

## Die Bedeutung der Maillard-Reaktion in der menschlichen Physiologie

E. Schleicher

Institute für Klinische Chemie und Diabetesforschung, Krankenhaus München-Schwabing, München

**Zusammenfassung:** Mehr als 50 Jahre nachdem Maillard (26) die Reaktion von Aminosäuren mit Glucose beschrieben hatte, wurde gefunden, daß diese Reaktion auch unter physiologischen Bedingungen im menschlichen Körper abläuft. Zuerst war entdeckt worden, daß humanes Hämoglobin proteingebundene Amadoriprodukte enthält, die bei Diabetikern mit erhöhten Blutglucosewerten vermehrt waren. Die Bestimmung von fruktosyliertem Hämoglobin ist bereits zur Beurteilung der diabetischen Stoffwechselbelastung weitverbreitet. Bald darauf wurde nachgewiesen, daß auch andere Proteine wie z. B. Albumin, Linsencrystallin, Proteine der Gerinnungskaskade, Kollagene, Lipoproteine, Zellmembranproteine und andere dieser postribosomalen Modifikation unterliegen, die zu Veränderung von Struktur und Funktion des betreffenden Proteins führen kann. Später wurde erkannt, daß langlebige Proteine altersabhängig braun, fluoreszierend und unlöslich werden. Da diese späten Stadien der Maillardreaktion bei Diabetikern schneller auftreten, wurde vermutet, daß die Maillardreaktion zur Pathophysiologie des Alterns und zur Entstehung der diabetischen Spätschäden beiträgt. Obwohl die ursächliche Beteiligung der Maillardprodukte bei der Entwicklung diabetischer Spätschäden noch nicht verstanden wird, werden bereits klinische Versuche mit dem Medikament Aminoguanidin gemacht, welches die Bildung von späten Maillardprodukten verhindert.

**Summary:** More than 50 years after Maillard's original paper describing the reaction of amino acids with glucose it was found that this reaction also occurs under physiological conditions in the human body. Initially, it was discovered that human hemoglobin contains protein-bound Amadori-products that are increased in diabetic patients with elevated blood glucose levels. Measurements of fructosylated hemoglobin are now widely used as an index of glycemia in diabetes. It was soon recognized that this postribosomal modification is common to other proteins in vivo like albumin, lens crystallins, proteins of the clotting cascade, collagens, lipoproteins, proteins of the cell membrane, and others. This may lead to alterations in structure and function of the respective protein. Later, the realization that long-lived proteins become browned, fluorescent, and insoluble with age, and at an accelerated rate in diabetes, suggested that later stages of the Maillard reaction might proceed in vivo and contribute to some of the pathophysiology associated with both aging and diabetes. Although the contribution of the Maillard products to the development of diabetic late complications is not fully understood, attempts are

---

**Abbreviation index:** AGE = advanced glycation end products; HPLC = high pressure liquid chromatography; LDL = low density lipoprotein; HbA<sub>1c</sub> = fruktosyliertes Hämoglobin.

being made to prevent formation of late Maillard product with aminoguanidine, a drug currently under clinical testing.

**Schlüsselwörter:** Maillardreaktion, Pathophysiologie, Aminoguanidin, postribosomale Modifikation

**Key words:** Maillard reaction, pathophysiology, advanced glucosylation end products, aminoguanidine, postribosomal modification

## 1 Einleitung

1969 berichtete Rahbar (30) anlässlich seiner Suche nach Hämoglobin-Anomalien über eine schnell wandernde Hämoglobinfaktion in der Agar-Gel-Elektrophorese, die bei ca. 2000 Proben zweimal auftrat. Bei beiden Patienten wurde ein Diabetes mellitus diagnostiziert. Weitergehende Untersuchungen ergaben, daß diese Komponente, wenn auch in geringerem Maße, auch bei gesunden Personen auftritt. Die chemische Charakterisierung dieser Hämoglobinkomponente zeigte, daß das Hämoglobin in einer postribosomalen Reaktion mit D-Glucose modifiziert werden kann (11). Ausführliche In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen ergaben, daß die Glucose – entsprechend der in der Lebensmittelchemie als erste Stufe der Bräunungsreaktion bekannten Reaktion von D-Glucose mit Aminogruppen – auch unter physiologischen Bedingungen gebunden werden kann.

