der guten Abgangsgruppe an C-4 der Glucose entsteht das 1-Amino-1,4-dideoxyglucoson, das wiederum auf Grund seiner Dicarbonylstruktur leichter abgebaut werden kann als ein Fructosyl-Derivat. Müller (2012) konnte in Inkubationen ohne Glucose zeigen, dass AGE-Gehalte in der gleichen Größenordnung aus dem Abbau der Cellulose entstehen können, wie in Inkubationen mit Glucose. Abschließend konnte aber nicht eingeschätzt werden, welchen Anteil die Bildung der N-terminalen AGEs aus der Reaktion mit der Cellulosematrix in Inkubationsproben mit Glucose haben kann. Eine solche Erkenntnis könnte beispielsweise über den Einsatz von  $^{13}\text{C}_6$ -Glucose gewonnen werden.

#### 4.4.2.5 Quantifizierung N-terminaler AGEs im Glucose-Peptid-Backmodell

In den Extrakten der Inkubationsproben wurden die CM-Val-Xaa-Dipeptide und die GO-Val-Xaa-2(1*H*)-Pyrazinone (Xaa = Leu, His, Ser, Tyr, Glu) mit der in Abschnitt 3.3.11 beschriebenen Methode quantifiziert. Die Detektion erfolgte über experimentell bestimmte und charakteristische Massenübergänge, was in Abschnitt 4.4.1.2 am Beispiel von CM-Val-Leu und das GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon genauer erläutert wurde.

In Abbildung 4-68 sind exemplarisch die Chromatogramme von Inkubationsproben von Val-His und Val-Leu aus dem Glucose-Peptid-Modell unter Krustenbedingungen dargestellt. Für beide Peptide wurden die Chromatogramme einer Inkubationsprobe nach 40 min Erhitzung, einer Standardadditionsproben dieser Inkubationsprobe und eines Blindwerts der Inkubationszeit 0 Minuten dargestellt. Damit kann nachvollzogen werden, dass in der Reaktionsmischung aus Dipeptid, Glucose, Cellulose und Puffer nach der Gefriertrocknung und vor der Erhitzung keine CM-Derivate oder Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone in relevanten Konzentrationen quantifizierbar waren. Die Standardadditionsexperimente mit den jeweiligen synthetisierten Referenzstandards (Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4) bestätigen die Übereinstimmung der Retentionszeiten bei den charakteristischen Massenübergängen. Zur Quantifizierung wurden Standardadditionskalibrierungen angefertigt, um Matrixeffekte der Massendetektion zu berücksichtigen.

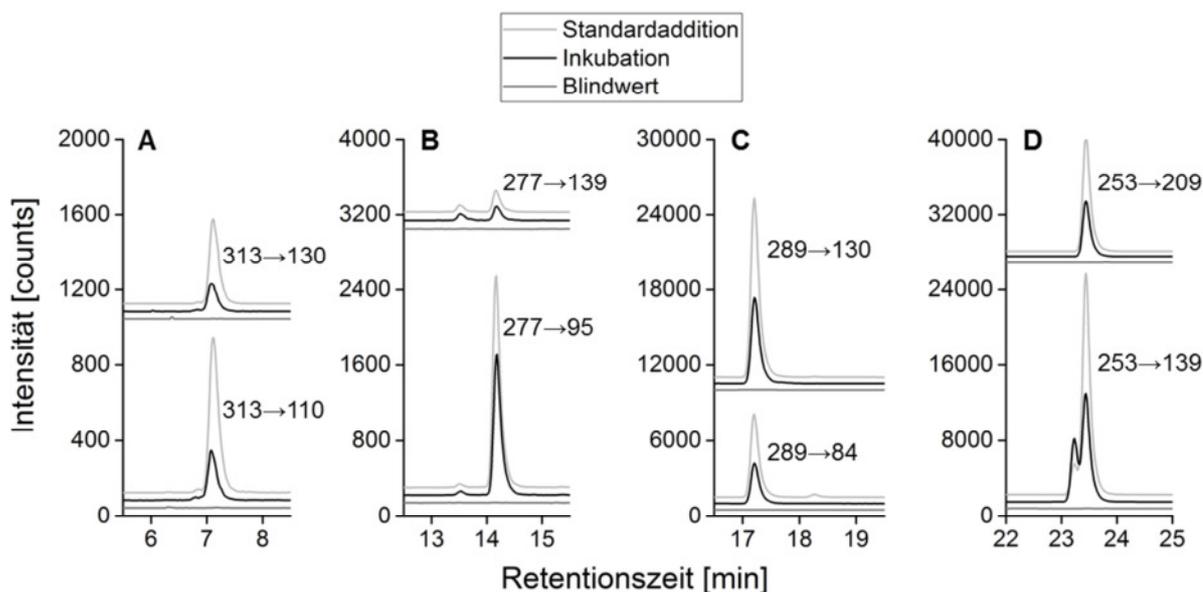


Abbildung 4-67: LC-MS/MS-Chromatogramme zur Identifizierung N-terminaler AGEs im Glucose-Peptid-Backmodell unter Krustenbedingungen (trocken, offen, 120°C, pH = 5,6); zwei charakteristische Massenübergänge jedes Analyten in Inkubationsproben (40 min) mit Val-His bzw. Val-Leu, sowie eines nicht erhitzten Blindwerts und einer Standardadditionsprobe nach Zusatz des jeweiligen authentischen Referenzstandards; A – CM-Val-His, B – GO-Val-His-2(1*H*)-Pyrazinon, C – CM-Val-Leu, D – GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon.

#### 4.4.2.6 Gehalte von CM-Val-Xaa-Peptiden und GO-Val-Xaa-2(1*H*)-Pyrazinonen im Krumenmodell

In Abbildung 4-68 sind die Gehalte der N-terminalen AGEs aus den Inkubationen im Krumenmodell dargestellt. Für alle fünf Dipeptide wurde für diese Bedingungen ein deutlich höherer Umsatz zu den CM-Derivaten ermittelt. Für Val-Ser wurde ein nur etwa dreifach höherer Gehalt für CM-Val-Ser als für das GO-Val-Ser-2(1*H*)-Pyrazinon detektiert. Bei den anderen Valyl-Dipeptiden war der Unterschied in der Größenordnung von Faktor 20 bis 50 bzw. konnte das GO-Val-Glu-2(1*H*)-Pyrazinon nicht quantifiziert werden.

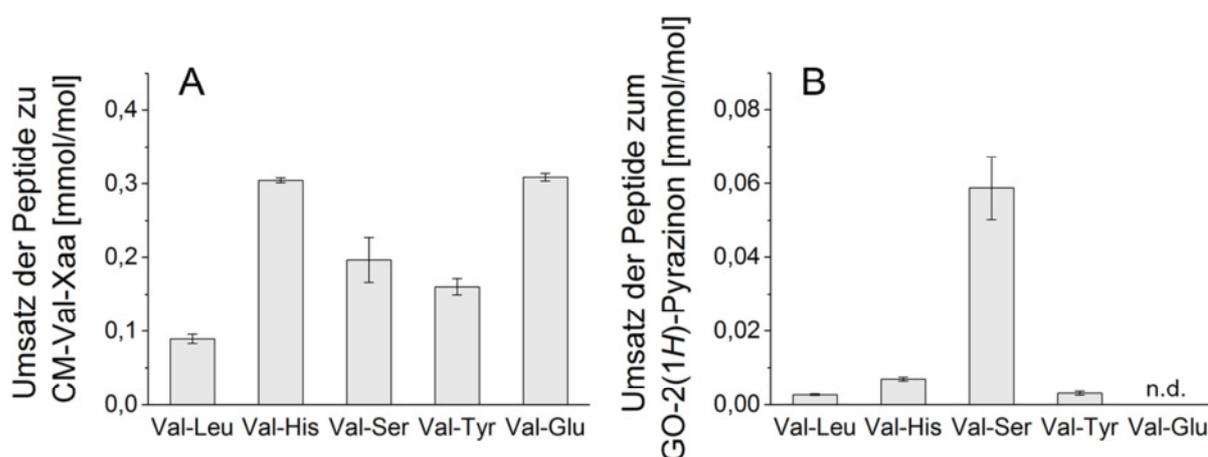


Abbildung 4-68: Quantitative Daten zur Bildung von CM-Val-Xaa-Peptiden (A) und Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinonen (B) in Inkubationen des Glucose-Peptid-Modells unter Krustenbedingungen (100 °C, geschlossen, mit Wasser); Fehlerindikatoren geben die Spannweite aus einer Zweifachbestimmung an; n.d. – nicht detektierbar.

Für eine Bilanzierung der Bildung der untersuchten N-terminalen AGEs ergibt sich, dass die Summe der Gehalte der N-terminalen AGEs der aufsteigenden Reihenfolge der Bildung der Amadori-Produkte folgt (Tabelle 4-19). Eine Ausnahme dabei ist das Val-Glu, das eine abweichend hohe Bildung des CM-Derivats aufwies. Die ansonsten gleiche Abhängigkeit der Bildung der Amadori-Produkte und der N-terminalen AGEs vom Aufbau der Valyldipeptide lässt einen mechanistischen Zusammenhang vermuten.

Die Bildung des 1,2-Enaminols aus der Schiff'schen Base ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Bildung der Amadori-Produkte. Gleichzeitig kann aus dem 1,2-Enaminol nach Oxidation und Retro-Aldol-Spaltung oder hydrolytischer  $\beta$ -Dicarbonylspaltung das Iminoglyoxal als Vorstufe der Glyoxal-AGEs entstehen. Deshalb ist zu vermuten, dass die Struktur der Valyldipeptide im Krümmenmodell Einfluss auf die Bildung des 1,2-Enaminols genommen hat. Daraus könnte dann geschlossen werden, dass im Krümmenmodell die Bildungsreaktionen der Amadori-Produkte und der N-terminalen AGEs synchron ablaufen und so als Konkurrenzreaktionen ausgehend vom 1,2-Enaminol betrachtet werden können (Abbildung 4-20). Die Bildung der Amadori-Produkte wäre dabei bevorzugt. Denn die Amadori-Produkte wurden mit etwa 10-fach höheren Gehalten quantifiziert.

Die Gehalte der Amadori-Produkte aller Dipeptide außer Val-Glu entsprach dabei fast exakt dem 15-fachen der Summe der Gehalte der N-terminalen AGEs. Die Abweichung bei Val-Glu könnte einerseits mit einer stärkeren Bildung aus dem 1,2-Enaminol begründet werden. Andererseits war die Bildung des Amadori-Produkts ausgehend von der Reihe der  $pK_S$ -Werte für Val-Glu unerwartet gering (Tabelle 4-19). Wenn die Seitenkettenfunktion des Val-Glu die Umlagerung zum 1,2-Enaminol unterdrückt hat, könnte der höhere Gehalt des CM-Derivats auch aus dem direkten Abbau der Schiff'schen Base folgen (Abbildung 4-71: B).

Insbesondere ein Vergleich der Gehalte der von Val-Ser bzw. von Val-Glu abgeleiteten CM-Derivate und Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone zeigt, dass die Variation der C-terminalen Aminosäure in den Valyldipeptiden einen erheblichen Einfluss auf die Produktbildung zu nehmen scheint. Während bei Val-Glu im Krümmenmodell ausschließlich das CM-Derivat detektiert werden konnte, wurde für Val-Ser eine erheblich stärkere Bildung des GO-2(1*H*)-Pyrazinons im Vergleich zu allen anderen Peptiden registriert. Eine vergleichbare Beobachtung konnte bereits im Glyoxal-Peptid-Modell unter physiologischen Bedingungen gemacht werden, weshalb ein grundsätzlicher Zusammenhang zu vermuten ist. Für Val-Ser wurde in Abschnitt 4.2.2.5 bereits diskutiert, dass die Seitenkettenfunktion, ähnlich wie in Enzymen mit Serin im aktiven Zentrum, eine intermediäre kovalente Bindung zu C-1 oder C-2 des Iminoglyoxals ausbilden könnte. Diese Übergangsverbindungen könnten dann zu einer bevorzugten Bildung der 2(1*H*)-Pyrazinonstruktur führen (Abbildung 4-18).

Die überwiegende Bildung des CM-Derivats bei Beteiligung von Val-Glu, kann einerseits auf eine mechanistische Unterstützung der Bildung des CM-Derivats oder einer Unterdrückung der Bildung des entsprechenden 2(1*H*)-Pyrazinons beruhen. Da die Bildungsmechanismen beider Derivate aus dem Iminoglyoxal als Teilschritte Tautomerisierungen enthalten, ist

vermutlich keine intermediäre Aufnahme von Protonen durch die  $\gamma$ -Carboxylfunktion verantwortlich. Für die abweichend geringere Bildung des Amadori-Produkts im physiologischen Modell und im Krustenmodell wurde vermutet, dass die zusätzliche negative Ladung das Molekül gegen Basen bzw. Nukleophile abschirmt. Möglicherweise kann diese Abschirmung auch den intramolekularen nukleophilen Angriff der Aminogruppe der Peptidbindung auf die Carbonylgruppe des Glyoxylrests verhindern (Abbildung 4-69). Somit wäre die Zyklisierung zum 2(1H)-Pyrazinon unterdrückt und das Iminoglyoxal könnte hauptsächlich zum CM-Derivat umgesetzt werden.

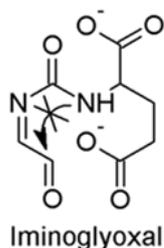


Abbildung 4-69: Abschirmung des Nucleophils durch Carboxylgruppen in Val-Glu

#### 4.4.2.7 Gehalte von CM-Val-Xaa-Peptiden und GO-Val-Xaa-2(1H)-Pyrazinonen im Krustenmodell

Unter den Bedingungen des Krustenmodells, die sich zum Krumenmodell durch eine etwas höhere Temperatur und insbesondere durch die Abwesenheit von Wasser unterscheiden, wurden für alle fünf Dipeptide höhere Gehalte der Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone als der CM-Derivate quantifiziert (Abbildung 4-70). Die bevorzugte Bildung von 2(1H)-Pyrazinonen unter den Reaktionsbedingungen des Krustenmodells ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Kunert (2009)*, wo in Modellbrötchen nur in der Kruste, nicht aber in der Krume 2(1H)-Pyrazinone detektiert werden konnten. Die 2(1H)-Pyrazinongehalte der Krumen lagen vermutlich unterhalb der Empfindlichkeit der Bestimmungsmethode.

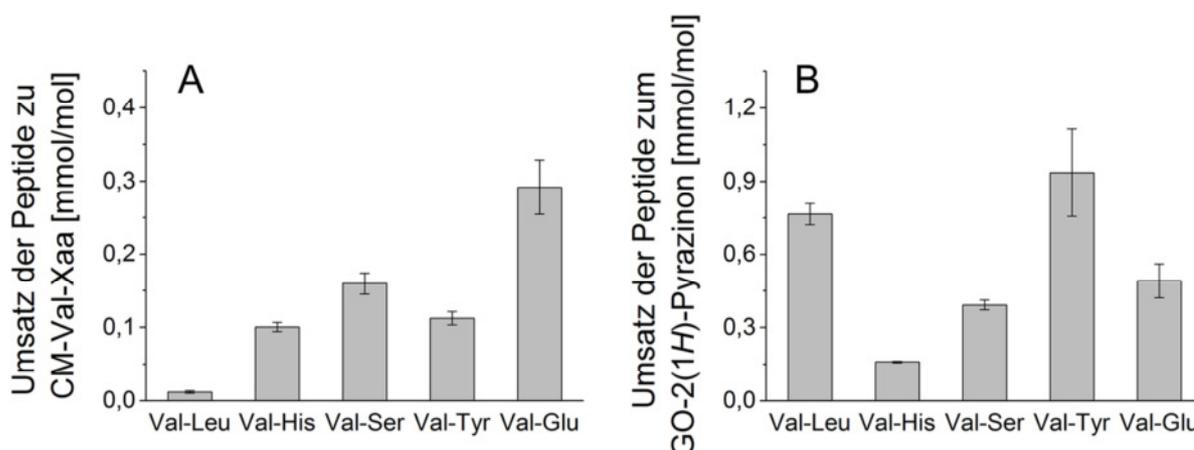


Abbildung 4-70: Quantitative Daten zur Bildung von CM-Val-Xaa-Peptiden (A) und Glyoxal-2(1H)-Pyrazinonen (B) in Inkubationen des Glucose-Peptide-Modells unter Krustenbedingungen (120 °C, offen, nach Gefriertrocknung); Fehlerindikatoren geben die Spannweite aus einer Zweifachbestimmung an.

Für die Peptide Val-His, Val-Ser und Val-Glu wurden etwa 2-fach, für Val-Tyr 8-fach und für Val-Leu 60-fach höhere Umsatzraten zum GO-2(1*H*)-Pyrazinon als zum CM-Derivat bestimmt. Die besonders große Differenz zwischen den Gehalten der AGEs bei Val-Leu und Val-Tyr könnte unter den verwendeten Reaktionsbedingungen spezifisch für Peptide mit neutralen Aminosäureseitenketten sein. Für Val-Leu wurde auch im Stärke-Peptid-Backmodell (Abbildung 4-61) ein vergleichbarer Effekt beobachtet (Abschnitt 4.4.1).

Im Vergleich zum Krümenmodell wurde im Krustenmodell für Val-Glu im Vergleich zu den Peptiden Val-His und Val-Ser keine stärkere Bildung des CM-Derivats im Verhältnis zum GO-2(1*H*)-Pyrazinon festgestellt. Möglicherweise kann der steuernde Effekt der negativ geladenen Carboxylgruppe unter den trockenen Bedingungen nicht wirken, da die Carboxylgruppe protoniert oder als Natriumsalz vorliegt. Die negative Ladung wäre dabei neutralisiert.

Für Val-Ser wurde im Krümenmodell und im physiologischen Modell im Vergleich zu den anderen Peptiden eine erhöhte Bildung des GO-Val-Ser-2(1*H*)-Pyrazinons registriert. Auch dieser Effekt ist im Krustenmodell nicht aufgetreten. Möglicherweise kann eine Übergangsverbindung (Abbildung 4-18), die für die Erklärung des katalytischen Effekts notwendig wäre, unter den trockenen Bedingung bei hoher Temperatur nicht entsprechend ausgebildet werden. Da im trockenen Krustenmodell kein Wasser zur Verfügung steht, sind vermutlich mehrfache Protonenübertragungen weniger gut möglich und somit die reversible Bildung von Zwischenverbindungen gehindert.

Ein gleiches Muster für die peptidabhängige Bildung der Amadori-Produkte und der N-terminalen AGEs, wie im Krümenmodell, ist für die Gehalte im Krustenmodell nicht zu erkennen. Im Gegenteil wurden nach 40 Minuten Inkubationszeit für die Peptide Val-His und Val-Ser die höchsten Gehalte der Amadori-Produkte, aber die niedrigsten Werte für die Summe der N-terminalen AGEs gefunden.

Dieses Ergebnis kann von einem höheren Umsatz des 1,2-Enaminols zum Amadori-Produkt als zu den AGEs oder einer höheren Stabilität des Amadori-Produkts bestimmt werden. Aber die Abhängigkeit der Stabilität der N-terminalen Amadori-Produkte von der Struktur der Dipeptide ist nicht bekannt. Deshalb ist eine direkte Bilanzierung zwischen den Gehalten der Amadori-Produkte und der N-terminalen AGEs nur bedingt möglich. Aber wegen der Kombination eines hohen Gehalts der Amadori-Produkte und des gleichzeitig niedrigeren Gehalts der N-terminalen AGEs kann ein Zusammenhang vermutet werden.

Ein zweiter Erklärungsansatz kann über den Gehalt der Schiff'schen Base erfolgen. Wenn die Bildung des Amadori-Produkts für die anderen Dipeptide geringer war, müsste der Gehalt der Schiff'schen Base höher gewesen sein, da unter den trockenen Reaktionsbedingungen des Krustenmodell die Hydrolyse der Schiff'schen Base zurück zu den Edukten verhindert sein sollte. Aus dem höheren Gehalt der Schiff'schen Base könnte dann ein größerer Anteil der N-terminalen AGEs über den Namiki-Weg (Abbildung 4-71: B) gebildet worden sein.

Aus beiden Argumentationsansätzen lässt sich schließen, dass im Krustenmodell aus einem hohen Umsatz zum Amadori-Produkt und einer hohen Stabilität des Amadori-Produkts eine geringere Bildung der N-terminalen AGEs resultierte.

#### 4.4.2.8 Mechanistischer Zusammenhang der Anteile der N-terminalen AGEs

Mit der bevorzugten Bildung der GO-2(1H)-Pyrazinone im Krustenmodell (Abbildung 4-70) und der umgekehrt bevorzugten Bildung der CM-Derivate im Krumenmodell (Abbildung 4-68), kann die Vermutung aus dem Stärke-Peptid-Modell, dass die Verfügbarkeit von Wasser der entscheidende Parameter zur Ausbildung der Anteile der N-terminalen AGEs sein könnte, bestätigt werden. In Abbildung 4-71 ist gezeigt, dass bei der Bildung des GO-2(1H)-Pyrazinons Wasser frei wird, wohingegen die Bildung des CM-Derivats bzw. des Glyoxals Wasser benötigt.

Während die Gehalte der CM-Derivate im Vergleich der zwei Modelle in der gleichen Größenordnung lagen, unterschieden sich die Gehalte der GO-2(1H)-Pyrazinone je nach Peptid um Faktor 20 bis > 100. Zusätzlich konnte im Krumenmodell für Val-Glu ausschließlich das CM-Derivat und im Krustenmodell für Val-Leu fast ausschließlich das GO-2(1H)-Pyrazinon detektiert werden. Aus diesen stark modell- und peptidabhängigen Unterschieden in der Produktverteilung, kann die Vermutung abgeleitet werden, dass die Produkte überwiegend über ein gemeinsames Zwischenprodukt entstehen.

Dieses Zwischenprodukt ist vermutlich das Iminoglyoxal. Das Iminoglyoxal kann aus der Schiff'schen Base (Abbildung 2-10: b, Namiki-Weg bzw. Abbildung 4-71: B) oder als Nebenprodukt der Amadori-Umlagerung aus dem 1,2-Enaminol entstehen (Abbildung 4-71: C, D). Die Bildung aus einem Peptid und freiem Glyoxal ist grundsätzlich auch möglich, wobei das Glyoxal vermutlich erst als hydrolytisch freigesetztes Nebenprodukt der Bildung der N-terminalen Glyoxal-AGEs entsteht. In einem Reaktionssystem mit Glucose und einer katalytisch wirkenden Aminoverbindung ist davon auszugehen, dass die Autoxidation der Glucose ohne Beteiligung einer Aminoverbindung (Abbildung 4-71: A) keinen relevanten Beitrag zur Bildung von Glyoxal leistet (*Glomb and Monnier, 1995*).

Für das Krumenmodell wurde festgestellt, dass die Bildung aus dem 1,2-Enaminol überwiegen sollte, da die Summe der Gehalte der N-terminalen Glyoxal-AGEs für vier der fünf Peptide proportional zur Bildung des jeweiligen Amadori-Produkts war. Im Krustenmodell könnte neben diesem Reaktionsweg möglicherweise die Bildung aus der Schiff'schen Base einen größeren Anteil haben. Mechanistisch kann die Bildung des Iminoglyoxals über die Oxidation des 1,2-Enaminols zum 1-Iminoglucos-2-on mit anschließender Retro-Aldol-Spaltung (Abbildung 2-11: g bzw. Abbildung 4-71: C) oder nach Umlagerung zum 1-Iminoglucos-3-on durch hydrolytische  $\beta$ -Spaltung und nach einer weiteren Oxidation (Abbildung 2-11: g, j, g) entstehen (Abbildung 4-71: D).

Zur Bildung von CM-Derivaten sind weitere Reaktionswege bekannt, ohne dass das Iminoglyoxal als Zwischenprodukt entstehen muss. GO-2(1*H*)-Pyrazinone können dann nicht gebildet werden. Das N-terminale CM-Derivat kann beispielsweise durch oxidative  $\alpha$ -Spaltung aus dem 1-Amino-1-desoxyglucos-2,3-on (Abbildung 2-11: k bzw. Abbildung 4-71: F) hervorgehen, wobei *Davidsek et al. (2006b)* diese oxidative Fragmentierung als quantitativ untergeordnet eingeschätzt haben. Aus dem 1-Amino-1-desoxyglucos-2,4-on (Abbildung 2-11: i bzw. Abbildung 4-71: G) bzw. dem 1-Amino-1,3-didesoxyglucos-2,4-on (Abbildung 2-11: f bzw. Abbildung 4-71: E) kann das CM-Derivat durch hydrolytische  $\beta$ -Spaltung gebildet werden. Welchen Anteil diese Reaktionswege an der Bildung der CM-Derivate haben und ob diese Anteile in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen oder beteiligten Peptiden variieren, kann an dieser Stelle nicht abschließend bewertet werden. Insbesondere unter wasserarmen Reaktionsbedingungen sollten hydrolytische Reaktionen aber weniger relevant sein.

Genaueren Aufschluss könnte beispielsweise die Bestimmung der Nebenprodukte aus der Spaltung der Kohlenhydratkette liefern. Eine abschließende Bilanzierung des komplexen Reaktionssystems ist allerdings anspruchsvoll, da einzelne Produkte über verschiedene Reaktionswege entstehen können. Alternativ könnte die Verwendung von OPD in den Inkubationsmischungen vermutlich das Glyoxal aus dem Iminoglyoxal entziehen und würde die Bildung der AGEs dadurch mehr oder weniger drastisch verringern, wenn die Bildungswege der N-terminalen Glyoxal-AGEs hauptsächlich über das Iminoglyoxal verliefen. Auf diese Weise konnten *Glomb & Monnier (1995)* die Bildung von CML mit dem schwächeren Dicarbonylfänger Aminoguanidine partiell unterdrücken. Ein Ausschluss von oxidativen Bedingungen sollte hingegen wenig hilfreich sein, da der überwiegende Teil der beschriebenen Bildungswege des Iminoglyoxals auf mindestens einem Reaktionsschritt beruht.

Um die Abhängigkeit der Bildung der N-terminalen AGEs von der verfügbaren Wassermenge besser bemessen zu können, sollten Experimente mit definiert eingestellten  $a_w$ -Werten durchgeführt werden. *Kunert (2009)* hatte mit Modellexperimenten mit Variation des  $a_w$ -Werts (0,17; 0,53; 0,84) herausgefunden, dass die Bildung des GO-2(1*H*)-Pyrazinons aus Glucose und Peptid bei einem hohen  $a_w$ -Wert am höchsten ist. Das Ergebnis von *Kunert (2009)* ist ein guter Ausgangspunkt um die optimale Verfügbarkeit von Wasser auf die Bildung der Carboxyalkylderivate bzw. der 2(1*H*)-Pyrazinone herauszufinden.

Durch die Betrachtung der Reaktionen verschiedener Peptide mit Glucose unter variierten Reaktionsbedingungen wurde ein detaillierter Einblick in die diskutierten mechanistischen Zusammenhänge ermöglicht. Aus der zentralen Rolle des Iminoglyoxals bei der Bildung der N-terminalen Glyoxal-AGEs an Peptiden lässt sich schließen, dass dieses Prinzip auch bei der Reaktion der  $\alpha$ -Aminogruppe freier Aminosäuren oder der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins mit Glucose gelten sollte. Der hauptsächliche Unterschied bestünde darin, dass ausschließlich das CM-Derivat und keine GO-2(1*H*)-Pyrazinone entstehen könnten.