Nachdem in der letzten Dekade gezeigt wurde, daß fast jedes Protein unter physiologischen Bedingungen einer nichtenzymatischen Bräunungsreaktion (Maillard Reaktion) (26) unterliegen kann, wurde zunehmend versucht, funktionelle und strukturelle Veränderungen des jeweiligen Proteins nachzuweisen. Diese Untersuchungen sollten den Zusammenhang zwischen der Entwicklung diabetischer Spätschäden und der metabolischen Störung aufzeigen. Bei der Lokalisation diabetischer Spätschäden fällt auf, daß analog zum Alterungsprozeß die Schäden bevorzugt an denjenigen Geweben aufraten, die dem Blutglucosespiegel ausgesetzt sind (5). Das sind neben den extrazellulär vorliegenden Bindegewebsproteinen vor allem die Blutgefäße, insbesondere die Blutgefäßkapillaren in Augen und Nieren. Da viele diabetische Spätschäden einem frühzeitigen Alterungsprozeß ähnlich sind, wäre es denkbar, daß die Glucose infolge ihrer Reaktion mit Proteinen ursächlich für diesen langsam fortschreitenden Prozeß verantwortlich ist. Vereinfacht ausgedrückt würde das bedeuten: Jeder Mensch „verzuckert“ im Laufe seines Lebens; die „Verzuckerung“ eines Diabetikers verläuft allerdings schneller als die eines Nichtdiabetikers.

## 2 Bildung und Struktur von fruktosylierten Proteinen

Entsprechend der bei der Hämoglobin-Elektrophorese schneller wandernden Banden wurden bei der Chromatographie von humanem Hämoglobin an schwach sauren Ionenaustauschern drei Hämoglobinfaktionen ( $\text{HbA}_{1a}$ ,  $\text{HbA}_{1b}$  und  $\text{HbA}_{1c}$ ) gefunden, die vor der Hauptfraktion  $\text{HbA}_0$  eluierten. Diese schnellen Hämoglobine (Sammelbegriff  $\text{HbA}_1$ ), die normalerweise nur ca. 5–8 % des Gesamthämoglobins ausmachen, unterschei-

den sich nur durch zusätzliche kovalent gebundene Substanzen. Da das HbA<sub>1c</sub> auch durch In-vitro-Inkubation von HbA<sub>o</sub> und Glucose erhalten werden kann, war klar, daß die Synthese von HbA<sub>1c</sub> über die Addition von Glucose an Aminogruppen des Hämoglobins via Schiffscher Base zum Ketosylamin verläuft (Abb. 1) (22). Die Reaktion wurde ursprünglich als nichtenzymatische Glucosylierung von Proteinen bezeichnet, weil – im Gegensatz zu der Vielzahl der enzymatisch gebildeten Glycoproteine – Glucose ohne Enzymkatalyse an das Protein gebunden wird. Zwar ist Glucose der Reaktionspartner, aber nach Amadori-Umlagerung liegt keine Glucosestruktur mehr vor. Daher wurde empfohlen, die Bezeichnung „non enzymatic glucosylation“ nicht mehr zu verwenden (2). Der vorgeschlagene Begriff „glycation“ weist allerdings weder auf die Entstehung noch auf die chemische Struktur der Amadori-Verbindung hin. Aus diesem Grunde schlagen wir vor, die Reaktion als Fruktosylierung von Proteinen zu bezeichnen, da nach Amadori-Umlagerung aus dem Glucosylamin immer eine Amino-1-desoxy-N-Fruktose entsteht. Bevorzugte Fruktosylierungsstelle beim Hämoglobin ist der Aminoterminus der Beta-Kette, während der Aminoterminus der Alpha-Ketten etwa 1/10 weniger fruktosyliert ist (41). Von den 22 ε-Aminogruppen der Alpha- und Beta-Ketten werden nur 3 bevorzugt fruktosyliert.

Die Bildung des fruktosylierten Hämoglobins, des humanen Serumalbumins und verschiedener anderer Serumproteine (4) wurden ausführlich untersucht. Dabei zeigte sich, daß unter „Steady-state“-Bedingungen der Anteil des fruktosylierten Proteins proportional zur Glucosekonzentration und zur Fruktosylierungsgeschwindigkeit ist und umgekehrt proportional zur Abbaurate des jeweiligen Proteins. Da der Fruktosylierungsgrad im „steady state“ und die Fruktosylierungsgeschwindigkeit für jedes Protein gemessen werden kann, läßt sich bei gegebener, konstanter Glucosekonzentration (im menschlichen Körper ca. 4,4 mM) die Abbaukonstante und damit auch die Proteinhalbwertszeit berechnen (37).