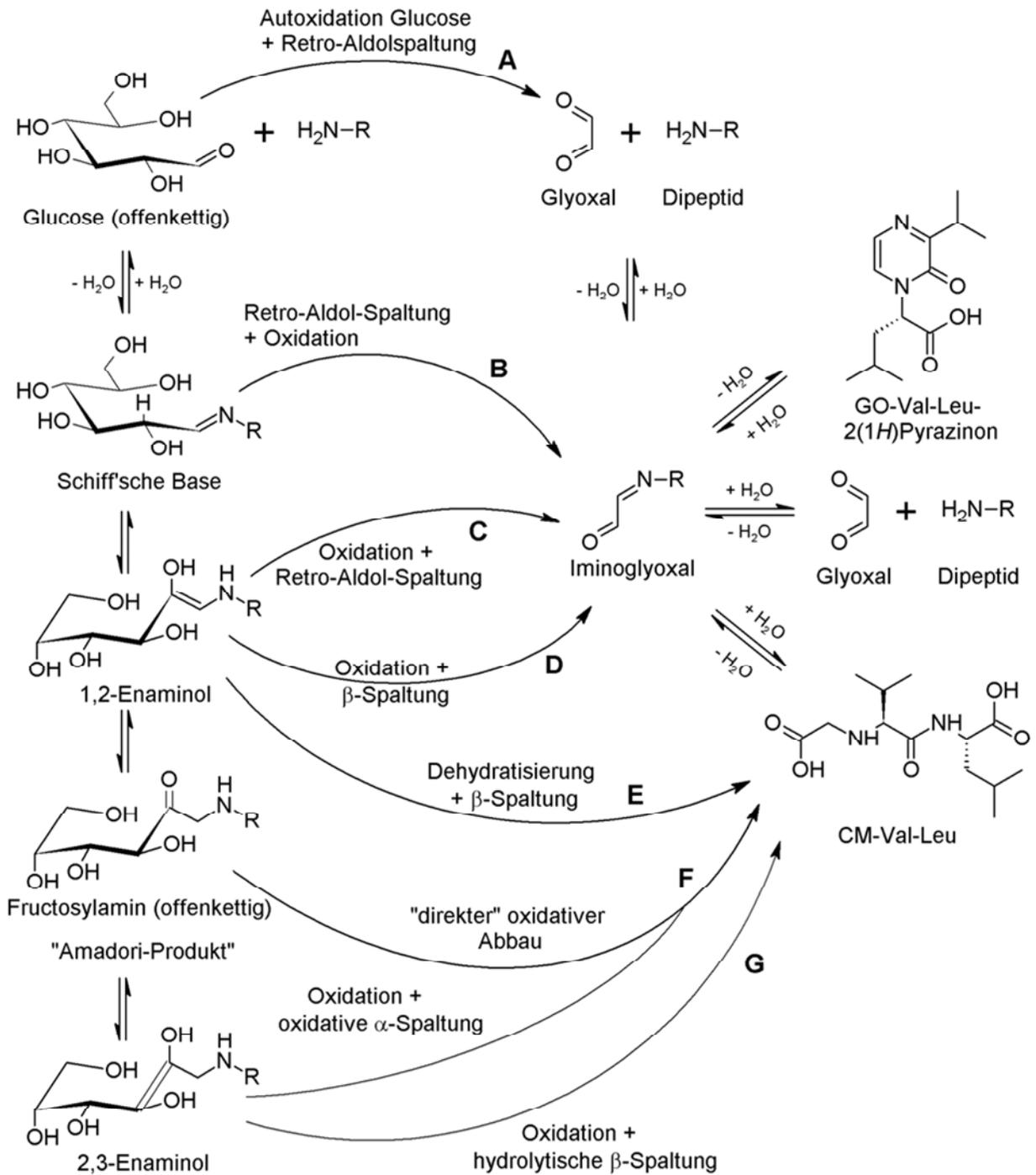


Abbildung 4-71: Reaktionssystem – N-terminale AGEs und freies Glyoxal als Nebenprodukte der Bildung des Amadori-Produkts (Vgl. Abschnitte 2.1.1, 2.1.3.2 und 2.1.3.3): **A** (Glomb & Monnier, 1995); **B** (Hayashi & Namiki, 1980; Glomb & Monnier, 1995); **C** (Hofmann et al., 1999); **D** Oxidation (Hofmann et al., 1999), Umlagerung und hydrolytische β-Spaltung (Davidek et al., 2006a), weitere Oxidation; **E** (Kasper & Schieberle, 2005); **F** direkter oxidativer Abbau Amadori-Produkt (Ahmed et al., 1986) bzw. mechanistisch über Oxidation 2,3-Enaminol mit anschließender oxidativer α-Spaltung (Davidek et al., 2006b); **G** Oxidation (Hofmann et al., 1999) und hydrolytische β-Spaltung (Davidek et al., 2006a).

### 4.4.3 Zusammenfassung zu den Modellexperimenten unter Backbedingungen

#### *Stärke-Peptid-Backmodell*

Zur Charakterisierung des Stärke-Peptid-Backmodells wurden die 1,2-Dicarbonylverbindungen analysiert. Als quantitativ dominierende 1,2-Dicarbonylverbindung wurde 3-DPs identifiziert. Die Gehalte lagen je nach pH-Wert zwischen 1,6 und 4,1 mmol/kg Kruste (Trockenmasse). Die Gehalte der Dicarbonylverbindungen Glyoxal und Methylglyoxal waren um Faktor 100 niedriger und lagen in etwa im Bereich der N-terminalen AGEs.

Im Stärke-Peptid-Backmodell wurde die Bildung N-terminaler AGEs des Dipeptids Val-Leu in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht. Sowohl die Bildung der von Glyoxal abgeleiteten N-terminalen AGEs CM-Val-Leu und GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon als auch die entsprechend von Methylglyoxal abgeleiteten N-terminalen AGEs CE-Val-Leu und MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon konnten nachgewiesen werden. Die 2(1*H*)-Pyrazinone wurden je nach pH-Wert in 10- bis 100-fach höherer Konzentration quantifiziert. Die Gehalte von CM-Val-Leu und CE-Val-Leu sowie des GO- und des MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinons lagen jeweils in der gleichen Größenordnung. Der Umsatz des Peptids lag im Bereich von 1 bis 5%. In Summe wurden im leicht basischen höhere Gehalte der N-terminalen AGEs detektiert als bei leicht saurem pH-Wert, wobei im basischen mit steigendem pH-Wert die Bildung der 2(1*H*)-Pyrazinone noch stärker bevorzugt war als die Bildung der Carboxyalkylderivate. Die Gehalte der von Glyoxal bzw. Methylglyoxal abgeleiteten AGEs lagen jeweils im gleichen Konzentrationsbereich. Aus der bevorzugten Bildung der 2(1*H*)-Pyrazinone im Stärke-Peptid-Backmodell wurde die These abgeleitet, dass die geringe Verfügbarkeit von Wasser die Reaktion zu den Carboxyalkylderivaten unterdrückte und die Bildung der 2(1*H*)-Pyrazinone begünstigte.

In der Modellbackware Stärkekruste unter Zusatz des Dipeptids Val-Leu konnten Gehalte der N-terminalen AGEs quantifiziert werden, die den Gehalten von CML bzw. CEL in realen Backwaren entsprechen.

#### *Glucose-Peptid-Backmodell*

Um weitere Einblicke in die Bildung N-terminaler AGEs zu erhalten, wurden Erhitzungsexperimente in einem Glucose-Peptid-Backmodell durchgeführt, wobei die Erhitzung separat in einem Krumenmodell (geschlossen, 100 °C) und einem Krustenmodell (wasserfrei, offen, 120°C) erfolgte. Die Verwendung von Glucose ermöglichte neben den N-terminalen Glyoxal-AGEs die Erfassung der Amadori-Produkte. Zur Untersuchung des Einflusses der Aminosäuresequenz auf das Produktspektrum wurden fünf unterschiedliche Valyldipeptide eingesetzt.

Im Krustenmodell wurden 10-fach höhere Gehalte der N-terminalen Amadori-Produkte quantifiziert als im Krumenmodell. Der Vergleich der fünf Peptide hinsichtlich der Bildung der Amadori-Produkte ergab im Krumenmodell, dass die Produktbildung wie im physiologischen Modell mit zunehmender Basizität bzw. Nukleophilie der N-terminalen Aminogruppe zunahm. Abweichungen von diesem Prinzip wurden über den Einfluss der Seitenkettenfunktio-

onen der C-terminalen Aminosäuren der Valyldipeptide erklärt. Die Gehalte der Amadori-Produkte im Krustenmodell wurden nicht mehr hauptsächlich von der initialen Bildung bestimmt, sondern zusätzlich von der peptidspezifischen Stabilität der Amadori-Produkte beeinflusst.

In den Inkubationsproben des Krustenmodells wurden deutlich höhere Gehalte der CM-Derivate im Vergleich zu den GO-2(1*H*)-Pyrazinonen quantifiziert. Dabei wurden große Unterschiede in den Anteilen der N-terminalen AGEs in Abhängigkeit von der Peptidsequenz festgestellt. Bei Val-Ser war der Gehalt des CM-Derivats nur dreifach höher als der Gehalt des GO-2(1*H*)-Pyrazinons, wogegen bei den anderen Peptiden 20- bis 50-fach höhere Gehalte des CM-Derivats bestimmt wurden. Für Val-Glu konnte das GO-2(1*H*)-Pyrazinon nicht detektiert werden. Die gleiche Tendenz zu einer vergleichsweise stärkeren Bildung des GO-2(1*H*)-Pyrazinons bei Val-Ser und des CM-Derivats bei Val-Glu konnte schon im Glyoxal-Peptid-Modell unter physiologischen Bedingungen beobachtet werden.

Im Krustenmodell entsprachen die aufsteigenden Gehalte der Summe der N-terminalen Glyoxal-AGEs, mit Ausnahme von Val-Glu, der aufsteigenden Reihe der Bildung der Amadori-Produkte der Dipeptide. Davon wurde abgeleitet, dass die Bildung der N-terminalen Glyoxal-AGEs im Krustenmodell vom gleichen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, wie die Bildung der Amadori-Produkte abhängen sollte. Die Reaktionen des 1,2-Enaminols zum Amadori-Produkt bzw. den Glyoxal-AGEs können im Krustenmodell deshalb als konkurrierend angesehen werden.

Im Krustenmodell wurden höhere Gehalte der GO-2(1*H*)-Pyrazinone als der CM-Derivate quantifiziert. Für Val-His, Val-Ser und Val-Glu waren die Gehalte der GO-2(1*H*)-Pyrazinone im Vergleich zu den CM-Derivaten etwa doppelt so hoch. Für Val-Tyr waren sie 8-fach und für Val-Leu 60-fach höher. Damit konnten nicht die gleichen Effekte der Sequenz der Valyldipeptide auf die Anteile der Glyoxal-AGEs beobachtet werden wie im Krustenmodell. Für Val-Ser und Val-Glu konnte in etwa das gleiche Verhältnis des CM-Derivats zum GO-2(1*H*)-Pyrazinon ermittelt werden. Unter den Bedingungen des Krustenmodells scheint der Umsatz zu den GO-2(1*H*)-Pyrazinonen für die Peptide mit neutralen Seitenketten besonders begünstigt zu sein. In Bezug auf die Ergebnisse aus dem Stärke-Peptid-Backmodell, kann vermutet werden, dass mit einem anderen Peptid als Val-Leu ein deutlich ausgeglicheneres Verhältnis der Carboxyalkylderivate zu den 2(1*H*)-Pyrazinonen erzielt worden wäre.

Der Gesamtumsatz der einzelnen Dipeptide zu den N-terminalen Glyoxal-AGEs entsprach im Krustenmodell nicht den Gehalten der Amadori-Produkte. Im Gegenteil zum Krustenmodell wurden für die Peptide mit hohen Gehalten der Amadori-Produkte besonders geringe Gehalte der AGEs bestimmt. Deshalb wurde vermutet, dass umgekehrt eine geringere Bildungsrate oder eine geringe Stabilität der Amadori-Produkte den Umsatz zu den N-terminalen Glyoxal-AGEs erhöhte. Es ist zu vermuten, dass im trockenen Krustenmodell die Bildung der N-terminalen AGEs aus der Schiff'schen Base quantitativ gesehen eine deutlich höhere Relevanz bekommt als im Krustenmodell, da kein Wasser für die Rückreaktion zur Glucose und

dem freien Dipeptid zur Verfügung stand. Daraus kann für die Dipeptide mit einer geringeren Umlagerung zum Amadori-Produkt ein höherer Gehalt der N-terminalen AGEs resultieren.

Mit den Ergebnissen aus dem Krumen- und dem Krustenbackmodell konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die Verfügbarkeit von Wasser einen erheblichen Einfluss auf das Produktspektrum der N-terminalen AGEs hat. Da bei der Bildung der CM-Derivate Wasser benötigt und bei der Bildung der GO-2(1*H*)-Pyrazinone Wasser frei wird, konnten im Krustenmodell überwiegend GO-2(1*H*)-Pyrazinone und im Krumenmodell überwiegend die CM-Derivate quantifiziert werden.

Da sowohl große Unterschiede in den Anteilen der N-terminalen AGEs im Vergleich der Krumen- und Krustenmodelle als auch in Abhängigkeit von den verwendeten Valyldipeptiden beobachtet werden konnten, wurde geschlossen, dass die Bildung der von Glyoxal abgeleiteten N-terminalen AGEs überwiegend über das Iminoglyoxal als gemeinsame Zwischenverbindung erfolgen sollte.

#### 4.4.4 Fazit zum Nachweis N-terminaler AGEs in Lebensmitteln

Aus den Backmodellen kann allgemein für das Vorkommen von N-terminalen, peptidgebundenen AGEs in Lebensmitteln geschlossen werden, dass die Gehalte und das Produktspektrum stark von den Reaktionsbedingungen und der Sequenz der beteiligten Peptide abhängen. Sollen die Gehalte N-terminaler AGEs in Lebensmitteln bewertet werden, müssen sowohl die CM-Derivate als auch die 2(1*H*)-Pyrazinone Berücksichtigung finden. Liegen in Lebensmitteln hauptsächlich freie Aminosäuren und keine Peptide oder Proteine vor, können ausschließlich CM-Derivate und keine 2(1*H*)-Pyrazinone gebildet werden.

In Lebensmitteln wie Milchprodukten, wo quantitativ gesehen eine geringe Vielfalt an Proteinen vorliegt, die einen definierten N-Terminus aufweisen, sollte der Nachweis von N-terminalen AGEs und insbesondere 2(1*H*)-Pyrazinonen möglich sein. In Lebensmitteln mit einer weniger gut definierten Zusammensetzung an Peptiden und Proteinen könnten N-terminale CM-Derivate und 2(1*H*)-Pyrazinone über Screeningmethoden mit automatisierter Auswertung (Proteomics) identifiziert werden. Zur Bewertung der Gesamtglykierung in Lebensmitteln mit einem hohen Anteil freier Aminosäuren können deren Carboxyalkylderivate (CM-, CE-) leicht über eine Screeningmethode mittels Massendetektion erfasst werden, da von 20 Aminosäuren und jeweils zwei Carboxyalkylderivaten ausgegangen werden kann. Dabei können die Molekülonen und deren Fragmentierung auf Grund bekannter Muster vorhergesagt werden.

Besonders hohe Gehalte N-terminaler AGEs können in getrockneten Gemüseprodukten erwartet werden. Über die Gehalte von peptidgebundenen Amadori-Produkten ist zwar bisher nichts bekannt, aber ausgehend von den zum Teil hohen Gehalten der Amadori-Produkte der freien Aminosäuren (*Reutter and Eichner, 1989*), können entsprechend auch hohe Gehalte der Carboxyalkylderivate erwartet werden.

## 5 Zusammenfassung

Das N- $\alpha$ -Fructosylderivat der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins ist ein etablierter Parameter zur Diagnose von Diabetes mellitus (HbA<sub>1c</sub>-Wert). In Modellsystemen und in humanem Hämoglobin wurden bereits einzelne N-terminale AGEs nachgewiesen. Darüber hinaus wurde die Bildung der konkurrierenden N- $\alpha$ -Carboxyalkylderivate und 2(1H)-Pyrazinone an den N-Termini von Peptiden und Proteinen bisher nicht systematisch untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in wie fern die Bildung N-terminaler Amadori-Produkte und Glyoxal-AGEs unter physiologischen Bedingungen von der Aminosäuresequenz abhängt. Im Anschluss sollte der Nachweis der von Glyoxal und Methylglyoxal abgeleiteten N-terminalen AGEs in humanem Hämoglobin erbracht werden. Darüber hinaus sollte das Produktspektrum N-terminaler AGEs in Backwaren untersucht werden.

### Sequenzabhängige Bildung N-terminaler MRPs unter physiologischen Bedingungen

Zur Untersuchung des Einflusses der Aminosäuresequenz auf die Reaktivität der N-terminalen Aminogruppe von Peptiden unter physiologischen Bedingungen wurden die fünf Dipeptide Val-Leu, Val-His, Val-Ser, Val-Tyr und Val-Glu mit Glucose bzw. Glyoxal in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS-Puffer) bei pH = 7,4 und 37 °C inkubiert.

1 Der Umsatz der *Valyldipeptide mit Glucose* lag nach 24 Stunden zwischen 0,26 mmol/mol Dipeptid für Fru-Val-Glu und 0,60 mmol/mol Dipeptid für Fru-Val-His. Die Variation der Aminosäure in C-terminaler Position kann die Reaktivität der N-terminalen Aminogruppe zum Amadori-Produkt also stark beeinflussen. Mit Ausnahme von Val-Glu entsprach die Reaktivitätsreihe einem höheren Umsatz mit höherem pK<sub>S</sub>-Wert der  $\alpha$ -Aminogruppe. Möglicherweise kann die Amadori-Umlagerung durch die höhere Nukleophilie der Aminogruppe katalysiert werden.

2 Aus der *Inkubation der Dipeptide mit Glyoxal* wurden nach 14 Tagen für die Summen aus den jeweiligen CM-Derivaten und Glyoxal-2(1H)-Pyrazinonen Umsätze zwischen 3,2% (Val-Glu) und 22,0% (Val-His) bestimmt. Die Anteile der gebildeten N-terminalen AGEs unterschieden sich zwischen den Dipeptiden deutlich. Der Umsatz der Dipeptide steht vermutlich im Zusammenhang mit dem pK<sub>S</sub>-Wert der  $\alpha$ -Aminogruppe, so dass die initiale Bildung der Schiff'schen Base als geschwindigkeitsbestimmender Schritt interpretiert werden kann. Zusätzlichen Einfluss können katalytische Effekte der Seitenketten von Histidin und Serin haben.

### N-terminale MRPs und MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin in humanem Hämoglobin

Ziel der Arbeit waren der Nachweis und die Quantifizierung der N-terminalen Glyoxal- und Methylglyoxal-AGEs des Hämoglobins in Blutproben von Dialysepatienten (n = 11) mit

terminaler Niereninsuffizienz und einer Kontrollgruppe (n = 9). Über die Gehalte der N-terminalen MRPs und der MRPs der Seitenketten von Lysin und Arginin sollte eine umfassende Bewertung des Glykierungsstatus der Hämoglobinproben ermöglicht werden.

#### *Nachweis und Quantifizierung N-terminaler AGEs*

3 Mittels *enzymatischer Hydrolyse* (Pepsin, Carboxypeptidase Y) konnte nur die Freisetzung der N-terminalen Amadori- und Carboxyalkyl-Produkte des Hämoglobins bis zu den Dipeptid- oder Tripeptidderivaten gezeigt werden. Für eine vollständige Abspaltung der N-terminalen MRPs wurde die *Hydrolyse mit 6 M Salzsäure* (23 h, 110 °C) eingesetzt. Methylglyoxal-2(1H)-Pyrazinone waren ausreichend säurestabil. Für die Glyoxal-2(1H)-Pyrazinone wurden dagegen sowohl ein Abbau als auch eine Neubildung aus den Fructosylderivaten festgestellt. Die Carboxyalkylderivate (CM-Val, CE-Val) sind stabile Endprodukte. Zur chromatographischen Trennung der Analyten wurde eine geeignete RP-HPLC-Methode erarbeitet. Die empfindliche Detektion und die eindeutige Zuordnung erfolgte über charakteristische Massenübergänge sowie den Vergleich mit synthetisierten Referenzstandards.

4 Die N-terminalen AGEs Fru-Val (als FM-Val), CM-Val und das GO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon waren als Derivate des Hämoglobins bereits bekannt. In dieser Arbeit wurden darüber hinaus erstmals das GO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon, das CE-Val, das MGO-Val-His-2(1H)-Pyrazinon und das MGO-Val-Leu-2(1H)-Pyrazinon in humanem Hämoglobin nachgewiesen.

5 Zusätzlich zu den N-terminalen AGEs wurden die Aminosäurederivate Fru-Lys, CML, CEL und MG-H quantifiziert. Die Bestimmung erfolgte nach enzymatischer Totalhydrolyse mittels LC-MS/MS (Teichert et al., 2015; Thornalley et al., 2003).

#### *Gehalte der analysierten MRPs in humanen Hämoglobinproben*

6 Zur Einschätzung des Glykierungsstatus der Probanden wurden die Gehalte der *Fructosylderivate* der N-Termini (Fru-Val), der Seitenkette des Lysins (N-ε-Fru-Lys) sowie der HbA<sub>1c</sub>-Wert bestimmt. Die Mittelwerte aller drei Glykierungsparameter waren in der Gruppe der Dialysepatienten signifikant erhöht. Bei sechs der Dialysepatienten konnte neben der Urämie das Vorliegen eines Diabetes mellitus vermutet werden.

7 Nicht für die einzelnen N-terminalen *Glyoxal-AGEs*, aber für deren Summe und für CML konnten signifikant höhere Mittelwerte für die Dialysepatienten ermittelt werden. Als Ursachen können sowohl der mechanistische Zusammenhang mit der Bildung des Fructosylderivates, als auch der bei Dialysepatienten erhöhte oxidative Stress (Locatelli et al., 2003) vermutet werden. Für CE-Val und die Methylglyoxal-2(1H)-Pyrazinone unterschieden sich die Mittelwerte der Probandengruppen statistisch signifikant. Desweiteren unterschieden sich die Probandengruppen hinsichtlich der CEL-Gehalte, aber nicht der Gehalte von MG-H signifikant. Dieses Ergebnis gibt einen ersten Hinweis, dass die *Methylglyoxal-AGEs* (außer MG-H) des Hämoglobins eine Einschätzung des mittleren Dicarbonylstress über einen längeren Zeitraum ermöglichen können.

### *Korrelationen der Gehalte der MRPs der Hämoglobinproben*

**8** Zwischen Fru-Val, Fru-Lys sowie dem HbA<sub>1c</sub>-Wert konnten für die *Kontrollgruppe* keine Korrelationen ermittelt werden. Die CM-Derivate korrelierten mit den Fructosyl-Derivaten, was wegen deren gemeinsamem Bildungsmechanismus zu erwarten war. Aus negativen Korrelationen der Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone mit CM-Val wurde geschlossen, dass CM-Val ein aufarbeitungsinduziertes Abbauprodukt der Glyoxal-2(1*H*)-Pyrazinone ist. Die Gehalte von CE-Val und auch die Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs korrelierten signifikant mit Fru-Val, weshalb schon bei Normoglykämikern ein Zusammenhang der intrazellulären Konzentration des Methylglyoxals mit der Glucosekonzentration bestehen könnte.

**9** Im Unterschied zur Kontrollgruppe konnten bei den *Dialysepatienten* Korrelationen zwischen Fru-Val, Fru-Lys sowie dem HbA<sub>1c</sub>-Wert ermittelt werden. Die N-terminalen Methylglyoxal-AGEs korrelierten untereinander. Für CEL und MG-H konnten dagegen keine Korrelationen ermittelt werden. Bemerkenswert sind die negativen Korrelationen der Summe der N-terminalen Methylglyoxal-AGEs mit den Fructosylderivaten. Dieser Zusammenhang könnte auf eine verdeckte Hyperglykämie hinweisen und entstehen, wenn niedrige Gehalte der Fructosylderivate aus einem verringerten Erythrozytenalter resultieren, das wiederum durch erhöhten oxidativen und Dicarbonylstress bei Urämikern verursacht wird.

### **N-terminale Glykierung in Modellbackwaren**

In einer Modellbackware auf Basis von Weizenstärke mit Zusatz eines Dipeptids (Val-Leu) wurde der Einfluss des pH-Werts und anschließend in einem Glucose-Peptid-Backmodell der Einfluss des Wassergehalts und der Aminosäuresequenz von Dipeptiden auf das Produktspektrum N-terminaler AGEs unter backtechnologischen Bedingungen untersucht.

#### *Stärke-Peptid-Backmodell*

**10** Als Modellbackwaren wurden Teige aus Weizenstärke, dem Dipeptid Val-Leu und Phosphatpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten (100 mM, pH = 5,6; 7,4; 8,2) verwendet. Nach Erhitzung auf 220 °C für 20 min wurden die Gehalte der von Glyoxal (CM-Val-Leu, GO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon) und Methylglyoxal (CE-Val-Leu, MGO-Val-Leu-2(1*H*)-Pyrazinon) abgeleiteten N-terminalen AGEs quantifiziert. Die Gehalte in den Stärkekrusten entsprachen den Gehalten von CML bzw. CEL in realen Backwaren.

**11** Die vier N-terminalen AGEs konnten in jedem Stärketeig nachgewiesen werden, wobei die Gehalte der 2(1*H*)-Pyrazinone je nach pH-Wert 10- bis 100-fach höher als die Gehalte der Carboxyalkylderivate waren. Im Basischen wurden höhere Gehalte der N-terminalen AGEs bestimmt als im Sauren. Aus dem Stärke-Peptid-Backmodell wurde die These abgeleitet, dass die geringe Verfügbarkeit von Wasser die Bildung der 2(1*H*)-Pyrazinone begünstigte.

### *Glucose-Peptid-Backmodell*

**12** Das zweite Backmodell bestand aus Peptid, Glucose, Cellulose als Teigmatrix und Phosphatpuffer (100 mM, pH = 5,6). Die Erhitzung (40 Minuten, 100 °C) erfolgte einerseits, der Krume einer Backware entsprechend, in einem geschlossenen Gefäß, aus dem kein Wasser entweichen konnte. Die zweite Variante (40 Minuten, 120 °C) sollte der Kruste einer Backware entsprechen, weshalb dem Reaktionsansatz vor der Inkubation das Wasser durch Gefriertrocknung entzogen wurde. Als Kohlenhydratkomponente wurde Glucose eingesetzt, um auch die Bildung der Amadori-Produkte bestimmen zu können. Um den Einfluss der Aminosäuresequenz des Peptids einschätzen zu können, wurden die fünf Valyldipeptide: Val-Leu, Val-His, Val-Ser, Val-Tyr und Val-Glu verwendet.

**13** Die aufsteigende Reihe der Summen der Gehalte der N-terminalen AGEs der jeweiligen Dipeptide entsprach im *Krumenmodell* mit Ausnahme von Val-Glu der aufsteigenden Reihe des zugehörigen Amadori-Produkts. Dieser Zusammenhang kann mechanistisch damit erklärt werden, dass die N-terminalen Glyoxal-AGEs als oxidativ gebildete Nebenprodukte der Amadori-Umlagerung angesehen werden können. Dabei wurden in Abhängigkeit von den Dipeptiden um Faktor 3 bis 50 höhere Gehalte der CM-Derivate als der GO-2(1H)-Pyrazinone erhalten.

**14** Die Gehalte der Amadori-Produkte waren im *Krustenmodell* um Faktor 10 höher als im Krumenmodell. Im Gegensatz zum Krumenmodell wurden im Krustenmodell geringere Gehalte der N-terminalen AGEs bei höheren Gehalten der Amadori-Produkte quantifiziert, was mit einer größeren Relevanz der Bildung der Glyoxal-AGEs direkt aus der Schiff'schen Base erklärt werden kann. Im Krustenmodell wurden höhere Gehalte der GO-2(1H)-Pyrazinone als der CM-Dipeptide (2- bis 40-fach) quantifiziert. Mit den Ergebnissen aus dem Krumen- und dem Krustenbackmodell konnte bestätigt werden, dass die Verfügbarkeit von Wasser einen erheblichen Einfluss auf das Produktspektrum der N-terminalen AGEs hat.

### **Fazit**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals systematisch die Sequenzabhängigkeit der Bildung der Fructosylderivate sowie der CM-Derivate in Konkurrenz zu den Glyoxal-2(1H)-Pyrazinonen am N-Terminus von Peptiden unter physiologischen und backtechnologischen Bedingungen untersucht. Dabei wurde nachgewiesen, dass die Variation der C-terminalen Aminosäure in Dipeptiden den Glykierungsgrad und das Produktspektrum erheblich beeinflusst. Am Beispiel von Backwaren wurde für Lebensmittel gezeigt, dass unter trockenen Reaktionsbedingungen die 2(1H)-Pyrazinone und in wasserhaltigen Systemen die Carboxyalkylderivate bevorzugt zu erwarten sind. Mit dem konsequenten Nachweis der N-terminalen von Glyoxal und Methylglyoxal ableitbaren Carboxyalkylderivate und 2(1H)-Pyrazinone in humanen Hämoglobin wurde die Relevanz der N-terminalen Glykierung *in vivo* untermauert. Damit wird eine umfassendere Beurteilung der Glykierung insbesondere bei Urämikern und Diabetikern ermöglicht.