Umgekehrt ist, bei Kenntnis der Abbaurate, der Fruktosylierungsgrad eines Proteins ein Maß für die Glucosekonzentration, der dieses Protein während seiner „Lebenszeit“ ausgesetzt war. Die Fruktosylierung kann somit als endogene, nicht radioaktive „Markierung“ von Proteinen ange-

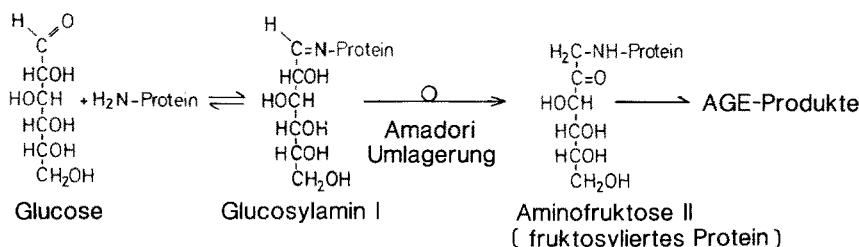


Abb. 1. Reaktion von D-Glucose mit freien Aminogruppen von Proteinen. Nach primärer Bildung von Glycosylamin (I) entsteht nach Amadori-Umlagerung ein stabiles 1-Amino-1-desoxyfruktosederivat (II). Als freie Aminogruppen reagieren die ε-Aminogruppen von Lysinresten und beim menschlichen Hämoglobin auch merklich (3–6 %) die Aminogruppe des N-terminalen Valins der β-Kette. II reagiert langsam in der späten Maillard-Reaktion zu sogenannten AGE-Produkten.

sehen werden, die zur Abschätzung von Proteinhalbwertszeiten verwendet werden kann.

In einer Modellreaktion, bei der durch tägliche Entnahme und Zugabe von Albumin der In-vivo-Protein-Turnover simuliert wurde, haben wir gezeigt, daß vergleichbare Fruktosylierungswerte wie *in vivo* erhalten werden (37).

Die Struktur von fruktosylierten Proteinen wurde von Neglia et al. (28)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektroskopisch untersucht. Als Modellprotein wurde RNase A aus Rinderpankreas verwendet. Die Ergebnisse zeigten, daß entsprechend der Ringbildung freier Hexosen die proteingebundenen Hexosen fast ausschließlich in Ringform vorliegen. Sowohl das Aldimin als auch das Ketoamin liegen bevorzugt als Beta-Anomer in pyranosider Form vor. Da die Referenzverbindungen N<sup>a</sup>-Formyl-N<sup>e</sup>-Fruktoselysin und fruktosyliertes Poly-L-Lysin entsprechend der Resonanzen wie fruktosylierte RNase A zeigten, dürfte der Einfluß der Proteinmatrix auf die Konformation der Hexose gering sein.

Zur Simulation der Verhältnisse im menschlichen oder tierischen Organismus wird die Zuckerkomponente Glucose mit der Aminkomponente (z. B. einem Protein, bei pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl und 37 °C) inkubiert und das Gemisch anschließend gereinigt und analysiert. In diesem Modellsystem läßt sich auch der Verlauf der Maillard-Reaktion mit Fluoreszenzmessungen verfolgen. Die Reaktionsprodukte werden mit Hilfe der üblichen Chromatographieverfahren (HPLC, Ausschluß, Ionenaustauschchromatographie, Verteilung) getrennt und mit verschiedenen Detektionsmethoden nachgewiesen. Die Verwendung von radioaktiven oder mit stabilen Isotopen markierten Ausgangsverbindungen erleichtert die Suche nach Reaktionsprodukten und gibt Hinweise auf den Reaktionsmechanismus.

### 3 Nachweis von fruktosylierten Proteinen

Für die quantitative Bestimmung von humanen fruktosylierten Proteinen eignen sich die in der Lebensmittelchemie verwendeten Methoden meist nur nach wesentlicher Modifikation, da sie zu unempfindlich und zu unspezifisch sind. So läßt sich das nach stark saurer Hydrolyse entstehende Furosin, das als Maß für die Hitzeschädigung von Lebensmitteln, insbesondere Milchprodukten, durch nichtenzymatische Bräunung verwendet werden kann, nicht ohne weiteres übertragen (16, 17). Mit Hilfe einer speziellen HPLC-Methode können noch 50 pMol in 5–25 µg Protein spezifisch und präzise bestimmt werden (36).

Auch die in der Lebensmittelchemie häufig verwendete Bestimmung von 5-Hydroxymethylfurfural, das nach leicht saurer Hydrolyse aus fruktosylierten Proteinen entsteht, kann nur unter speziellen Bedingungen verwendet werden, da die Ausbeute stark von Reaktionsbedingungen (Proteinkonzentration, Temperatur, Säurekonzentration) abhängt (14). Versuche, fruktosyliertes Hämoglobin mit Phenylhydrazin als Karonylreagens nachzuweisen, scheiterten wegen ungenügender Reaktivität (19). Obwohl frühe Versuche zeigten, daß fruktosylierte Proteine nur nach Reduktion zum entsprechenden Hexitantigen sind, wurde kürzlich ein monoklonaler Antikörper, der gegen fruktosyliertes Protein gerichtet ist,

beschrieben. Mit Hilfe dieses Antikörpers wurde ein Enzymimmunoassay entwickelt, der  $\epsilon$ -Lysin-fruktosylierte Proteine spezifisch und quantitativ nachweist (13). Ob der Antikörper an alle fruktosylierten Lysinreste quantitativ bindet oder sterisch gehindert ist, wurde nicht nachgewiesen.