## Literaturverzeichnis

- Abordo, E A, Minhas, H S, Thornalley, P J. (1999). Accumulation of alpha-oxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.*, 58, 641–8.
- Acharya, A S, Manning, J M. (1980). Reactivity of the amino groups of carbonmonoxyhemoglobin S with glyceraldehyde. *J. Biol. Chem.*, 255, 1406–1412.
- Acharya, A S, Sussman, L G, Manning, J M. (1983). Schiff base adducts of glyceraldehyde with hemoglobin. Differences in the Amadori rearrangement at the alpha-amino groups. *J. Biol. Chem.*, 258, 2296–2302.
- Agalou, S, Ahmed, N, Babaei-Jadidi, R, Dawnay, A, Thornalley, P J. (2005a). Profound mishandling of protein glycation degradation products in uremia and dialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16, 1471–1485.
- Agalou, S, Ahmed, N, Thornalley, P J, Dawnay, A. (2005b). Advanced glycation end product free adducts are cleared by dialysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1043, 734–9.
- Ahmed, M U, Brinkmann Frye, E, Degenhardt, T P, Thorpe, S R, Baynes, J W. (1997). N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.*, 324, 565–70.
- Ahmed, M U, Thorpe, S R, Baynes, J W. (1986). Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.*, 261, 4889–94.
- Ahmed, N, Argirov, O K, Minhas, H S, Cordeiro, C A A, Thornalley, P J. (2002). Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified a. *Biochem. J.*, 364, 1–14.
- Ahmed, N, Babaei-Jadidi, R, Howell, S K, Beisswenger, P J, Thornalley, P J. (2005a). Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia*, 48, 1590–1603.
- Ahmed, N, Babaei-Jadidi, R, Howell, S K, Thornalley, P J, Beisswenger, P J. (2005b). Glycated and oxidized protein degradation products are indicators of fasting and postprandial hyperglycemia in diabetes. *Diabetes Care*, 28, 2465–71.
- Ahmed, N, Mirshekar-Syahkal, B, Kennish, L, Karachalias, N, Babaei-Jadidi, R, Thornalley, P J. (2005c). Assay of advanced glycation endproducts in selected beverages and food by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 691–699.
- Al-Abed, Y, Bucala, R. (1995). N-ε-carboxymethyllysine formation by direct addition of glyoxal to lysine during the Maillard reaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5, 2161–2162.
- Allen, D W, Schroeder, W A, Balog, J. (1958). Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin: A study of the effects of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 1628–1634.
- Alt, N, Schieberle, P. (2005). Model studies on the influence of high hydrostatic pressure on the formation of glycated arginine modifications at elevated temperatures. *J. Agric. Food*

- Chem.*, 53, 5789–97.
- Alvarez, M E, White, C B, Gregory, J, Kydd, G C, Harris, A, Sun, H H, Gillum, A M, Cooper, R. (1995). Phevalin, a new calpain inhibitor, from a *Streptomyces* sp. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 48, 1165–1167.
- Ames, J M. (1990). Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends Food Sci. Technol.*, 1, 150–154.
- Amon, D. (2010). Untersuchungen zum Einfluss der Aminosäuresequenz auf die Bildung N-terminaler 2(1H)-Pyrazinone. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- An, G, Widness, J A, Mock, D M, Veng-Pedersen, P. (2016). A novel physiology-based mathematical model to estimate red blood cell lifespan in different human age groups. *AAPS J.*, 18, 1182–91.
- Arai, K, Maguchi, S, Fujii, S, Ishibashi, H, Oikawa, K, Taniguchi, N. (1987). Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. Identification of the in vitro glycated sites. *J. Biol. Chem.*, 262, 16969–16972.
- Assar, S H, Moloney, C, Lima, M, Magee, R, Ames, J M. (2009). Determination of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Amino Acids*, 36, 317–26.
- Baker, J R, Zyzak, D V., Thoroe, S R, Baynes, J W. (1994). Chemistry of the fructosamine assay: D-glucosone is the product of oxidation of Amadori compounds. *Clin. Chem.*, 40, 1950–1955.
- Beisswenger, P J, Howell, S K, O'Dell, R M, Wood, M E, Touchette, A D, Szwegold, B S. (2001). alpha-Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. *Diabetes Care*, 24, 726–732.
- Beisswenger, P J, Howell, S K, Russell, G, Miller, M E, Rich, S S, Mauer, M. (2014). Detection of diabetic nephropathy from advanced glycation endproducts (AGEs) differs in plasma and urine, and is dependent on the method of preparation. *Amino Acids*, 46, 311–9.
- Belitz, H-D, Grosch, W, Schieberle, P. (2008). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* (6th ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Biemel, K M, Conrad, J, Lederer, M O. (2002). Unexpected carbonyl mobility in aminoketoses: The key to major Maillard crosslinks. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 41, 801–804.
- Brands, C M J, van Boekel, M A J S. (2002). Kinetic modeling of reactions in heated monosaccharide-casein systems. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6725–6739.
- Brandt, A, Erbersdobler, H F. (1972). Zur Bestimmung von Furosin in Nahrungs- und Futtermitteln. *Landwirtsch. Forsch.*, 28/II, 115–119.
- Braunitzer, G. (1964). The molecular weight of human haemoglobin. *Bibl. Haematol.*, 18, 59–60.
- Brinkmann, E, Wells-Knecht, K J, Thorpe, S R, Baynes, J W. (1995). Characterization of an imidazolium compound formed by reaction of methylglyoxal and N-alpha-hippuryllysine. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1, 2817–2818.
- Brönsted, J N, Guggenheim, E A. (1927). Contribution to the theory of acid and basic catalysis. The mutarotation of glucose. *J. Am. Chem. Soc.*, 49, 2554–2584.

- Bry, L, Chen, P C, Sacks, D B. (2001). Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin. Chem.*, 47, 153–63.
- Bunn, H F, Briehl, R W. (1970). The interaction of 2,3-diphosphoglycerate with various human hemoglobins. *J. Clin. Invest.*, 49, 1088–1095.
- Bunn, H F, Gabbay, K H, Gallop, P M. (1978). The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science*, 200, 21–7.
- Bunn, H F, Haney, D N, Kamin, S, Gabbay, K H, Gallop, P M. (1976). The biosynthesis of human hemoglobin A1c. Slow glycosylation of hemoglobin in vivo. *J. Clin. Invest.*, 57, 1652–9.
- Bunn, H F, Higgins, P J. (1981). Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*, 213, 222–4.
- Bunn, H F, Shapiro, R, McManus, M, Garrick, L, McDonald, M J, Gallop, P M, Gabbay, K H. (1979). Structural heterogeneity of human hemoglobin A due to nonenzymatic glycosylation. *J. Biol. Chem.*, 254, 3892–8.
- Cai, J, Hurst, H E. (1999). Identification and quantitation of N-(carboxymethyl)valine adduct in hemoglobin by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 34, 537–43.
- Caldwell, J J, Veillard, N, Collins, I. (2012). Design and synthesis of 2(1H)-pyrazinones as inhibitors of protein kinases. *Tetrahedron*, 68, 9713–9728.
- Capon, R, Rooney, F, Murray, L, Collins, E, Sim, A, Rostas, J, Butler, M, Carroll, A. (1998). Dragmacidins: new protein phosphatase inhibitors from a southern Australian deep-water marine sponge, spongosorites sp. *J. Nat. Prod.*, 61, 660–2.
- Cappellini, M, Cohen, A, Porter, J, Taher, A, Viprakasit, V. (2014). Guidelines for the management of transfusion dependent thalassaemia (TDT) [Internet]. *Guidelines for the Management of Transfusion Dependent Thalassaemia (TDT)* (3rd editio). Nicosia (CY): Thalassaemia International Federation; 2014.
- Chen, D, Crimmins, D L, Hsu, F F, Lindberg, F P, Scott, M G. (1998). Hemoglobin Raleigh as the cause of a falsely increased hemoglobin A(1C) in an automated ion-exchange HPLC method. *Clin. Chem.*, 44, 1296–1301.
- Clegg, M D, Schroeder, W A. (1959). A chromatographic study of the minor components of normal adult human hemoglobin including a comparison of hemoglobin from normal and phenylketonuric individuals. *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 6065–6069.
- Coban, E, Ozdogan, M, Timuragaoglu, A. (2004). Effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobin A1c in nondiabetic patients. *Acta Haematol.*, 112, 126–128.
- Cohen, R M, Franco, R S, Khera, P K, Smith, E P, Lindsell, C J, Ciraolo, P J, Palascak, M B, Clinton, H J. (2008). Red cell life span heterogeneity in hematologically normal people is sufficient to alter HbA1c. *Blood*, 112, 4284–4291.
- Cohen, R M, Snieder, H, Lindsell, C J, Beyan, H, Hawa, M I, Blinko, S, Edwards, R, Spector, T D, Leslie, R D G. (2006). Evidence for independent heritability of the glycation gap (glycosylation gap) fraction of HbA1c in nondiabetic twins. *Diabetes Care*, 29, 1739–1743.
- Coletta, M, Amiconi, G, Bellelli, A, Bertollini, A, Carsky, J, Castagnola, M, Condò, S, Brunori, M. (1988). Alteration of T-state binding properties of naturally glycosylated hemoglobin, HbA1c. *J. Mol. Biol.*, 203, 233–9.
- Collard, F, Delpierre, G, Stroobant, V, Matthijs, G, Van Schaftingen, E. (2003). A

- mammalian protein homologous to fructosamine-3-kinase is a ketosamine-3-kinase acting on psicosamines and ribulosamines but not on fructosamines. *Diabetes*, 52, 2888–2895.
- Collard, F, Vertommen, D, Fortpied, J, Duester, G, Van Schaftingen, E. (2007). Identification of 3-deoxyglucosone dehydrogenase as aldehyde dehydrogenase 1A1 (retinaldehyde dehydrogenase 1). *Biochimie*, 89, 369–73.
- Corens, D, Carpentier, M, Schroven, M, Meerpoel, L. (2004). Liquid chromatography–mass spectrometry with chemiluminescent nitrogen detection for on-line quantitative analysis of compound collections: advantages and limitations. *J. Chromatogr. A*, 1056, 67–75.
- Cura, A J, Carruthers, A. (2012). Role of monosaccharide transport proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism, and homeostasis. *Compr. Physiol.*, 2, 863–914.
- Cutignano, A, Bifulco, G, Bruno, I, Casapullo, A, Gomez-Paloma, L, Riccio, R. (2000). Dragmacidin F: A new antiviral bromoindole alkaloid from the mediterranean sponge *halicortex* sp. *Tetrahedron*, 56, 3743–3748.
- Davidek, T, Clety, N, Aubin, S, Blank, I. (2002). Degradation of the Amadori compound N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)glycine in aqueous model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5472–5479.
- Davidek, T, Devaud, S, Robert, F, Blank, I. (2006a). Sugar fragmentation in the maillard reaction cascade: isotope labeling studies on the formation of acetic acid by a hydrolytic beta-dicarbonyl cleavage mechanism. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6667–76.
- Davidek, T, Kraehenbuehl, K, Devaud, S, Robert, F, Blank, I. (2005). Analysis of Amadori compounds by high-performance cation exchange chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 77, 140–147.
- Davidek, T, Robert, F, Devaud, S, Vera, F A, Blank, I. (2006b). Sugar fragmentation in the Maillard reaction cascade: Formation of short-chain carboxylic acids by a new oxidative  $\alpha$ -dicarbonyl cleavage pathway. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6677–6684.
- Davidek, T, Velisek, J, Davidek, J, Pech, P. (1991). Glycylglycine-derived 1,3-disubstituted imidazole in nonenzymic browning reactions. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1374–1377.
- de Bruyn, C A L, van Ekenstein, W A. (1895). Einwirkung von Alkalien auf Kohlenhydrate. Wechselseitige Umwandlung von Glucose, Fructose und Mannose in einander. *Berichte Der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, 28, 3078–3082.
- De Rosa, M C, Sanna, M T, Messana, I, Castagnola, M, Galtieri, a, Tellone, E, Scatena, R, Botta, B, Botta, M, Giardina, B. (1998). Glycated human hemoglobin (HbA1c): functional characteristics and molecular modeling studies. *Biophys. Chem.*, 72, 323–35.
- Degen, J. (2014). Vorkommen und metabolischer Transit alimentärer 1,2-Dicarbonylverbindungen. *Dissertation*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- Degen, J, Beyer, H, Heymann, B, Hellwig, M, Henle, T. (2014). Dietary influence on urinary excretion of 3-deoxyglucosone and its metabolite 3-deoxyfructose. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 2449–2456.
- Degen, J, Vogel, M, Richter, D, Hellwig, M, Henle, T. (2013). Metabolic transit of dietary methylglyoxal. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 10253–60.
- del Castillo, M D, Villamiel, M, Olano, A, Corzo, N. (2000). Use of 2-furoylmethyl derivatives of GABA and arginine as indicators of the initial steps of maillard reaction in orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4217–20.