Fruktoxylierte Aminosäuren und Peptide binden spezifisch an Matrixgebundener Borsäure durch Borsäureesterbildung (6). Eigene Untersuchungen zeigten, daß die Borsäureesterbildung auch mit substituierten Phenylboronsäuren in homogener wässriger Lösung stattfindet. Da sich das Absorptionsmaximum nach Esterbildung zu kürzeren Wellenlängen verschiebt, können fruktoxylierte Proteine nach Boronsäureesterbildung photometrisch quantifiziert werden (38).

Das frühzeitig zum Nachweis von Amadori-Verbindungen verwendete charakteristische Reduktionsverhalten wird neuerdings auch für die Quantifizierung von fruktoxylierten Serumproteinen verwendet. In alkalischer Lösung enolisiert die Ketoaminstruktur fruktoxylierter Proteine zum stark reduzierenden Enaminol, das sich durch verschiedene Redox-indikatoren nachweisen läßt. Da das entstehende Redukton ebenfalls reduzierende Eigenschaften hat, ist erstens die Stöchiometrie der Reaktion nicht eindeutig und zweitens der Endpunkt der Reaktion nicht klar definiert. Bestimmt man die Reduktion kinetisch unter Verwendung von Nitrotetrazoliumblau als Reduktionsmittel, nachdem andere reduzierende Substanzen innerhalb der ersten 10 Minuten abreaktierten, so erhält man eine relative Spezifität der Reaktion (23). Da diese Methode relativ billig und einfach zu automatisieren ist, hat sie neuerdings in der Kontrolle der Stoffwechselinstellung von Diabetikern Verbreitung gefunden.

#### 4 Amadori-Produkte im menschlichen Organismus

Obwohl erst in diesem Jahrzehnt bekannt wurde, daß viele humane Proteine fruktoxyliert sind, ist eine Reihe menschlicher Proteine ausführlich untersucht worden. Eine Auswahl ist in Tabelle 1 dargestellt. Nicht nur gelöste Proteine, sondern auch Proteine der extrazellulären Matrix, wie Bindegewebe, das vor allen Dingen aus Kollagen besteht, das eine relativ lange Halbwertszeit hat, wird fruktoxyliert. In eigenen Untersuchungen konnten wir nachweisen, daß Sehnen, Aortenwand, Lungenbindegewebe, glomeruläre Basalmembran, Haut- und Knochengewebe fruk-

Tab. 1. Beispiele von fruktoxylierten Proteinen im menschlichen Organismus.

Protein	Fruktoxylierung in vivo nachgewiesen	Struktur- bzw. Funktionsänderung	Literatur
Albumin	+	+	4, 36, 40
Immunglobulin G	+	+	24, 32
Crystallin	+	+	5, 12, 21
Gerinnungsproteine	+	+	7, 25
Hämoglobin	+	+	5, 41
Kollagene	+	+	3, 20, 24, 43
Lipoproteine	+	+	33, 34, 42
Zellmembran	+	?	35

tosyliertes Protein enthalten, das bei Diabetikern entsprechend der Stoffwechseleinstellung erhöht fruktosyliert ist (45). Die Fruktosylierungsgrade verschiedener Gewebe korrelieren gut untereinander: Patienten mit hoher Fruktosylierung, z. B. der Sehnen, weisen auch eine hohe Fruktosylierung anderer Gewebe auf. Der mittlere Blutglucosespiegel korreliert erstaunlich gut mit dem Fruktosylierungsgrad der Gewebe. Bei diesen Untersuchungen wurde eine ca. 50%ige Erhöhung der Fruktosylierung von Sehnen- und Aorten-Gewebsproteinen im Laufe des Lebens gefunden, während in anderen Untersuchungen eine Verdopplung des Fruktosylierungsgrades gefunden wurde.

Ausführliche tierexperimentelle und humane Untersuchungen (15, 18, 32) zeigen, daß fruktosylierte Aminosäuren und Proteine im Säugetierorganismus nicht verstoffwechselt werden können. Dagegen können die exogen zugeführten fruktosylierten Aminosäurenproteine von Mikroorganismen im Darm abgebaut werden. Tatsächlich scheiden Normalpersonen beträchtliche Mengen an fruktosylierten Aminosäuren, etwa 0,2 mMol/Tag im Urin aus, die aber im wesentlichen aus dem endogen fruktosylierten Proteinabbau stammen. Diabetiker scheiden entsprechend ihrer Stoffwechseleinstellung vermehrt Fruktoselysin aus.