- Delanghe, J, De Slypere, J P, De Buyzere, M, Robbrecht, J, Wieme, R, Vermeulen, A. (1989). Normal reference values for creatine, creatinine, and carnitine are lower in vegetarians. *Clin. Chem.*, *35*, 1802–3.
- Delpierre, G, Rider, M H, Collard, F, Stroobant, V, Vanstapel, F, Santos, H, Van Schaftingen, E. (2000a). Identification, cloning, and heterologous expression of a mammalian fructosamine-3-kinase. *Diabetes*, *49*, 1627–34.
- Delpierre, G, Vanstapel, F, Stroobant, V, Van Schaftingen, E. (2000b). Conversion of a synthetic fructosamine into its 3-phospho derivative in human erythrocytes. *Biochem. J.*, *352*, 835–839.
- Delpierre, G, Veiga-da-Cunha, M, Vertommen, D, Buysschaert, M, Van Schaftingen, E. (2006). Variability in erythrocyte fructosamine 3-kinase activity in humans correlates with polymorphisms in the FN3K gene and impacts on haemoglobin glycation at specific sites. *Diabetes Metab.*, *32*, 31–39.
- Delpierre, G, Vertommen, D, Communi, D, Rider, M H, Van Schaftingen, E. (2004). Identification of fructosamine residues deglycated by fructosamine-3-kinase in human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, *279*, 27613–27620.
- Delplanque, J, Delpierre, G, Opperdoes, F R, Van Schaftingen, E. (2004). Tissue distribution and evolution of fructosamine 3-kinase and fructosamine 3-kinase-related protein. *J. Biol. Chem.*, *279*, 46606–46613.
- Dunn, J A, Ahmed, M U, Murtiashaw, M H, Richardson, J M, Walla, M D, Thorpe, S R, Baynes, J W. (1990). Reaction of ascorbate with lysine and protein under autoxidizing conditions: formation of N $\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine by reaction between lysine and products of autoxidation of ascorbate. *Biochemistry*, *29*, 10964–10970.
- Dutcher, J D. (1947). Aspergillilic acid - An antibiotic substance produced by *Aspergillus flavus*. 1. General properties - formation of desoxyaspergillilic acid - structural conclusions. *J. Biol. Chem.*, *171*, 321–339.
- Fenaille, F, Parisod, V, Visani, P, Populaire, S, Tabet, J-C, Guy, P A. (2006). Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study. *Int. Dairy J.*, *16*, 728–739.
- Finke, A, Kobold, U, Hoelzel, W, Weykamp, C, Miedema, K, Jeppson, J-O. (1998). Preparation of a candidate primary reference material for the international standardization of HbA1c determinations. *Clin. Chem. Lab. Med.*, *36*, 299–308.
- Finot, P A, Viani, R, Bricout, J, Mauron, J. (1969). Detection and identification of pyridosine, a second lysine derivative obtained upon acid hydrolysis of heated milk. *Experientia*, *25*, 134–5.
- Flückiger, R, Winterhalter, K H. (1976). In vitro synthesis of hemoglobin A1c. *FEBS Lett.*, *71*, 356–360.
- Foerster, A. (2007). Quantitative Studien zu Vorkommen und metabolischem Transit alimentärer Maillard-Reaktions-Produkte. *Dissertation*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- Fujii, E, Iwase, H, Ishii-Karakasa, I, Yajima, Y, Hotta, K. (1995). The presence of 2-keto-3-deoxygluconic acid and oxoaldehyde dehydrogenase activity in human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *210*, 852–857.
- Fujita, T, Suzuki, K, Tada, T, Yoshihara, Y, Hamaoka, R, Uchida, K, Matuo, Y, Sasaki, T, Hanafusa, T, Taniguchi, N. (1998). Human erythrocyte bisphosphoglycerate mutase: inactivation by glycation in vivo and in vitro. *J. Biochem.*, *124*, 1237–1244.

- Gallagher, E J, Le Roith, D, Bloomgarden, Z. (2009). Review of hemoglobin A(1c) in the management of diabetes. *J. Diabetes*, *1*, 9–17.
- Garg, N K, Stoltz, B M. (2006). A unified synthetic approach to the pyrazinone drarmacidins. *Chem. Commun. (Camb)*, 3769–3779.
- Garlick, R L, Mazer, J S, Higgins, P J, Bunn, H F. (1983). Characterization of glycosylated hemoglobins. Relevance to monitoring of diabetic control and analysis of other proteins. *J. Clin. Invest.*, *71*, 1062–1072.
- Garner, M H, Bogardt, R A, Gurd, F R. (1975). Determination of the pK values for the alpha-amino groups of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, *250*, 4398–404.
- Gillery, P. (2013). A history of HbA1c through clinical chemistry and laboratory medicine. *Clin. Chem. Lab. Med.*, *51*, 65–74.
- Glomb, M A, Monnier, V M. (1995). Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J. Biol. Chem.*, *270*, 10017–26.
- Glomb, M A, Pfahler, C. (2001). Amides are novel protein modifications formed by physiological sugars. *J. Biol. Chem.*, *276*, 41638–47.
- Glomb, M A, Rösch, D, Nagaraj, R H. (2001). N(delta)-(5-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine-2-yl)-l-ornithine, a novel methylglyoxal-arginine modification in beer. *J. Agric. Food Chem.*, *49*, 366–72.
- Glomb, M A, Tschirnich, R. (2001). Detection of alpha-dicarbonyl compounds in Maillard reaction systems and in vivo. *J. Agric. Food Chem.*, *49*, 5543–50.
- Gobert, J, Glomb, M A. (2009). Degradation of glucose: reinvestigation of reactive alpha-Dicarbonyl compounds. *J. Agric. Food Chem.*, *57*, 8591–7.
- Hamada, Y, Nakamura, J, Naruse, K, Komori, T, Kato, K, Kasuya, Y, Nagai, R, Horiuchi, S, Hotta, N. (2000). Epalrestat, an aldose reductase inhibitor, reduces the levels of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine protein adducts and their precursors in erythrocytes from diabetic patients. *Diabetes Care*, *23*, 1539–1544.
- Harano, T, Harano, K, Shibata, S, Ueda, S, Mori, H, Arimasa, N. (1983). Hemoglobin Okayama [beta 2 (NA 2) His replaced by Gln]: a new “silent” hemoglobin variant with substituted amino acid residue at the 2,3-diphosphoglycerate binding site. *FEBS Lett.*, *156*, 20–2.
- Harano, T, Harano, K, Ueda, S, Imai, K, Ohkuma, A, Koya, Y, Takahashi, H. (1990). Hb Fukuoka [beta 2(NA2)His----Tyr]: a new mutation at the 2,3-diphosphoglycerate binding site. *Hemoglobin*, *14*, 199–205.
- Hau, J, Devaud, S, Blank, I. (2004). Detection of Amadori compounds by capillary electrophoresis coupled to tandem mass spectrometry. *Electrophoresis*, *25*, 2077–2083.
- Hayami, J. (1961). Studies on the Chemical Decomposition of Simple Sugars. XII. Mechanism of the Acetol Formation. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, *34*, 927–932.
- Hayashi, T, Namiki, M. (1980). Formation of two-carbon sugar fragment at an early stage of the browning reaction of sugar with amine. *Agric. Biol. Chem.*, *44*, 2575–2580.
- Hegele, J, Buetler, T, Delatour, T. (2008a). Comparative LC-MS/MS profiling of free and protein-bound early and advanced glycation-induced lysine modifications in dairy products. *Anal. Chim. Acta*, *617*, 85–96.
- Hegele, J, Parisod, V, Richoz, J, Förster, A, Maurer, S, Krause, R, Henle, T, Bütler, T,

- Delatour, T. (2008b). Evaluating the extent of protein damage in dairy products: simultaneous determination of early and advanced glycation-induced lysine modifications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1126, 300–6.
- Hellwig, M. (2011). Proteolytische Freisetzung und epithelialer Transport von Maillard-Reaktionsprodukten und Crosslink-Aminosäuren. *Dissertation*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- Hellwig, M, Henle, T. (2014). Backen, Altern, Diabetes: eine kurze Geschichte der Maillard-Reaktion. *Angew. Chemie*, 126, 10482–10496.
- Henle, T. (2003). AGEs in foods: do they play a role in uremia? *Kidney Int. Suppl.*, 63, S145–S147.
- Henle, T, Walter, A W, Haeßner, R, Klostermeyer, H. (1994). Detection and identification of a protein-bound imidazolone resulting from the reaction of arginine residues and methylglyoxal. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 199, 55–58.
- Henle, T, Walter, H, Klostermeyer, H. (1991). Evaluation of the extent of the early Maillard-reaction in milk products by direct measurement of the Amadori-product lactuloselysine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 193, 119–22.
- Henle, T, Zehetner, G, Klostermeyer, H. (1995). Fast and sensitive determination of furosine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 200, 235–237.
- Henning, C, Liehr, K, Girndt, M, Ulrich, C, Glomb, M A. (2014). Extending the spectrum of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in vivo. *J. Biol. Chem.*, 289, 28676–88.
- Henning, C, Smuda, M, Girndt, M, Ulrich, C, Glomb, M A. (2011). Molecular basis of Maillard amide-advanced glycation end product (AGE) formation in vivo. *J. Biol. Chem.*, 286, 44350–44356.
- Herman, W H, Cohen, R M. (2010). Hemoglobin A1c: teaching a new dog old tricks. *Ann. Intern. Med.*, 152, 815–7.
- Hill, R J, Davis, R W. (1967). The pK of specific groups of proteins. I. The alpha-amino group of the alpha chain of human CO-hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 242, 2005–12.
- Hodge, J E. (1953). Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 1, 928–943.
- Hofmann, T. (1999). Quantitative studies on the role of browning precursors in the Maillard reaction of pentoses and hexoses with l -alanine. *Eur. Food Res. Technol.*, 209, 113–121.
- Hofmann, T, Bors, W, Stettmaier, K. (1999). Studies on radical intermediates in the early stage of the nonenzymatic browning reaction of carbohydrates and amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 379–90.
- Hollnagel, A, Kroh, L W. (2000). Degradation of oligosaccharides in nonenzymatic browning by formation of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds via a “peeling off” mechanism. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 6219–6226.
- Hollnagel, A, Kroh, L W. (2002). 3-Deoxypentosulose: An  $\alpha$ -dicarbonyl compound predominating in nonenzymatic browning of oligosaccharides in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1659–1664.
- Holmquist, W R, Schroeder, W A. (1966). A new N-terminal blocking group involving a Schiff base in hemoglobin A1c. *Biochemistry*, 5, 2489–503.
- Huisman, T H, Dozy, A M. (1962). Studies on the heterogeneity of hemoglobin. V. Binding of hemoglobin with oxidized glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 60, 302–19.

- Hull, G L J, Woodside, J V, Ames, J M, Cuskelly, G J. (2012). N $\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet. *Food Chem.*, *131*, 170–174.
- Iberg, N, Flückiger, R. (1986). Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites. *J. Biol. Chem.*, *261*, 13542–13545.
- Iijima, K, Murata, M, Takahara, H, Irie, S, Fujimoto, D. (2000). Identification of N(omega)-carboxymethylarginine as a novel acid-labile advanced glycation end product in collagen. *Biochem. J.*, *347 Pt 1*, 23–7.
- Iwamoto, H, Motomiya, Y, Miura, K, Morisawa, M, Yoshimura, Y, Maruyama, I. (2001). Immunochemical assay of hemoglobin with N $\epsilon$ -(Carboxymethyl)lysine at lysine 66 of the  $\beta$  chain. *Clin. Chem.*, *47*, 1249–1255.
- Izzo, H V., Ho, C-T. (1992). Peptide-specific Maillard reaction products: a new pathway for flavor chemistry. *Trends Food Sci. Technol.*, *3*, 253–257.
- Jacquez, J A. (1984). Red blood cell as glucose carrier: significance for placental and cerebral glucose transfer. *Am. J. Physiol.*, *246*, R289-298.
- Jakas, A, Katić, A, Bionda, N, Horvat, Š. (2008). Glycation of a lysine-containing tetrapeptide by d-glucose and d-fructose-influence of different reaction conditions on the formation of Amadori/Heyns products. *Carbohydr. Res.*, *343*, 2475–2480.
- Jeppsson, J-O, Kobold, U, Barr, J, Finke, A, Hoelzel, W, Hoshino, T, Miedema, K, Mosca, A, Mauri, P, Paroni, R, Thienpont, L, Umemoto, M, Weykamp, C. (2002). Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin. Chem. Lab. Med.*, *40*, 78–89.
- Johansen, M B, Kiemer, L, Brunak, S. (2006). Analysis and prediction of mammalian protein glycation. *Glycobiology*, *16*, 844–853.
- John, G, English, E. (2012). IFCC standardised HbA(1c): should the world be as one? *Clin. Chem. Lab. Med.*, *50*, 1243–8.
- Karg, E, Papp, F, Tassi, N, Janáky, T, Wittmann, G, Túri, S. (2009). Enhanced methylglyoxal formation in the erythrocytes of hemodialyzed patients. *Metabolism.*, *58*, 976–82.
- Kasper, M, Schieberle, P. (2005). Labeling studies on the formation pathway of Nepsilon-carboxymethyllysine in maillard-type reactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, *1043*, 59–62.
- Kerner, W, Brückel, J. (2015). Diabetologie und Stoffwechsel - Praxisempfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft. *Diabetol. Und Stoffwechsel*, S97–S132.
- Khera, P K, Joiner, C H, Carruthers, A, Lindsell, C J, Smith, E P, Franco, R S, Holmes, Y R, Cohen, R M. (2008). Evidence for interindividual heterogeneity in the glucose gradient across the human red blood cell membrane and its relationship to hemoglobin glycation. *Diabetes*, *57*, 2445–2452.
- Khera, P K, Smith, E P, Lindsell, C J, Rogge, M C, Haggerty, S, Wagner, D A, Palascak, M B, Mehta, S, Hibbert, J M, Joiner, C H, Franco, R S, Cohen, R M. (2015). Use of an oral stable isotope label to confirm variation in red blood cell mean age that influences HbA1c interpretation. *Am. J. Hematol.*, *90*, 50–55.
- Koenig, R J, Blobstein, S H, Cerami, A. (1977). Structure of carbohydrate of hemoglobin A(1c). *J. Biol. Chem.*, *252*, 2992–2997.
- Koenig, R J, Cerami, A. (1975). Synthesis of hemoglobin A1c in normal and diabetic mice: potential model of basement membrane thickening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *72*, 3687–91.