## 5 Nichtenzymatische Bräunung im menschlichen Organismus

Als erster Hinweis, daß das Ketoamin entsprechend der Bräunungsreaktion auch im menschlichen Körper weiterreagiert, wurde die am Sehnenkollagen gefundene, für Bräunungspigmente spezifische Fluoreszenz gewertet. Dabei wurde ein linearer Anstieg dieser Fluoreszenz mit dem Lebensalter gefunden. Proben, die von diabetischen Patienten gewonnen wurden, zeigten erhöhte Fluoreszenz. In einer Modellreaktion wurde inzwischen ein Pyrolaldehyd nachgewiesen (27), der sehr schnell mit freien Aminogruppen mit Protein Quervernetzung bilden kann. Inzwischen konnte auch aus menschlichen Sehnen das Maillard-Produkt Pentosotisin isoliert werden. Aus der Struktur dieses Quervernetzungsproduktes läßt sich ableiten, daß Lysin, Arginin und eine Pentose reagiert haben.

Baynes et al. (1) zeigte im Modellsystem, daß aus Fruktoselysin Carboxymethyllysin unter oxidativen Bedingungen entsteht. Carboxymethyllysin konnte auch in Augenlinsen nachgewiesen werden, wobei die Konzentration linear mit dem Alter anstieg. Die schon länger bekannte Ausscheidung von Carboxymethyllysin im Urin, die mit dem Alter ansteigt und bei Diabetikern erhöht ist, kann somit als oxidatives Abbauprodukt fruktosylierter Proteine erklärt werden.

## 6 Veränderung der Struktur von Proteinen durch nichtenzymatische Bräunung

Baynes und Mitarbeiter konnten in einer Modellreaktion zeigen, daß *in vitro* fruktosylierte RNase zeitabhängig di- und trimerisiert wird (46). Da die Quervernetzung auch nach Entfernung der Glucose zunahm und da sie durch gleichzeitige Inkubation mit L-Lysin fast völlig verhindert werden konnte, wurde als Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, daß eine

Aminogruppe des Proteins mit einer Aminofruktosegruppe eines anderen Proteinmoleküls kondensiert und so Quervernetzungen ausbildet. Entsprechende Quervernetzungen wurden auch zwischen verschiedenen Proteinen gefunden (8, 24). Wird Serumalbumin oder Immunglobulin G zu Kollagen gegeben, das vorher mit Glucose längere Zeit inkubiert worden war, so werden die Serumproteine kovalent gebunden. Tatsächlich findet man auch bei diabetischen Tieren etwa fünfmal mehr Immunglobulin G an Kollagen gebunden als bei Kontrolltieren. Auch das cholesterintransportierende Serumlipoprotein LDL wird auf diese Weise kovalent an fruktosyliertes Kollagen gebunden.

Andererseits sollte die über freie Lysingruppen stattfindende physiologische Quervernetzung von Bindegewebsproteinen durch Fruktosylierung vermindert werden. Bei der physiologischen Kollagen- bzw. Elastin-quervernetzung oxidiert eine Lysyloxidase spezifisch einige wenige Lysyl- bzw. Hydroxylysylreste zu entsprechenden Aldehyden, die mit  $\epsilon$ -Aminogruppen der benachbarten Kollagen- bzw. Elastinmoleküle via Schiffscher Basenbildung zu Quervernetzungen führen. Fruktosylierung der Lysinreste müßte die Reaktion inhibieren und zu einer geringeren Quervernetzung der Kollagene und Elastine führen. Tatsächlich wurde aber, insbesondere bei den Kollagenen, vermehrte Quervernetzung von Kollagenen, die *in vitro* oder *in vivo* erhöhten Glucosekonzentrationen ausgesetzt waren, gefunden. Offensichtlich bilden sich auch – wie bereits für Serumproteine beschrieben – solche unphysiologischen Quervernetzungen zwischen den nebeneinanderliegenden Kollagenmolekülen der Kollagenfasern aus und erhöhen die mechanische Stabilität, vermindern aber die Löslichkeit durch Säuren oder Enzyme. Auch die mechanische Belastbarkeit der Sehnen wird durch Vorinkubation mit Glucose beträchtlich erhöht (8). In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, daß Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung Kontrakturen an den Händen haben, die wahrscheinlich auf die verminderte Elastizität des Bindegewebes, insbesondere der Sehnen, zurückzuführen sind (31).

Der Einfluß der Fruktosylierung auf die Funktion von Proteinen wurde vor allem durch *In-vitro*-Inkubation von Enzymen mit D-Glucose untersucht. Die in Tabelle 1 dargestellten Funktionsänderungen der enzymatischen Aktivität bzw. Bindungsproteine wird häufig nur durch extreme Fruktosylierungsgrade erreicht. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die verminderte Aufnahme von fruktosyliertem Low-density-Lipoprotein, das cholesterintransportierende Protein im menschlichen Blut. Das Cholesterin transportierende LDL im menschlichen Blut enthält normalerweise etwa 0,5 Mol lys-fru pro Molekül (33). Ausführliche *In-vitro*-Untersuchungen zeigten, daß die Modifikation von  $\epsilon$ -Aminogruppen das LDL zu einer verminderten Bindung an den Zellmembran-gebundenen LDL-Rezeptor führt (34). Diese verminderte Bindung, Aufnahme und Metabolisierung von LDL durch verschiedene menschliche Zellen konnte auch für fruktosyliertes LDL in Abhängigkeit von der Höhe der eingebauten Glucose gezeigt werden. Interessant ist, daß fruktosyliertes LDL in humanen Makrophagen die Cholesterinestersynthese stimulieren kann. Es ist daher möglich, daß die Fruktosylierung von LDL und die entsprechenden Folgeprodukte (AGE-Produkte) die Bildung von

Schaumzellen begünstigen (Makrophagen gelten als Vorstufe der Schaumzellen der arteriosklerotischen Plaques). Ob in diesem Zusammenhang die interessante Beobachtung, daß erhöhte LDL-Cholesterinspiegel mit erhöhtem Fruktosylierungsgrad einhergehen, eine Rolle spielt, ist bislang nicht bekannt. Die Menge an AGE-Produkten, die in den verschiedenen langlebigen Körperproteinen gefunden wurde, ist viel geringer, als man anhand der In-vitro-Studien erwarten würde.

Daher wurde nach einem Mechanismus gesucht, der AGE-Proteine selektiv entfernt. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, daß immunkompetente Zellen (Makrophagen) einen hochaffinen Rezeptor haben, der AGE-Proteine bindet, in die Zelle aufnimmt und abbaut (44). Dieser Rezeptor für AGE-Proteine konnte bereits aus der Makrophagenmembran herausgelöst und angereichert werden. Bislang fehlen eingehende Untersuchungen, ob und auf welche Weise der AGE-Rezeptorweg für den Abbau von langlebigen Proteinen essentiell ist.

## 7 Klinische Aspekte Maillard-Reaktion

Da der Fruktosylierungsgrad von Proteinen unter „Steady-state“-Bedingungen der Glucosekonzentration proportional ist, läßt sich – konstante Proteinhalbwertszeit vorausgesetzt – die mittlere Glucosekonzentration, der ein Protein während seiner Lebensdauer im Körper ausgesetzt war, abschätzen. Der Fruktosylierungsgrad eines Blutproteins läßt sich also zur retrospektiven Abschätzung des Blutglucosespiegels verwenden. Entsprechend der Halbwertszeit eignet sich das Hämoglobin für die Blutzuckerüberwachung der letzten 2–3 Monate, während das fruktosyierte Albumin die durchschnittlichen Blutglucosekonzentrationen der letzten 2–3 Wochen widerspiegelt (38). Neuerdings lassen sich sogar erhöhte Glucosespiegel anhand des Fruktosylierungsgrades von Fingernagel- oder Haarproteinen feststellen (29). Die Bestimmung der fruktosyierten Blutproteine stellt somit ein Maß zur objektiven Erfassung der Stoffwechselstellung dar, von dem in der klinischen Praxis sowohl Arzt als auch Patient profitieren. Der Patient hat eine unbestechliche Leitgröße, und der Arzt kann ohne großen Aufwand über eine längere Zeit gemittelte Blutzuckerwerte in Erfahrung bringen, ohne einzelne Blutzuckerwerte zu bestimmen. Die Messung des fruktosyierten Hämoglobins hat in der Praxis bereits ihren festen Platz in der Kontrolle der Stoffwechselinstellung bei Diabetikern gewonnen, während noch kontrovers diskutiert wird, ob und für welche Fälle der klinische Aussagewert der kürzlich eingeführten fruktosyierten Serumproteine der Aussage des fruktosyierten Hämoglobins überlegen ist. Da die nach langer Diabetesdauer auftretenden Spätschäden bei Diabetikern vor allem an insulininsensitiven Geweben auftreten, wurde die Fruktosylierung dieser Gewebeproteine mit dem Ausmaß der Spätschäden verglichen (45). Diabetiker mit schweren Spätschäden an mehreren Organen wiesen einen hohen Fruktosylierungsgrad des Sehnen- bzw. Aortengewebes auf. Dieses Ergebnis weist auf einen Zusammenhang zwischen schlechter Stoffwechselführung und Entstehung diabetischer Spätschäden hin. Entsprechend konnte auch kürzlich gezeigt werden, daß Diabetiker mit einem hohen Gehalt an AGE-Proteinen im vermehrten Maß Schäden an Augen und Nieren aufweisen (24).

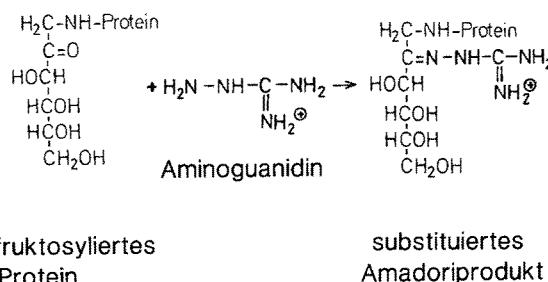


Abb. 2. Reaktion von Aminoguanidin mit fruktosylierten Proteinen. Aminoguanidin bildet mit der Ketogruppe eine stabile Schiffsche Base und verhindert so die Bildung von „AGE-Produkten“.

## 8 Schlußfolgerung und Zukunftsaspekte

Da man die Maillard-Reaktion als eine der Ursachen der unerwünschten glucoseabhängigen Proteinverernetzung im menschlichen Körper erkannt hat, sucht man nun nach Möglichkeiten, diese Reaktion zu unterbinden. Brownlee et al. (9) konnten zeigen, daß Aminoguanidin die Bildung von AGE-Substanzen und die Quervernetzung von Proteinen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verhindert (Abb. 2). Nach Aminoguanidin-Gabe im Trinkwasser von Ratten wurde keine Akkumulation von Immunoglobulinen im Kollagengerüst der Blutgefäße von diabetischen Ratten beobachtet. Es ist geplant, Aminoguanidin als Medikament zur Verhinderung der durch Maillard-Reaktion bedingten Quervernetzung für die Entstehung sowohl von diabetischen Spätkomplikationen als auch von Alterungsschäden zu prüfen. Aus diesem Grunde wurde die Langzeitgabe von Aminoguanidin – dessen Toxizität im Tierversuch gering ist – bereits an einem Kollektiv von freiwilligen Personen durchgeführt und ohne nennenswerte Nebenwirkungen abgeschlossen (10). Allerdings ist der Reaktionsweg bislang nicht in vollem Umfang geklärt, obwohl angenommen wird, daß Aminoguanidin bevorzugt mit der Ketogruppe des Ketoamins zum Hydrazon reagiert und so die Weiterreaktion verhindert.

## Literatur

1. Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW (1986) Identification of carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 261:4889–4994
2. Armbruster D (1987) Fructosamine: structure, analysis and clinical usefulness. *Clin Chem* 33:2153–2163
3. Bailey AJ, Kent MJC (1989) In: Baynes, Monnier (eds) *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition*. Alan R Liss Inc, New York, pp 109–122
4. Baynes JW, Thorpe SR, Murtiashaw MH (1984) Nonenzymatic glycosylation of lysine residues in albumin. *Meth Enzymol* 106:88–98
5. Brownlee M, Cerami A (1981) The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Ann Rev Biochem* 50:385–432
6. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A (1980) Measurement of glycosylated amino acids and peptides from urine of diabetic patients using affinity chromatography. *Diabetes* 29:1044–1047

7. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A (1984) Inhibition of heparincatalyzed human antithrombin III activity by nonenzymatic glycosylation: possible role in fibrin deposition in diabetes. *Diabetes* 33:532–535
8. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A (1985) Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density-lipoprotein. *Diabetes* 34:938–941
9. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A (1986) Aminoguanidine prevents diabetes induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 232:1629–1632
10. Brownlee M, persönliche Mitteilung (1989)
11. Bunn HF, Shapiro R, McManus MJ, Garrick L, McDonald MJ, Gallop PJ, Gabbay KH (1979) Structural heterogeneity of human hemoglobin A due to nonenzymatic glycosylation. *J Biol Chem* 254:3892–3898
12. Chiou SH, Chylack LT Jr, Tung WH, Bunn HF (1981) Nonenzymatic glycosylation of bovine lens crystallins: effect of aging. *J Biol Chem* 256:5176–5180
13. Curtiss LK, Witztum JL (1983) A novel method for generating region-specific monoclonal antibodies to modified proteins. *J Clin Invest* 72:1427–1438
14. Dolhofer R, Wieland OH (1981) Improvement of the thiobarbituric acid assay for serum glycosylprotein determination. *Clin Chim Acta* 112:197–204
15. Erbersdobler HF, Purwing U, Bossen M, Trautwein E (1985) Proceedings of the 3rd Int. Symposium on the Maillard Reaction “Amino-Carbonyl Reaction in Food and Biological Systems”, Fuji Institute, Japan
16. Erbersdobler H, Zucker H (1966) Untersuchungen zum Gehalt an Lysin und verfügbarem Lysin in Trockenmagermilch. *Milchwiss.* 21:564–568
17. Finot PA, Bricout J, Viani R, Mauron J (1968) Identification of a new lysine derivative obtained upon acid hydrolysis of heated milk. *Experientia* 24:1097–1099
18. Finot PA, Magnenat E (1981) Metabolic transit of early and advanced Maillard products. *Prog Fd Nutr Sci* 5:193–207
19. Flückiger R, Winterhalter KH (1976) In vitro synthesis of hemoglobin A<sub>1c</sub>. *FEBS Lett.* 71:356–360
20. Garlick RL, Bunn HF, Spiro RG (1988) Nonenzymatic glycation of basement membranes from human glomeruli and bovine sources. *Diabetes* 37:1144–1150
21. Garlick RL, Mazer JS, Chylack LT Jr, Tung WH, Bunn HF (1984) Nonenzymatic glycation of human lens crystallin: effect of aging and diabetes mellitus. *J Clin Invest* 74:1742–1749
22. Hodge JE (1955) The Amadori rearrangement. *Adv Carbohydr Chem* 10:169–205
23. Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR (1982) Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta* 127:87–95
24. Ledl F, Schleicher E (1990) Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angew Chem* 102:597–626
25. Lutjens A, te Velde AA, van der Veen EA, Meer JVD (1985) Glycosylation of human fibrinogen *in vivo*. *Diabetologia* 28:87–89
26. Maillard LC (1912) Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoïdines par voie méthodique. *CR Acad Sci* 154:66–68
27. Monnier VM, Kohn RR, Cerami A (1984) Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:583–587
28. Neglia Cl, Cohen HJ, Garber AR, Ellis PD, Thorpe SR, Baynes JW (1983) <sup>13</sup>C-NMR investigation of nonenzymatic glucosylation of protein: model studies using RNase A. *J Biol Chem* 258:14 279–14 283
29. Oimoni M, Nishimoto S, Kitamura Y, Matsumoto S, Hatanaka H, Ishikawa K, Baba S (1985) Increased fructose-lysine of hair protein in diabetic patients. *Klin Wochenschr* 63:728–730

30. Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HM (1969) Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Comm* 36:838–843
31. Rosenbloom AL, Silberstein JH, Lecotte DC, Richardson K, McCallum M (1981) Limited joint mobility in childhood diabetes mellitus indicates increased risk for microvascular disease. *New Engl J Med* 305:191–194
32. Schleicher E (1986) Nichtenzymatische Glucosylierung von menschlichen Proteinen: analytische, diagnostische und funktionelle Aspekte. Habilitations-schrift: Technische Universität München
33. Schleicher E, Deufel T, Wieland OH (1981) Nonenzymatic glycosylation of human serum lipoproteins. *FEBS Lett* 129:1–4
34. Schleicher E, Olgemöller B, Schön J, Duürst T, Wieland OH (1985) Limited nonenzymatic glucosylation of low-density lipoprotein does not alter its catabolism in tissue culture. *Biochim Biophys Acta* 846:226–233
35. Schleicher E, Scheller L, Wieland OH (1981) Quantitation of lysine-bound glucose of normal and diabetic erythrocyte membrane by HPLC analysis of furosine. *Biochem Biophys Res Comm* 99:1011–1019
36. Schleicher E, Wieland OH (1981) Specific quantitation by HPLC of protein (lysine) bound glucose in human serum albumin and other glycosylated proteins. *J Clin Chem Clin Biochem* 19:81–87
37. Schleicher E, Wieland OH (1986) Kinetic analysis of glycation as a tool for assessing the half-life of proteins. *Biochim Biophys Acta* 884:199–205
38. Schleicher E, Wieland OH (1989) Proteinglycation: Measurement and clinical relevance. *J Clin Chem Clin Biochem* 27:557:587
39. Sell DR, Monnier VM (1990) End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose derived crosslink from aging human collagen. *J Clin Invest* 85:380:384
40. Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF (1984) Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem* 259:3812–3817
41. Shapiro R, McManus MJ, Zalut C, Bunn HF (1980) Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A. *J Biol Chem* 255:3120–3127
42. Steinbrecher UP, Witztum JL (1984) Glucosylation of low density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. *Diabetes* 33:130–134
43. Tarsio JF, Widness B, Rhode TD, Rupp WM, Buchwald H, Furcht LT (1985) Nonenzymatic glycation of fibronectin and alterations in the molecular association of cell matrix and basement membrane components in diabetes mellitus. *Diabetes* 34:477–484
44. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A (1986) Novel macrophage receptor for glucose-modified proteins is distinct from previously described scavenger receptor. *J Exp Med* 164:1301–1309
45. Vogt B, Schleicher E, Wieland OH (1982)  $\epsilon$ -Aminolysine-bound glucose in human tissues obtained at autopsy. *Diabetes* 31:1123–1127
46. Watkins NG, Thorpe SR, Baynes JW (1985) Glycation of amino groups in protein: studies on the specificity of modification of RNase A by glucose. *J Biol Chem* 260:10 629–10 636

Eingegangen 15. Mai 1990

Anschrift des Verfassers:

E. Schleicher, Institut für Klinische Chemie und Diabetesforschung, Krankenhaus München-Schwabing, Kölner Platz 1, 8000 München 40