- Koenig, R J, Peterson, C M, Jones, R L, Saudek, C, Lehrman, M, Cerami, A. (1976). Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 295, 417–420.
- Krause, R. (2005). Untersuchungen zur Bildung von Furosin und N-terminalen 2(1H)-Pyrazinonen. *Dissertation*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- Krause, R, Knoll, K, Henle, T. (2003). Studies on the formation of furosine and pyridosine during acid hydrolysis of different Amadori products of lysine. *Eur. Food Res. Technol.*, 4, 277–283.
- Krause, R, Oehme, A, Wolf, K, Henle, T. (2006). A convenient HPLC assay for the determination of fructosamine-3-kinase activity in erythrocytes. *Anal. Bioanal. Chem.*, 386, 2019–2025.
- Krause, Kuehn, J, Penndorf, I, Knoll, K, Henle, T. (2004). N-Terminal pyrazinones: a new class of peptide-bound advanced glycation end-products. *Amino Acids*, 27, 9–18.
- Kunert, I. (2009). Untersuchungen zur N-terminalen Glykierung und Bildung N-terminaler 2(1H)-Pyrazinonstrukturen in Lebensmitteln und in vivo. *Dissertation*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- Kyeremeh, K, Acquah, K, Camas, M, Tabudravu, J, Houssen, W, Deng, H, Jaspars, M. (2014). Butrepyrazinone, a new pyrazinone with an unusual methylation pattern from a ghanaiian verrucosisspora sp. K51G. *Mar. Drugs*, 12, 5197–5208.
- Labossiere, A, Vella, F, Hiebert, J, Galbraith, P. (1972). Hemoglobin Deer Lodge: 2 2 2 His leads to Arg. *Clin. Biochem.*, 5, 46–50.
- Lamberts, L, Rombouts, I, Delcour, J A. (2008). Study of nonenzymic browning in  $\alpha$ -amino acid and  $\gamma$ -aminobutyric acid/sugar model systems. *Food Chem.*, 111, 738–744.
- Laroque, D, Inisan, C, Berger, C, Vouland, É, Dufossé, L, Guérard, F. (2008). Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. *Food Chem.*, 111, 1032–1042.
- Lederer, M O, Klaiber, R G. (1999). Cross-linking of proteins by maillard processes: characterization and detection of lysine–arginine cross-links derived from glyoxal and methylglyoxal. *Bioorg. Med. Chem.*, 7, 2499–2507.
- Ledl, F, Schleicher, E. (1990). Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angew. Chemie*, 102, 597–626.
- Liardon, R, De Weck-Gaudard, D, Philippossian, G, Finot, P A. (1987). Identification of N-epsilon-carboxymethyllysine: a new Maillard reaction product in rat urine. *J. Agric. Food Chem.*, 35, 427–431.
- Löbner, J, Degen, J, Henle, T. (2015). Creatine is a scavenger for methylglyoxal under physiological conditions via formation of N-(4-methyl-5-oxo-1-imidazol-2-yl)sarcosine (MG-HCr). *J. Agric. Food Chem.*, 63, 2249–56.
- Locatelli, F, Canaud, B, Eckardt, K-U, Stenvinkel, P, Wanner, C, Zoccali, C. (2003). Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 18, 1272–1280.
- Löffler, G, Petrides, P E, Heinrich, P C. (2007). Biochemie und Pathobiochemie (8th ed.). Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Loidl-Stahlhofen, A, Spittler, G. (1994). alpha-Hydroxyaldehydes, products of lipid

- peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1211, 156–60.
- Losinski, R. (2012). Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung N-terminaler Maillard-Prpdukte an humanem Hämoglobin. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- Lowrey, C H, Lyness, S J, Soeldner, J S. (1985). The effect of hemoglobin ligands on the kinetics of human hemoglobin A(1c) formation. *J. Biol. Chem.*, 260, 11611–11618.
- Lowry, T M. (1903). Studies of dynamic isomerism. I. The mutarotation of glucose. *J. Chem. Soc. Trans.*, 83, 1314.
- Maessen, D E, Hanssen, N M, Scheijen, J L, van der Kallen, C J, van Greevenbroek, M M, Stehouwer, C D, Schalkwijk, C G. (2015). Post-glucose load plasma  $\alpha$ -dicarbonyl concentrations are increased in individuals with impaired glucose metabolism and type 2 diabetes: The CODAM study. *Diabetes Care*, 38, dc142605.
- Maillard, L C. (1912). The action of amino acids on sugar; The formation of melanoidin by a methodic route. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 154, 66–68.
- Maple, S R, Allerhand, A. (1987). Detailed tautomeric equilibrium of aqueous D-glucose. Observation of six tautomers by ultrahigh resolution carbon-13 NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 3168–3169.
- Martins, S, Marcelis, A, van Boekel, M. (2003). Kinetic modelling of Amadori N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-glycine degradation pathways. Part I. Reaction mechanism. *Carbohydr. Res.*, 338, 1651–1663.
- Martins, S, van Boekel, M. (2005). Kinetics of the glucose/glycine Maillard reaction pathways: influences of pH and reactant initial concentrations. *Food Chem.*, 92, 437–448.
- McDonald, M J, Bleichman, M, Bunn, H F, Noble, R W. (1979). Functional properties of the glycosylated minor components of human adult hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 254, 702–707.
- McLellan, A C, Thornalley, P J. (1989). Glyoxalase activity in human red blood-cells fractioned by age. *Mech. Ageing Dev.*, 48, 63–71.
- Meitinger, M, Hartmann, S, Schieberle, P. (2014). Development of stable isotope dilution assays for the quantitation of Amadori compounds in foods. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 5020–7.
- Meltretter, J, Wüst, J, Pischetsrieder, M. (2013). Comprehensive analysis of nonenzymatic post-translational  $\beta$ -lactoglobulin modifications in processed milk by ultrahigh-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 6971–6981.
- Meltretter, J, Wüst, J, Pischetsrieder, M. (2014). Modified peptides as indicators for thermal and nonthermal reactions in processed milk. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 10903–15.
- Miyata, T, Sugiyama, S, Saito, A, Kurokawa, K. (2001). Reactive carbonyl compounds related uremic toxicity (“carbonyl stress”). *Kidney Int.*, 59, 25–31.
- Mock, D M, Matthews, N I, Zhu, S, Strauss, R G, Schmidt, R L, Nalbant, D, Cress, G A, Widness, J A. (2011). Red blood cell (RBC) survival determined in humans using RBCs labeled at multiple biotin densities. *Transfusion*, 51, 1047–1057.
- Mori, N, Bai, Y, Ueno, H, Manning, J M. (1989). Sequence-dependent reactivity of model peptides with glyceraldehyde. *Carbohydr. Res.*, 189, 49–63.

- Mossine, V V., Linetsky, M, Glinsky, G V., Ortwerth, B J, Feather, M S. (1999). Superoxide free radical generation by Amadori compounds: the role of acyclic forms and metal ions. *Chem. Res. Toxicol.*, *12*, 230–6.
- Müller, T. (2012). Untersuchungen zur Bildung N-terminaler Amadori-Produkte und ausgewählter AGEs unter simulierten Backbedingungen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- Neglia, C I, Cohen, H J, Garber, A R, Ellis, P D, Thorpe, S R, Baynes, J W. (1983). <sup>13</sup>C NMR investigation of nonenzymatic glucosylation of protein. Model studies using RNase A. *J. Biol. Chem.*, *258*, 14279–83.
- Nerlich, M. (2011). Untersuchungen zum Einfluss der Aminosäuresequenz auf die Bildung N-terminaler 2(1H)-Pyrazinone und Carboxymethylverbindungen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- Nguyen, H T, van der Fels-Klerx, H J, van Boekel, M A J S. (2014). N- $\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine: A review on analytical methods, formation, and occurrence in processed food, and health impact. *Food Rev. Int.*, *30*, 36–52.
- Nicolay, J P, Schneider, J, Niemoeller, O M, Artunc, F, Portero-Otin, M, Haik, G, Thornalley, P J, Schleicher, E, Wieder, T, Lang, F. (2006). Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal. *Cell. Physiol. Biochem.*, *18*, 223–32.
- Odani, H, Shinzato, T, Matsumoto, Y, Usami, J, Maeda, K. (1999). Increase in three alpha,beta-dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific in vivo determination of intermediates in advanced Maillard reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *256*, 89–93.
- Oh, Y C, Shu, C K, Ho, C T. (1992). Formation of novel 2(1H)-pyrazinones as peptide-specific Maillard reaction products. *J. Agric. Food Chem.*, *40*, 118–121.
- Okada, Y. (2009). Overview in 45 years of studies on peptide chemistry. *Yakugaku Zasshi*, *129*, 1141–1154.
- Oya, T, Hattori, N, Mizuno, Y, Miyata, S, Maeda, S, Osawa, T, Uchida, K. (1999). Methylglyoxal modification of protein: chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *J. Biol. Chem.*, *274*, 18492–18502.
- Paulsen, E P. (1973). Hemoglobin A1C in childhood diabetes. *Metabolism*, *22*, 269–271.
- Penndorf, I, Biedermann, D, Maurer, S V, Henle, T. (2007). Studies on N-terminal glycation of peptides in hypoallergenic infant formulas: quantification of alpha-N-(2-furoylmethyl) amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, *55*, 723–727.
- Penndorf, I, Li, C, Schwarzenbolz, U, Henle, T. (2008). N-terminal glycation of proteins and peptides in foods and in vivo: evaluation of N-(2-furoylmethyl)valine in acid hydrolyzates of human hemoglobin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, *1126*, 118–123.
- Peßler, A. (2013). Glykierung und oxidativer Stress bei Diabetes. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- Peterson, C M, Jones, R L, Koenig, R J, Melvin, E T, Lehrman, M L. (1977). Reversible hematologic sequelae of diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.*, *86*, 425–429.
- Phillips, S A, Thornalley, P J. (1993). The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.*,

- 212, 101–105.
- Prey, V, Petershofer, G. (1968). Melanoidin precursors. *Zeitschrift Fuer Die Zuckerindustrie*, 18, 63–66.
- Rabbani, N, Thornalley, P J. (2012). Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino Acids*, 42, 1133–42.
- Rabbani, N, Thornalley, P J. (2014). The critical role of methylglyoxal and glyoxalase 1 in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 63, 50–52.
- Rahbar, S, Blumenfeld, O, Ranney, H M. (1969). Unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36, 838–843.
- Reihl, O, Rothenbacher, T M, Lederer, M O, Schwack, W. (2004). Carbohydrate carbonyl mobility – the key process in the formation of  $\alpha$ -dicarbonyl intermediates. *Carbohydr. Res.*, 339, 1609–1618.
- Reindel, F, Hoppe, W. (1954). Über eine Färbemethode zum Anfärben von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen auf Papierchromatogrammen und Papierelektropherogrammen. *Chem. Ber.*, 87, 1103–1107.
- Ren, X. (2011). Untersuchung der Bildung von AGEs (speziell 2(1H)-Pyrazinone und Carboxymethyl-Verbindungen) in Modellbackwaren. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- Resmini, P, Pellegrino, P, Battelli, G. (1990). Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Ital. J. Food Sci.*, 2, 173–183.
- Reutter, M, Eichner, K. (1989). Trennung und Bestimmung von Amadori-Verbindungen mittels HPLC und Nachsäulenreaktion. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 188, 28–35.
- Roberts, A P, Story, C J, Ryall, R G. (1984). Erythrocyte 2,3-bisphosphoglycerate concentrations and haemoglobin glycosylation in normoxic Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 26, 389–391.
- Salomaa, P, Adamson, A W, Bostrup, O, Theorell, H, Thorell, B. (1956). The kinetics of the cannizzaro reaction of glyoxal. *Acta Chem. Scand.*, 10, 311–319.
- Sanderson, P E. (1999). Small, noncovalent serine protease inhibitors. *Med. Res. Rev.*, 19, 179–97.
- Sanz, M L, Del Maria Dolores, C, Corzo, N, Olano, A. (2003). 2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4278–4283.
- Sanz, del Castillo, M D, Corzo, N, Olano, A. (2000). Presence of 2-furoylmethyl derivatives in hydrolysates of processed tomato products. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 468–471.
- Sanz, del Castillo, M D, Corzo, N, Olano, A. (2001). Formation of Amadori compounds in dehydrated fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5228–5231.
- Schalkwijk, C G, Stehouwer, C D A, van Hinsbergh, V W M. (2004). Fructose-mediated non-enzymatic glycation: Sweet coupling or bad modification. *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, 20, 369–382.
- Scheijen, J L J M, Clevers, E, Engelen, L, Dagnelie, P C, Brouns, F, Stehouwer, C D A, Schalkwijk, C G. (2016). Analysis of advanced glycation endproducts in selected food items by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: Presentation of a dietary AGE database. *Food Chem.*, 190, 1145–1150.
- Schnedl, W J, Reisinger, E C, Lipp, R W, Hopmeier, P, Krejs, G J. (1995). Hemoglobin

- variants recently detected in Austria. *Ann. Hematol.*, *71*, 185–187.
- Schnedl, W J, Trinker, M, Lipp, R W. (1999). HbA1c determination in patients with hemoglobinopathies. *Diabetes Care*, *22*, 368–369.
- Schreppel, K. (2007). Komplexbildungseigenschaften von Isomaltol und Pyrralin. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- Schwarzenbolz, U, Henle, T, Haeßner, R, Klostermeyer, H. (1997). On the reaction of glyoxal with proteins. *Zeitschrift Für Leb. Und -Forsch. A*, *205*, 121–124.
- Schwarzenbolz, U, Hofmann, T, Sparmann, N, Henle, T. (2016). Free Maillard reaction products in milk reflect nutritional intake of glycated proteins and can be used to distinguish “organic” and “conventionally” produced milk. *J. Agric. Food Chem.*, *64*, 5071–8.
- Schwietzke, U, Malinowski, J, Zerge, K, Henle, T. (2011). Quantification of Amadori products in cheese. *Eur. Food Res. Technol.*, *233*, 243–251.
- Shan, X Q, Aw, T Y, Jones, D P. (1990). Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol. Ther.*, *47*, 61–71.
- Shapiro, R, McManus, M J, Zalut, C, Bunn, H F. (1980). Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A. *J. Biol. Chem.*, *255*, 3120–3127.
- Shimada, S, Tanaka, Y, Ohmura, C, Tamura, Y, Shimizu, T, Uchino, H, Watada, H, Hirose, T, Nakaniwa, T, Miwa, S, Kawamori, R. (2005). N-(carboxymethyl)valine residues in hemoglobin (CMV-Hb) reflect accumulation of oxidative stress in diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, *69*, 272–278.
- Shipanova, I N, Glomb, M a, Nagaraj, R H. (1997). Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch. Biochem. Biophys.*, *344*, 29–36.
- Simonis-Bik, A M C, Eekhoff, E M W, Diamant, M, Boomsma, D I, Heine, R J, Dekker, J M, Willemsen, G, van Leeuwen, M, de Geus, E J C. (2008). The heritability of HbA1c and fasting blood glucose in different measurement settings. *Twin Res. Hum. Genet.*, *11*, 597–602.
- Smith, R J, Koenig, R J, Binnerts, A, Soeldner, J S, Aoki, T T. (1982). Regulation of hemoglobin A1c formation in human erythrocytes in vitro. Effects of physiologic factors other than glucose. *J. Clin. Invest.*, *69*, 1164–8.
- Smuda, M, Glomb, M A. (2011). Novel insights into the maillard catalyzed degradation of maltose. *J. Agric. Food Chem.*, *59*, 13254–13264.
- Smuda, M, Glomb, M A. (2013). Fragmentation pathways during Maillard-induced carbohydrate degradation. *J. Agric. Food Chem.*, *61*, 10198–208.
- Snieder, H, Sawtell, P A, Ross, L, Walker, J, Spector, T D, Leslie, R D. (2001). HbA(1c) levels are genetically determined even in type 1 diabetes: evidence from healthy and diabetic twins. *Diabetes*, *50*, 2858–63.
- Soria, A C, Olano, A, Frías, J, Peñas, E, Villamiel, M. (2009). 2-Furoylmethyl amino acids, hydroxymethylfurfural, carbohydrates and  $\beta$ -carotene as quality markers of dehydrated carrots. *J. Sci. Food Agric.*, *89*, 267–273.
- Souci, S W, Fachmann, W, Kraut, H. (2008). Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen (7.th ed.). Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

- Starke, D. (2013). Enzymatische Freisetzung und Quantifizierung N-terminaler AGE-Modifikationen von Hämoglobin. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- Takahashi, K. (1968). The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.*, *243*, 6171–6179.
- Takahashi, K. (1977). The reactions of phenylglyoxal and related reagents with amino acids. *J. Biochem.*, *81*, 395–402.
- Tattersall, R B, Pyke, D a, Ranney, H M, Bruckheimer, S M. (1975). Hemoglobin components in diabetes mellitus: studies in identical twins. *N. Engl. J. Med.*, *293*, 1171–1173.
- Teerlink, T, Barto, R, Ten Brink, H J, Schalkwijk, C G. (2004). Measurement of N-epsilon-(carboxymethyl)lysine and N-epsilon-(carboxyethyl)lysine in human plasma protein by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.*, *50*, 1222–1228.
- Teichert, T, Hellwig, A, Peßler, A, Hellwig, M, Vossoughi, M, Sugiri, D, Vierkötter, A, Schulte, T, Freund, J, Roden, M, Hoffmann, B, Schikowski, T, Luckhaus, C, Krämer, U, Henle, T, Herder, C. (2015). Association between advanced glycation end products and impaired fasting glucose: results from the SALIA study. *PLoS One*, *10*, e0128293.
- Theis, C, Hänsch, M, Pätzold, R, Brückner, H. (2008). Synthese und säulenchromatographische Reinigung von Amadoriverbindungen. *Lebensmittelchemie*, *62*, 17.
- Thornalley, P J. (1988). Modification of the glyoxalase system in human red blood-cells by glucose in vitro. *Biochem. J.*, *254*, 751–755.
- Thornalley, P J. (1996). Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol.*, *27*, 565–73.
- Thornalley, P J. (1998). Glutathione-dependent detoxification of alpha-oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors. *Chem. Biol. Interact.*, *111–112*, 137–51.
- Thornalley, P J, Battah, S, Ahmed, N, Karachalias, N, Agalou, S, Babaei-Jadidi, R, Dawnay, A. (2003). Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.*, *375*, 581–592.
- Thornalley, P J, Hooper, N I, Jennings, P E, Florkowski, C M, Jones, A F, Lunec, J, Barnett, A H. (1989). The human red blood cell glyoxalase system in diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, *7*, 115–120.
- Thornalley, P J, Jahan, I, Ng, R. (2001). Suppression of the accumulation of triosephosphates and increased formation of methylglyoxal in human red blood cells during hyperglycaemia by thiamine in vitro. *J. Biochem.*, *129*, 543–549.
- Thornalley, P J, Langborg, A, Minhas, H S. (1999). Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.*, *344*, 109.
- Tilton, R G, Baier, L D, Harlow, J E, Smith, S R, Ostrow, E, Williamson, J R. (1992). Diabetes-induced glomerular dysfunction: links to a more reduced cytosolic ratio of NADH/NAD<sup>+</sup>. *Kidney Int*, *41*, 778–788.
- Trivelli, L A, Ranney, H M, Lai, H T. (1971). Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, *284*, 353–357.
- Troise, A D, Fiore, A, Roviello, G, Monti, S M, Fogliano, V. (2015). Simultaneous

- quantification of amino acids and Amadori products in foods through ion-pairing liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Amino Acids*, *47*, 111–124.
- Tsukushi, S, Kajita, M, Nakamura, S, Niwa, T. (2002). Gas chromatographic–mass spectrometric determination of erythrocyte 3-deoxyglucosone in diabetic patients. *J. Chromatogr. B*, *776*, 133–137.
- Uchimura, T, Nakano, K, Hashiguchi, T, Iwamoto, H, Miura, K, Yoshimura, Y, Hanyu, N, Hirata, K, Imakuma, M, Motomiya, Y, Maruyama, I. (2001). Elevation of N-(carboxymethyl)valine residue in hemoglobin of diabetic patients - Its role in the development of diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, *24*, 891–896.
- van Boekel, M A J S. (2006). Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnol. Adv.*, *24*, 230–233.
- Van Chuyen, N, Kurata, T, Fujimaki, M. (1973a). Formation of N-[2(3-alkylpyrazin-2-on-1-yl)acyl]amino acids or -peptides on heating tri- or tetrapeptides with glyoxal. *Agric. Biol. Chem.*, *37*, 1613–1618.
- Van Chuyen, N, Kurata, T, Fujimaki, M. (1973b). Formation of N-Carboxymethyl Amino Acid from the Reaction of  $\alpha$ -Amino Acid with Glyoxal. *Agric. Biol. Chem.*, *37*, 2209–2210.
- Van Chuyen, N, Kurata, T, Fujimaki, M. (1973c). Studies on the Reaction of Dipeptides with Glyoxal. *Agric. Biol. Chem.*, *37*, 327–334.
- Van der Jagt, D L, Hunsaker, L A. (2003). Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.*, *143–144*, 341–351.
- Van der Jagt, D L, Robinson, B, Taylor, K K, Hunsaker, L A. (1992). Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. *J. Biol. Chem.*, *267*, 4364–4369.
- Van Eupen, M G a, Schram, M T, Colhoun, H M, Hanssen, N M J, Niessen, H W M, Tarnow, L, Parving, H H, Rossing, P, Stehouwer, C D a, Schalkwijk, C G. (2013). The methylglyoxal-derived AGE tetrahydropyrimidine is increased in plasma of individuals with type 1 diabetes mellitus and in atherosclerotic lesions and is associated with sVCAM-1. *Diabetologia*, *56*, 1845–1855.
- Venkatraman, J, Aggarwal, K, Balaram, P. (2001). Helical peptide models for protein glycation: proximity effects in catalysis of the Amadori rearrangement. *Chem. Biol.*, *8*, 611–625.
- Vinale, F, Fogliano, V, Schieberle, P, Hofmann, T. (1999). Development of a stable isotope dilution assay for an accurate quantification of protein-bound N(epsilon)-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-lysine using a (13)C-labeled internal standard. *J. Agric. Food Chem.*, *47*, 5084–5092.
- Voigt, M, Glomb, M A. (2009). Reactivity of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose; A key intermediate in the maillard chemistry of hexoses. *J. Agric. Food Chem.*, *57*, 4765–4770.
- Voigt, M, Smuda, M, Pfahler, C, Glomb, M A. (2010). Oxygen-dependent fragmentation reactions during the degradation of 1-deoxy-d-erythro-hexo-2,3-diulose. *J. Agric. Food Chem.*, *58*, 5685–5691.
- Vos, F E, Schollum, J B, Coulter, C V., Doyle, T C A, Duffull, S B, Walker, R J. (2011). Red blood cell survival in long-term dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.*, *58*, 591–598.
- Watkins, N G, Neglia-Fisher, C I, Dyer, D G, Thorpe, S R, Baynes, J W. (1987). Effect of

- phosphate on the kinetics and specificity of glycation of protein. *J. Biol. Chem.*, 262, 7207–7212.
- Watkins, N G, Thorpe, S R, Baynes, J W. (1985). Glycation of amino groups in protein. Studies on the specificity of modification of RNase by glucose. *J. Biol. Chem.*, 260, 10629–10636.
- Weenen, H. (1998). Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry. *Food Chem.*, 62, 393–401.
- Wellner, A. (2012). Zusammenhang zwischen der Glykierung und dem allergenen Potential von Karotte (*Daucus carota* L.) und Erdnuss (*Arachis hypogaea* L.). *Dissertation*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- Wellner, A, Huettl, C, Henle, T. (2011). Formation of Maillard reaction products during heat treatment of carrots. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 7992–7998.
- Wells-Knecht, K J, Brinkmann, E, Ji, J W B. (1995a). Characterization of an Imidazolium Salt Formed from Glyoxal and Na-Hippuryllsine: A Model for Maillard Reaction Crosslinks in Proteins. *J. Org. Chem.*, 60, 6246–6247.
- Wells-Knecht, K J, Zyzak, D V, Litchfield, J E, Thorpe, S R, Baynes, J W. (1995b). Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*, 34, 3702–3709.
- Werner, A F. (2011). Untersuchungen zur Bildung von 1,2-Dicarbonylverbindungen und AGEs in Modellbackwaren. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*. Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.
- Weykamp, C W, Penders, T J, Siebelder, C W M, Muskiet, F a J, Van der Slik, W. (1993). Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography, and enzyme immunoassay. *Clin. Chem.*, 39, 138–142.
- Wilker, S C, Chellan, P, Arnold, B M, Nagaraj, R H. (2001). Chromatographic quantification of argpyrimidine, a methylglyoxal-derived product in tissue proteins: comparison with pentosidine. *Anal. Biochem.*, 290, 353–358.
- Wolff, S P, Crabbe, M J C, Thornalley, P J. (1984). The autoxidation of glyceraldehyde and other simple monosaccharides. *Experientia*, 40, 244–246.
- Wright, A E, Pomponi, S A, Cross, S S, McCarthy, P. (1992). A new bis-(indole) alkaloid from a deep-water marine sponge of the genus *Spongosorites*. *J. Org. Chem.*, 57, 4772–4775.
- Wyatt, M A, Wang, W, Roux, C M, Beasley, F C, Heinrichs, D E, Dunman, P M, Magarvey, N A. (2010). *Staphylococcus aureus* nonribosomal peptide secondary metabolites regulate virulence. *Science*, 329, 294–296.
- Xue, M, Rabbani, N, Thornalley, P J. (2011). Glyoxalase in ageing. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 22, 293–301.
- Yan, B, Zhao, J, Leopold, K, Zhang, B, Jiang, G. (2007). Structure-dependent response of a chemiluminescence nitrogen detector for organic compounds with adjacent nitrogen atoms connected by a single bond. *Anal. Chem.*, 79, 718–726.
- Yaylayan, V A, Huyghues-Despointes, A. (1994). Chemistry of Amadori rearrangement products: analysis, synthesis, kinetics, reactions, and spectroscopic properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 34, 321–369.

- Yaylayan, V A, Huyghues-Despointes, A. (1996). Identification of per-O-(trimethylsilyl) derivatives of aldoses generated from thermal decomposition of N-(1-deoxy-d-fructopyranos-1-yl)proline: reversibility of the Amadori rearrangement. *Carbohydr. Res.*, 286, 179–187.
- Yaylayan, V A, Keyhani, A. (2000). Origin of carbohydrate degradation products in L-Alanine/D-[(13)C]glucose model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2415–2419.
- Zeng, Y-T, Huang, S-Z, Qiu, X-K, Cheng, G-C, Ren, Z-R, Jin, Q-C, Chen, C-Y, Jiao, C-T, Tang, Z-G, Liu, R-H, Bao, X-H, Zeng, L-Z, Duan, Y-Q, Zhang, G-Y. (1984). Hemoglobin Chongqing [ $\alpha$ 2(NA2)LEU→ARG] and hemoglobin Harbin [ $\alpha$ 16(A14)LYS→MET] found in China. *Hemoglobin*, 8, 569–581.
- Ziemer, D C, Kolm, P, Weintraub, W S, Vaccarino, V, Rhee, M K, Twombly, J G, Narayan, K M V, Koch, D D, Phillips, L S. (2010). Glucose-independent, black-white differences in hemoglobin A1c levels: a cross-sectional analysis of 2 studies. *Ann. Intern. Med.*, 152, 770–777.
- Zimmermann, M, Fischbach, M A. (2010). A family of pyrazinone natural products from a conserved nonribosomal peptide synthetase in *Staphylococcus aureus*. *Chem. Biol.*, 17, 925–930.

## Danksagung

Vor allem möchte ich mich bei Herrn Prof. Thomas Henle für das entgegengebrachte Vertrauen und die Chance bedanken, das eigenständige wissenschaftliche Arbeiten in seinem Arbeitskreis erlernen zu können. Bedanken möchte ich mich für das sehr interessante Thema und die Freiheiten in der Umsetzung der wissenschaftlichen Fragestellung.

Herrn Prof. Lothar Kroh von der Technischen Universität Berlin danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Meinen Diplomanden Frau Daniela Amon, Herrn Mario Nerlich, Frau Xiaofei Ren, Frau Franziska Werner, Frau Tina Müller, Herrn Rico Losinski, Frau Diane Starke und Herrn Holm Ackermann danke ich für die sehr angenehme Zusammenarbeit und ihr Engagement in der wissenschaftlichen Arbeit.

Frau Karla Schlosser danke ich für die Durchführung der zahlreichen Aminosäureanalysen. Bei Herrn Dr. Uwe Schwarzenbolz möchte ich mich für die Aufnahme von Massenspektren und das stets offene Ohr bei technischen Problemen bedanken. Frau Anett Rudolph und Frau Dr. Margrit Gruner danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren, sowie Frau Anke Peritz für die Durchführung von Elementaranalysen.

Den Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundliche Stimmung und die stets willkommene Hilfsbereitschaft. Dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Thomas Simat, insbesondere Herrn Sebastian Säger, bin ich für die Möglichkeit der Nutzung der HPLC-CLND-Anlage dankbar.

Besonders großer Dank gilt den Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. Thomas Henle für die stets offene Art der Zusammenarbeit, den wissenschaftlichen Austausch und das warme Gemeinschaftsgefühl. Hervorheben möchte ich als unsichtbare Dirigentin hinter den Kulissen Frau Uta Paul.

Frau Julia Degen, Frau Susanne Kaiser und Frau Diana Lunow danke ich für die schöne gemeinsame Zeit während der Promotion.

Meiner Familie möchte ich dafür danken, dass sie mir stets bedingungslos den Rücken gestärkt hat.

## Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Professur für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Thomas Henle angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Technischen Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften vom 23.02.2011, zuletzt geändert durch Beschlüsse des Fakultätsrates vom 15.06.2011 und 18.06.2014, in allen Teilen an. Weiterhin versichere ich, dass bisher kein früheres erfolgloses Promotionsverfahren stattgefunden hat.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift