

**„Der Einfluss der Zellalterung auf die
pathobiochemischen Prozesse von Morbus
Alzheimer und weiteren neurodegenerativen
Erkrankungen“**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

BIRGIT RÖMPP

geb. in Bayreuth

Mainz, 2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10. April 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2005 bis Dezember 2007
am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Für Lukas, Simon und Valentina

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Alter und demenzielle neurodegenerative Erkrankungen.....	1
1.2	Die Alzheimer Demenz (AD)	2
1.3	Das Amyloid-Vorläuferprotein APP	3
1.3.1	Die APP-Prozessierung.....	5
1.3.2	Die amyloidogene Prozessierung	6
1.3.3	Die nicht-amyloidogene Prozessierung	6
1.4	Das Down Syndrom (DS).....	7
1.5	Die Niemann Pick Krankheit (NPC)	7
1.6	Entzündungsprozesse in AD	8
1.7	Der Einfluss von Sirtuinen auf die APP-Prozessierung	9
1.8	Fibroblasten als zelluläres Altersmodell.....	10
1.9	Fragestellung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material.....	12
2.1.1	Geräte.....	12
2.1.2	Chemikalien.....	13
2.1.3	Molekularbiologische Reaktionssysteme (Kits).....	14
2.1.4	Weitere Verbrauchsmaterialien	15
2.1.5	Allgemeine Enzyme.....	15
2.1.6	Restriktions-Endonukleasen.....	16
2.1.7	Primärantikörper.....	16
2.1.8	Sekundärantikörper.....	17
2.1.9	Verwendete Primer	17
2.1.10	Computerprogramme	18
2.2	Methoden	18
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	18
2.2.1.1	Verwendete Zelllinien.....	18
2.2.1.2	Kultivierung von Zellen	20
2.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl	20
2.2.1.4	Bestimmung der Populationsverdopplungen (PDL).....	21
2.2.1.5	Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)/ Kryokultivierung	21
2.2.1.6	Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität.....	21

2.2.1.7	Kontrolle der Zellkultur auf Mykoplasmenkontamination	22
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	22
2.2.2.1	Gewinnung von Zelllysate	22
2.2.2.2	Quantifizierung von Proteinen.....	23
2.2.2.3	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von Lipid-Rafts	23
2.2.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.2.2.5	Coomassie-Blaufärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	25
2.2.2.6	Western Blot Analyse	26
2.2.2.7	Ponceau S-Färbung	26
2.2.2.8	Immunoblot	27
2.2.2.9	Strippen von Membranen	27
2.2.2.10	Immunzytochemie.....	28
2.2.2.11	Enzymatische Aktivitätsbestimmungen	29
2.2.2.12	Bestimmung des freien Cholesteringehalts	29
2.2.3	Mikrobiologische Methoden	30
2.2.3.1	Kultivierung von <i>E.coli</i>	30
2.2.3.2	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	31
2.2.3.3	Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock	31
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	32
2.2.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	32
2.2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	32
2.2.4.3	Isolierung von genomischer DNA aus Säugerzellen	32
2.2.4.4	Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus mRNA.....	33
2.2.4.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
2.2.4.6	PCR-Analyse von Transformandenklonen.....	35
2.2.4.7	Real-Time PCR.....	35
2.2.4.8	Agarose-Gelelektrophorese zur DNA-Auftrennung	36
2.2.4.9	Präparative Agarose-Gelelektrophorese.....	37
2.2.4.10	Subklonierung von DNA-Fragmenten	37
2.2.4.11	Plasmidisolierung.....	37
2.2.4.12	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	38
2.2.4.13	Genomische DNA Methylierung	38
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Charakterisierung der Alterung der Zellkulturen	40

3.1.1	Lebensspanne.....	41
3.1.2	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität (SA- β -Gal-Aktivität).....	42
3.1.3	Biochemische Analyse des seneszenten Phänotyps.....	43
3.1.4	Methylierungsstatus des Caveolin1-Promotors in NHF-Zellen	46
3.1.4.1	Bisulfidsequenzierung des Promotorbereichs	47
3.1.5	Untersuchung des zellulären Cholesterinspiegels	49
3.1.6	Untersuchung von Lipid Rafts.....	50
3.2	Altersassoziierte Veränderung der APP-Prozessierung.....	51
3.2.1	Untersuchung der APP-Spiegel und der intrazellulären APP-Spaltfragmente	52
3.2.2	Untersuchung der extrazellulären Spaltfragmente.....	54
3.3	Untersuchung der APP-Sekretasen.....	55
3.3.1	Einfluss der Zellalterung auf die α -Sekretase.....	55
3.3.2	Einfluss der Zellalterung auf die β -Sekretase.....	57
3.3.3	Einfluss der Zellalterung auf die γ -Sekretase.....	60
3.4	Weiterführende Untersuchungen der α - und β -Sekretase-Aktivitäten	63
3.4.1	Zusammenhang zwischen α -Sekretase-Aktivität und SIRT1.....	63
3.4.1.1	Untersuchung zur SIRT1 Expression im Alter	63
3.4.1.2	Altersabhängige Untersuchung nach Inhibition von SIRT1	64
3.4.1.3	Behandlung von IMR90-Fibroblasten mit dem ROCK1-Inhibitor Y27632	67
3.4.2	Untersuchungen zur β -Sekretase-Aktivität	69
3.4.2.1	Behandlung junger Fibroblasten mit Mediumüberstand seneszenten Fibroblasten.....	69
3.4.2.2	Übertrag auf Neuroblastoma-Zellen N2a	71
3.4.2.3	Behandlung von Fibroblasten mit Aphidicolin.....	72
3.4.2.4	Behandlung von N2a-Zellen mit Aphidicolin	73
3.4.2.5	Einfluss von Zytokinen auf die β -Sekretase-Aktivität	74
4	Diskussion.....	76
4.1	Verwendete Fibroblasten	76
4.2	Charakterisierung des seneszenten Phänotyps	77
4.3	Einfluss der Zellalterung auf die APP-Prozessierung	79
4.3.1	Der Einfluss der zellulären Alterung auf die APP-Reifung	81
4.3.2	Der Einfluss der zellulären Alterung auf die APP-Sekretasen.....	82
4.3.2.1	Die α -Sekretase.....	82
4.3.2.2	Die β -Sekretase.....	84

4.3.2.3	Die γ -Sekretase	85
4.4	Der Einfluss von SIRT1 auf die α -Sekretase-Aktivität in IMR90-Fibroblasten.....	86
4.5	Weiterführende Analysen der β -Sekretase-Aktivität in IMR90-Fibroblasten	87
4.5.1	Der Einfluss von Aphidicolin auf die β -Sekretase-Aktivität	88
4.5.2	Der Einfluss von Zytokinen auf die β -Sekretase-Aktivität	89
4.6	Relevanz der Ergebnisse bezüglich der APP-Pathologie und Ausblick	89
5	Zusammenfassung.....	91
6	Abstract.....	93
7	Literatur	95
8	Anhang	109
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	109
8.2	Vektordiagramm von pGEM-Teasy	112
8.3	Abbildungsverzeichnis	113
8.4	Tabellenverzeichnis	114
8.5	Danksagung.....	115
8.6	Eidesstattliche Erklärung	116

1 Einleitung

1.1 Das Alter und demenzielle neurodegenerative Erkrankungen

Eine der Hauptursachen des demographischen Alterns ist die Verlängerung der Lebenszeit. Allein in Deutschland geht man im Jahre 2050 von 9,1 Millionen Menschen aus, die 80 Jahre und älter sind. Aufgrund des zunehmenden Anteils älterer Menschen in unserer Gesellschaft wird es in den kommenden Jahren zu einer massiven Zunahme demenzieller Erkrankungen kommen. Wie viele Menschen im Alter wirklich von einer neurodegenerativen Erkrankung betroffen sind, lässt sich nicht voraussagen. Da jedoch der Anteil von Hochbetagten drastisch ansteigen wird, kann auch mit einer starken Zunahme chronisch kranker älterer Menschen gerechnet werden (Quelle: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden).

Die Bezeichnung „Demenz“ leitet sich vom lateinischen Begriff „dementia“ ab, was soviel bedeutet wie Wahnsinn, Unsinn bzw. Unvernunft. Die Demenz umfasst chronische oder fortschreitende Gedächtnis- und Denkstörungen, die häufig mit einer Beeinträchtigung der emotionalen Kontrolle sowie einer Veränderung des Sozialverhaltens einhergehen [Wächtler 1997]. Es gibt verschiedene Formen von Demenz, die jedoch am häufigsten auftretende neurodegenerative Erkrankung ist mit über 60% die Alzheimer Krankheit [Schmidtke 2005]. Abbildung 1.1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Demenzformen und deren Häufigkeit.

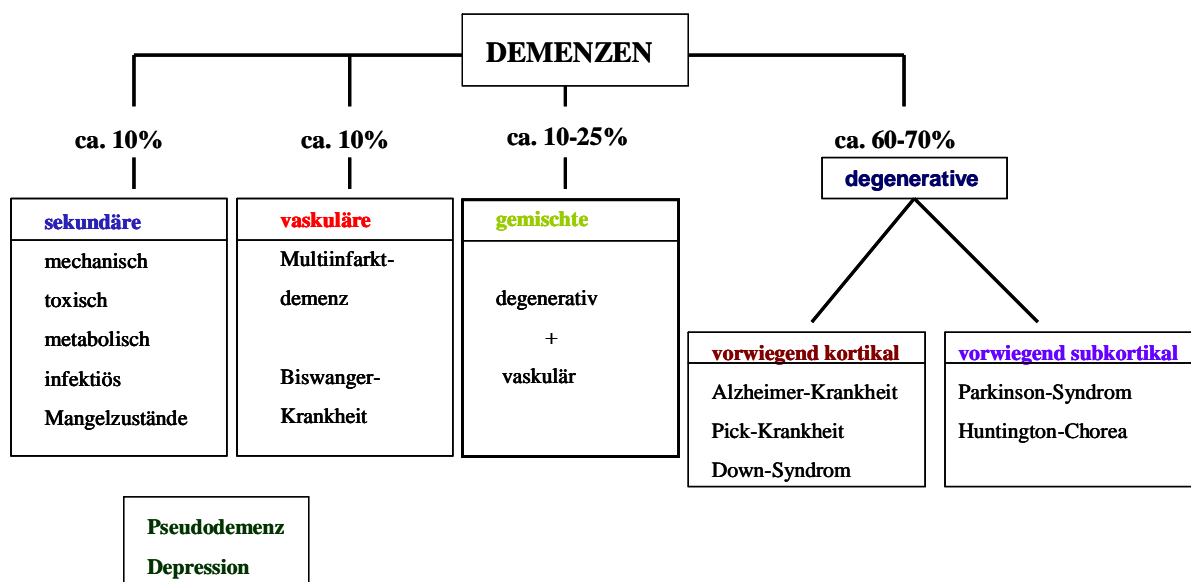


Abbildung 1.1: Verschiedene Demezformen und ihre Häufigkeit (Quelle: [Maurer et al. 1993])

1.2 Die Alzheimer Demenz (AD)

Die Alzheimer Demenz ist eine degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems, die bis heute nicht heilbar ist. Vor über 100 Jahren wurde diese Krankheit das erste Mal von dem Psychiater Alois Alzheimer beschrieben. Er entdeckte in silbergefärbten Hirnschnitten seiner Patientin Auguste D. die noch heute für diese Krankheit charakteristischen Eiweißablagerungen („Plaques“) und neurofibrillären Bündel („Tangles“). Bei den amyloiden Plaques kann man zwischen zwei unterschiedlichen Arten unterscheiden, den neuritischen („senilen“) und den nicht-neuritischen („diffusen“) Plaques. Diese Plaques bestehen zu 90% aus dem Amyloid- β -Peptid („A β “), deren Vorläufer das Amyloide-Vorläuferprotein APP darstellt. Die Tangles bestehen aus paarigen helikalen Filamenten, deren Hauptbestandteil hyperphosphoryliertes Tau-Protein ist (siehe Abb. 1.2) [Alvarez *et al.* 1999; Maccioni *et al.* 2001].

Neuritische Plaques kommen hauptsächlich in der grauen Gehirnsubstanz vor und bestehen im Zentrum aus stark verdichteten A β -Proteinen [Katzman 1986]. Die durch Aggregation von A β entstandenen Fibrillen sind von dystroph veränderten Nervenzellfortsätzen, sowie reaktiven Mikroglia und Astrozyten umgeben [Selkoe, D.J. 1996]. Yankner und Kollegen konnten zeigen, dass Amyloidfibrillen unter bestimmten Bedingungen zytotoxisch wirken [Yankner *et al.* 1990] und daher zum Absterben von Neuronen beitragen können. Diffuse Plaques haben im Gegensatz dazu keinen A β -Kern und ihre Ultrastruktur weist nur einen geringen Anteil von A β -Fibrillen auf. Sie zeigen keine oder wenige neuritische Veränderungen [Terry *et al.* 1999].

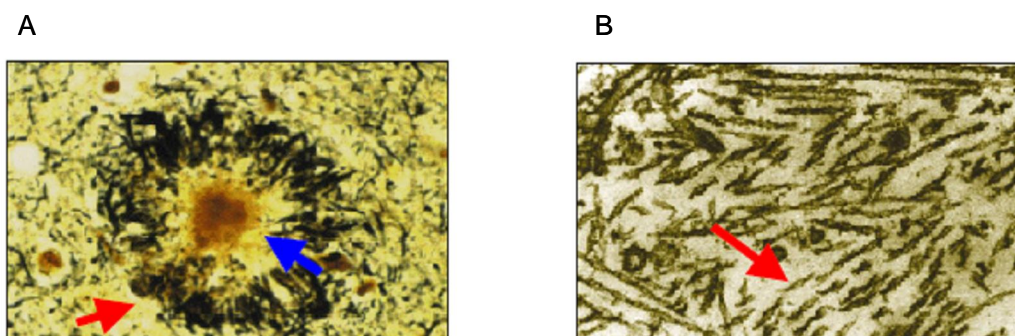


Abbildung 1.2: Histopathologische Charakteristika der AD. (A) Diese hochauflösende mikroskopische Aufnahme zeigt einen A β -Plaque (blauer Pfeil), der von dystrophen Neuriten umgeben ist. (B), Elektronenmikroskopische Aufnahme von neurofibrillären Tangles (roter Pfeil; Quelle: [Sisodia & St George-Hyslop 2002]).

Man kann zwischen zwei Formen der AD unterscheiden. Zum einem die sporadische Form, die ca. 90 – 95% der Fälle betrifft und deren Ursache bis heute nicht geklärt ist. Die Wahrscheinlichkeit, an einer sporadischen Form der AD zu erkranken, nimmt mit steigendem Lebensalter stark zu [Ott *et al.* 1995]. Die andere Form ist die autosomal vererbte familiäre Alzheimer Demenz (FAD), die ca. 5 – 10% der Fälle ausmacht und schon im frühen Lebensalter zwischen 30 und 50 Jahren auftritt. Bis jetzt konnten 3 Gene gefunden werden, bei denen Mutationen zum Ausbruch der FAD führen. Dabei handelt es sich um Presenilin 1 (PS1) und Presenilin 2 (PS2), die als Komponenten am γ -Sekretase-Komplex beteiligt sind und auf den Chromosomen 14 bzw. 1 lokalisiert sind, sowie um das Amyloid-Vorläuferprotein APP auf Chromosom 21 [Hardy & Selkoe 2002]. Ein weiterer Risikofaktor ist die Isoform $\epsilon 4$ des Apolipoproteins E (ApoE), welches als lipidbindendes Protein für den Cholesterintransport im Blut zuständig ist. Dieses ApoE $\epsilon 4$ kann mit den A β -Proteinen stabile Verbindungen bilden, welche die Entstehung von Plaques begünstigen [Burns *et al.* 2003; St. George-Hyslop 2000].

Die Alzheimer Demenz führt zu einem Verlust der kognitiven Fähigkeiten aufgrund der cholinergen und glutamatergen Synapsenverluste. Bis heute gibt es nur symptombezogene Behandlungen mit z.B. Acetylcholinesterase-Hemmern (Donepezil®) oder NMDA-Antagonisten (Memantin®). Um den betroffenen Menschen ihre Lebensqualität möglichst lange zu erhalten, ist es von großer Bedeutung, molekulare und pathobiochemische Prozesse der AD aufzuklären, um daraus neue Therapieansätze entwickeln zu können.

1.3 Das Amyloid-Vorläuferprotein APP

Wie schon zuvor erwähnt, ist der Hauptbestandteil der senilen Plaques das Amyloid β -Protein, welches durch Prozessierung von APP durch die β - und γ -Sekretase entsteht (siehe Abb. 1.3). Das Amyloid-Vorläuferprotein ist ein glykosyliertes Typ I-Transmembranprotein, das auf Chromosom 21 lokalisiert ist und in nahezu allen Geweben und Zelltypen exprimiert wird [Kang *et al.* 1987; Selkoe, D.J. *et al.* 1988].

Es werden hauptsächlich drei verschiedene Isoformen des Proteins gebildet, die aus 695, 751 oder 770 Aminosäuren (AS) bestehen [Sandbrink *et al.* 1994; Selkoe, D.J. 1994]. Während APP₆₉₅ fast ausschließlich in neuronalen Zellen exprimiert wird, ist APP₇₅₁ am häufigsten in

nicht-neuronalen Gewebe zu finden [Wertkin *et al.* 1993]. Alle drei APP-Isoformen weisen in der Ektodomäne eine Kupfer-, Eisen- sowie eine Zink-Bindungsstelle auf [Bush *et al.* 1993; Hesse *et al.* 1994; Maynard *et al.* 2002]. Die zytoplasmatische Domäne ist hoch konserviert von *C. elegans* bis zum Menschen und interagiert mit den meisten der identifizierten APP-Bindungspartnern [Reinhard *et al.* 2005].

Die genaue Funktion dieser Proteinfamilie ist nicht bekannt, jedoch werden z. B. Funktionen im Zusammenhang mit Signaltransduktion [Nishimoto *et al.* 1993] oder Zelladhäsion, Blutgerinnung und Neuritenwachstum diskutiert [Milward *et al.* 1992].

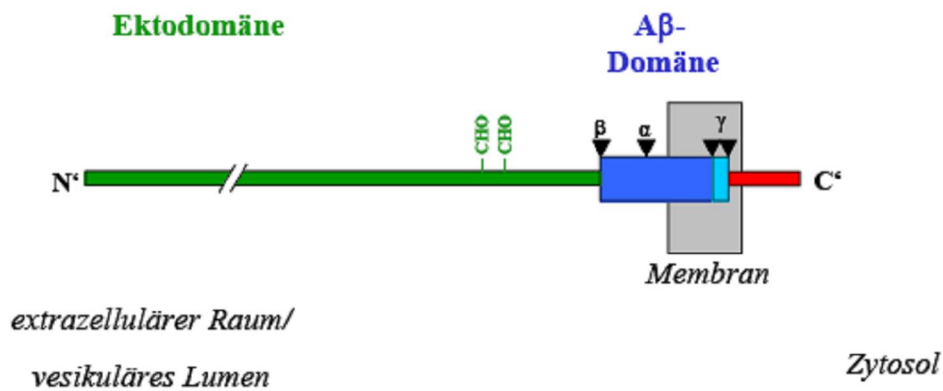


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Amyloid-Vorläuferproteins APP (modifiziert nach [Reinhard *et al.* 2005]).

APP wird nach seiner Synthese am Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch den sekretorischen Transportweg zur Zellmembran transportiert und dabei durch N- und O-Glykosylierung [Weidemann *et al.* 1989], Phosphorylierung und Sulfatierung modifiziert [Hung & Selkoe 1994; Suzuki *et al.* 1994]. An der Zelloberfläche wird das gereifte APP in endozytotische Vesikel aufgenommen und gelangt wieder an die Plasmamembran zurück [Koo & Squazzo 1994].

1.3.1 Die APP-Prozessierung

Das Amyloide-Vorläuferprotein kann auf zwei alternativen Wegen proteolytisch prozessiert werden, dem nicht-amyloidogenen oder sekretorischen und dem amyloidogenen (siehe Abb. 1.4). Bei dem nicht-amyloidogenen Weg wird APP von der β - und γ -Sekretase geschnitten, während beim amyloidogenen Weg α - und γ -Sekretase zum Einsatz kommen (siehe zur Übersicht [Pietrzik & Behl 2005]).

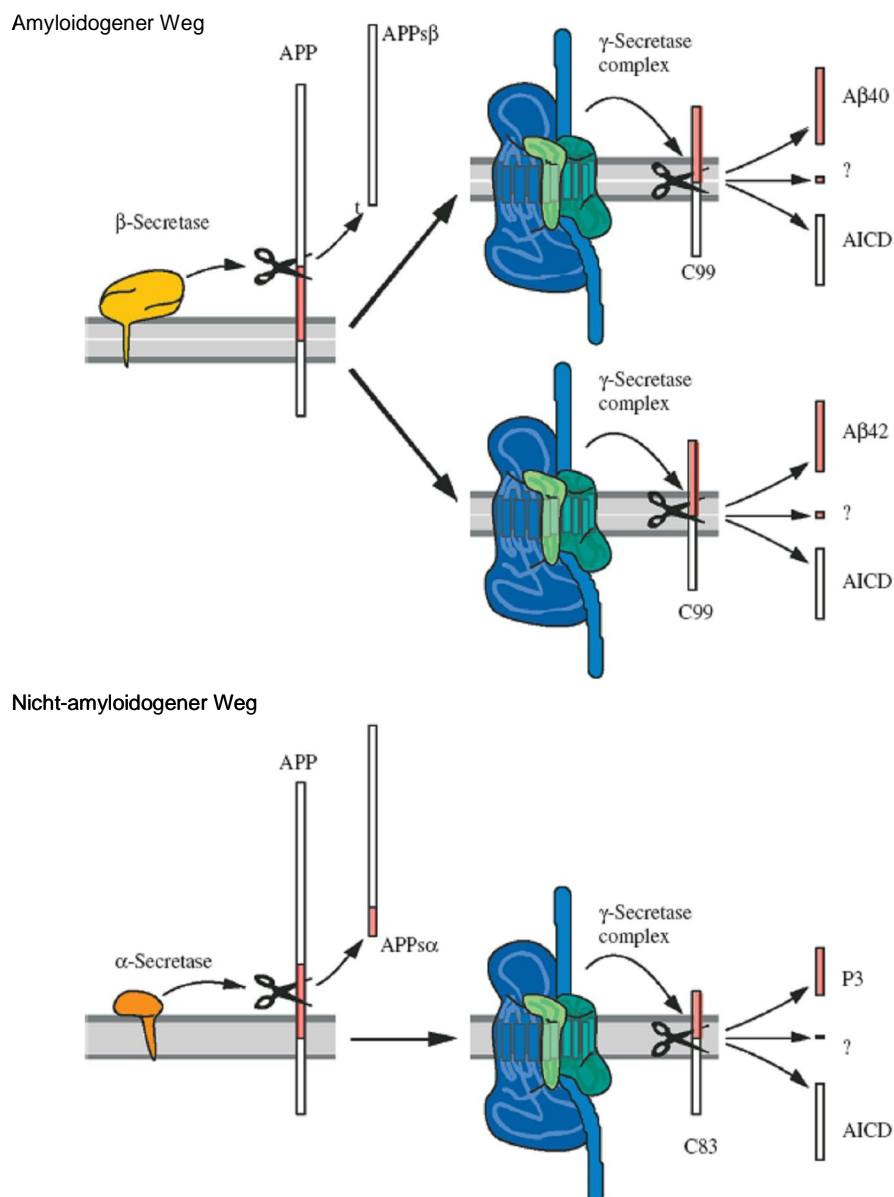


Abbildung 1.4: APP-Prozessierung. Erläuterungen siehe Text (modifiziert nach [Pietrzik & Behl 2005]).

1.3.2 Die amyloidogene Prozessierung

Bei der amyloidogenen Prozessierung wird APP in einem ersten Schritt von der β -Sekretase, die auch als *Beta-site APP cleaving enzyme* („BACE“) bezeichnet wird, innerhalb der extrazellulären Domäne am N-Terminus der A β -Region gespalten (siehe Abb. 1.4) [Vassar *et al.* 1999]. Dabei entsteht zum einen ein lösliches APP-Derivat sAPP β und zum anderen ein membranverankertes, ca. 12 kDa großes Fragment aus 99 Aminosäuren („C99“ oder „ β -stub“). Dieses C99 kann darauf folgend von der γ -Sekretase gespalten werden, die sich aus Nicastrin, Pen1, APH1 und den Presenilinen PS1 und PS2 zusammensetzt [Ehehalt *et al.* 2003; Wada *et al.* 2003]. Dabei entstehen A β -Proteine mit unterschiedlicher Länge (39 – 43 AS) [LaFerla 2002]. Die Spaltung durch die ϵ -Sekretase führt zur Bildung eines ca. 6 kDa großen Fragments, der APP-intrazellulären Domäne („AICD“).

Das A β -Peptid wird extrazellulär sezerniert und ist durch Umwandlung von einer α -Helix- in eine β -Faltblattstruktur in der Lage, sich zu Oligomeren zusammen zu lagern. Diese können so genannte Protofibrillen ausbilden, aus denen am Ende die neuritischen Plaques entstehen [Haass, C. & Steiner 2002; Jarrett *et al.* 1993; Selkoe, Dennis J. 2001]. A β 42 neigt aufgrund seiner Aminosäuresequenz eher zur Ausbildung von β -Faltblattstrukturen als A β 40 und ist daher neurotoxischer [Behl *et al.* 1994; St. George-Hyslop 2000].

1.3.3 Die nicht-amyloidogene Prozessierung

Ca. 95% von APP wird über den nicht-amyloidogenen Weg mittels der α -Sekretase an der Zellmembran abgebaut [Parvathy *et al.* 1999]. Bis heute wurden drei α -Sekretasen identifiziert: ADAM9, ADAM10 und ADAM17 [Koike *et al.* 1999; Lammich *et al.* 1999; Buxbaum *et al.* 1998]. Sie gehören zur Gruppe der ADAM (*α disintegrin and metalloproteinase*)-Familie. Es ist jedoch noch unklar, ob nur eine oder alle drei Sekretasen zusammen die physiologisch relevante α -Sekretase bilden [Lichtenthaler & Haass 2004].

Die Spaltung von APP erfolgt N-terminal zur Transmembranregion zwischen Aminosäure 16 und 17 innerhalb der A β -Sequenz [Anderson *et al.* 1991]. Dies hat zur Folge, dass die Produktion von A β und somit die Bildung von Amyloid-Plaques verhindert wird [Esch *et al.* 1990; Maruyama *et al.* 1991; Selkoe, D.J 2004]. Bei dieser Prozessierung entstehen, analog zur β -Sekretase-Spaltung, das lösliche APP-Derivat sAPP α und das membranverankerte C-

terminale Fragment C83 bzw. α -stub. C83 wird anschließend durch die γ -Sekretase zu einem 3 kDa großen Fragment p3 gespalten [Hartmann 1999; St. George-Hyslop 2000].

Die α -Sekretase-Spaltung erfolgt intrazellulär, vorwiegend nach O- und N-Glykosylierung und Sulfatierung in späten Kompartimenten des sekretorischen Transportweges, sowie an der Zellmembran [Haass, C & Selkoe 1993].

1.4 Das Down Syndrom (DS)

Das Down Syndrom ist die häufigste genomische Störung, die rund eine von 700 aller Lebendgeburten unabhängig ihres Geschlechts, Ethik oder Rasse betrifft [Down 1866; George & Capone 2001]. DS bezeichnet eine spezielle Genmutation beim Menschen, nämlich die Verdreifachung des Chromosoms 21, weswegen das Down Syndrom auch oft als Trisomie 21 bezeichnet wird. Neben den typischen körperlichen Merkmalen sind in der Regel auch die kognitiven Fähigkeiten des Patienten beeinträchtigt.

Da das APP-Gen auf Chromosom 21 lokalisiert ist, zeigen Down Syndrom Patienten aufgrund der höheren APP-Expression bereits sehr früh die klassischen Symptome der Alzheimer Krankheit [Iwatsubo *et al.* 1995; Wisniewski *et al.* 1985]. Etwa 95% der über 40-jährigen DS-Patienten zeigen die typischen Alzheimer Syndrome. Aufgrund des frühen Ausbruchs und des starken Verlaufs der Krankheit bieten sich Zellen von DS-Patienten hervorragend zur Untersuchung APP relevanter Fragestellungen an.

1.5 Die Niemann Pick Krankheit (NPC)

Morbus Niemann Pick Typ C (NPC) ist eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte Speicherkrankheit, deren Verlaufsformen alle durch eine progressive Neurodegeneration gekennzeichnet sind [Higgins *et al.* 1992]. Die Krankheit wird durch Mutationen im NPC1- oder NPC2-Gen ausgelöst [Carstea *et al.* 1997; Naureckiene *et al.* 2000]. Diese Gene kodieren für Proteine, die im Wesentlichen für Funktionen im zellulären Stoffwechsel verantwortlich sind. Bei ca. 95% der Fälle liegt eine Mutation im NPC1-Gen vor, was zu einer Störung des intrazellulären Lipidtransportes führt [Cruz *et al.* 2000; Patterson *et al.* 2001; Carstea *et al.* 1997].

Ein gemeinsames Merkmal von NPC und AD sind die neurofibrillären Tangles, die sowohl immunologisch als auch ultrastrukturell in beiden Erkrankungen nicht zu unterscheiden sind [Brown & Goldstein 1999]. Der gestörte Lipidtransport in NPC wirkt sich vor allem auf die Verteilung und Zirkulation von Cholesterin aus. Da auch die Alzheimer Erkrankung immer wieder mit Cholesterin in Verbindung gebracht wird, bieten sich auch NPC-Zellen zur Analyse der APP-Prozessierung an [Galbete *et al.* 2000; Kern *et al.* 2006].

1.6 Entzündungsprozesse in AD

Obwohl A β eine tragende Rolle bei der AD-Pathogenese zugeschrieben wird, herrscht immer noch Unklarheit darüber, ob A β und die neurofibrillären Bündel die Ursache der Alzheimer Erkrankung darstellen [Walsh *et al.* 2002; Walsh & Selkoe 2004]. Diese Zweifel werden unterstützt von der Tatsache, dass die A β -Last alleine kaum ausreicht, um den fortschreitenden und schweren Verlauf der Neurodegeneration in AD zu erklären [Braak & Braak 1998; Davis & Laroche 2003]. Jedoch konnte in einigen Experimenten nachgewiesen werden, dass von A β_{40} -gebildete Protofibrillen und Oligomere einen Beitrag zur frühzeitigen Schädigung der Dendriten und Synapsen leisten und somit zur neuronalen Fehlfunktion [Walsh *et al.* 2002].

Zusätzlich zu diesen toxischen Effekten kann A β aber auch durch Mikroglia- und Astrozyten-Aktivierung die Neurodegeneration fördern. Die Anregung der Entzündungsantwort durch Mikroglia resultiert in einer Freisetzung von verschiedenen Entzündungsmediatoren, wie z.B. neurotoxischen Zytokinen [Akiyama *et al.* 2000; Tan *et al.* 1999]. Sobald die Mikroglia aktiviert sind können sie Astrozyten anregen, die wiederum die Entzündungsantwort auf extrazelluläres A β erhöhen. Dies ergibt einem Teufelskreis, der zu einer verstärkten Bildung von A β und schließlich der Neurodegeneration führen kann.

Inflammatorische Zytokine werden von Mikroglia und Astrozyten, welche die neuritischen Plaques umgeben, sezerniert. Zu den Zytokinen, die mit AD in Verbindung gebracht werden, zählen Interleukine und Interferone. Zum Beispiel kann Interleukin 6 (IL6) die APP-Prozessierung und die A β -Produktion *in vitro* regulieren [Blasko *et al.* 1999]. Im Gegenzug konnte von verschiedenen Gruppen gezeigt werden, dass fibrilläres A β neurotoxische

Produkte, pro-inflammatorische Zytokine und reaktive Oxygen-Spezies („ROS“) erhöht [Eikelenboom *et al.* 1994; Eikelenboom & van Gool 2004; McGeer, P.L. & McGeer 1995].

Die Bildung und Sekretion von pro-inflammatorischen Mediatoren kann auf verschiedener Weise mit neurodegenerativen Mechanismen wechselwirken. So können viele pro-inflammatorische Zytokine nicht nur neuropathologische Mechanismen, und somit den neuronalen Tod, anregen, sondern auch klassische neurodegenerative Wege wie die APP-Prozessierung beeinflussen.

1.7 Der Einfluss von Sirtuinen auf die APP-Prozessierung

Sirtuine gehören zur Klasse III der Histon-Deacetylasen, die sich von Klasse I und II dadurch unterscheiden, dass sie Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (NAD⁺) als Cofaktor für die Katalyse benötigen. Sie sind benannt nach ihrem Hefehomolog Sir2 („silent information regulator 2“) [Frye 1999; Frye 2000; Vaziri *et al.* 2001] und sind hoch konserviert in Organismen von Archaeobakterien bis zum Menschen [Braunstein *et al.* 1993; Brachmann *et al.* 1995]. Im Menschen wurden bis jetzt 7 Sirtuine entdeckt, welche für die Deacetylasen SIRT1-7 kodieren [North & Verdin 2004].

Sirtuine sind an der Regulation zahlreicher zellulärer Vorgänge beteiligt, die sich in drei große Gruppen einteilen lassen: (1) Transkriptionskontrolle, (2) Regulation metabolischer Prozesse und (3) Regulation des programmierten Zelltodes (Apoptose) [Brunet *et al.* 2004; Langley *et al.* 2002; Sauve *et al.* 2006; Vaziri *et al.* 2001; Luo, J. *et al.* 2001]. Durch die erwähnten Vorgänge sind Sirtuine auch an Alterungsvorgängen beteiligt [Guarente 2000]. So konnte von Lin *et al.* gezeigt werden, dass zur Lebensverlängerung in *S. cerevisiae* (Bäckerhefe) unter Kalorienrestriktion (CR) NAD⁺ und Sir2 benötigt werden [Lin *et al.* 2000]. Im Fadenwurm *C.elegans* führt eine Überexpression von Sir2.1, eines engen Sir2-Verwandeten, zu einer Lebenszeitverlängerung um 50% [Tissenbaum & Guarente 2001].

Interessanterweise wurde in einem Mausmodell entdeckt, dass CR zu einer Verringerung der AD-Symptome führt [Mattson *et al.* 2003; Patel *et al.* 2005; Wang *et al.* 2005]. Auch konnten Wang *et al.* zeigen, dass in CR-Tieren die Konzentration von sAPP α im Gehirn eine mehr als zweifache Steigerung aufweist. Ebenso zeigten die CR-Mäuse einen signifikanten ADAM10-

Anstieg von 30%. Dies zeigt eine Verbindung zwischen Kalorienrestriktion, und somit von SIRT1 und der Alzheimer-Erkrankung auf.

1.8 Fibroblasten als zelluläres Altersmodell

Altern ist definiert als die mit steigendem Lebensalter abnehmende Fähigkeit, ursprünglich vorhandene physiologische Prozesse aufrecht zu erhalten. Das Altern des Gehirns z.B. vermindert die kognitiven und motorischen Leistungen und führt so zu morphologischen und funktionellen Veränderungen bestimmter Populationen von Nervenzellen. Dadurch erhöht sich das Risiko, eine neurodegenerative Erkrankung zu erleiden. Die Frage, warum wir altern, ist bis heute nicht geklärt und stellt die Grundlage intensiver Forschung dar [Kenyon 2005].

Um Altern und Alterungsvorgänge zu erforschen, bieten sich mehrere Modellorganismen an, wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* oder *Mus musculus*. Auf zellulärer Ebene kommen sehr häufig Fibroblasten zum Einsatz. Sie haben den Vorteil, dass sie schnell und kontrolliert altern. In Zellkultursystemen werden Änderungen jedoch außerhalb des Organismus untersucht, weshalb eine Übertragung auf *in vivo* Situationen nicht einfach zu gestalten ist [Cristofalo *et al.* 2004].

Seit Hayflick und Moorhead 1961 entdeckten, dass Fibroblasten nur eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen unterlaufen, haben sich diese Zellen zu einem gut charakterisierten zellulären Altersmodell entwickelt [Hayflick & Moorhead 1961]. Nach anfänglich hoher Proliferation treten Fibroblasten in eine Phase mit stark verringerter Teilungsfrequenz ein, der letztendlich der Wachstumsarrest der Zellen folgt. Dieser zelluläre Proliferationsstopp wird als „replikative Seneszenz“ bezeichnet, die nicht nur in Fibroblasten, sondern in vielen anderen Zelltypen nachgewiesen werden konnte [Flanary & Streit 2004; Rheinwald & Green 1975]. Ausschlaggebend für das Erreichen der Seneszenz ist die Gesamtzahl der Zellteilungen bzw. Populationsverdopplungen (PDLs) [Campisi, J. *et al.* 1996].

Das charakteristische Merkmal der replikativen Seneszenz stellt der zelluläre Proliferationsstopp dar, der irreversibel ist und auch durch mitogene Stimuli nicht umgangen werden kann. Die Seneszenz ist mit einer veränderten Morphologie, wie der Vergrößerung des Zellumfanges und einiger Organellen, einer irregulären Zellgestalt und einer abgeflachten

Zellstruktur gekennzeichnet [Cristofalo *et al.* 2004]. Auch sind biochemische und physiologische Vorgänge in seneszenten Zellen verändert und betreffen den intrazellulären Transport [Benvenuti *et al.* 2002], apoptotische Mechanismen [Campisi, J. 2003], Zellzyklus [Atadja *et al.* 1995] und die Proteindegradation [Sitte *et al.* 2000]. Ebenso werden viele Proteine im Laufe der Alterung dysreguliert, wie z.B. Caveolin1 oder p21, die daher als Altersmarker eingesetzt werden können [Trogakos *et al.* 2006].

1.9 Fragestellung

Die Alterung ist der größte Risikofaktor, um an einer Demenz zu erkranken. Dabei stellt die Alzheimer Erkrankung die am häufigsten auftretende Krankheit dar. Der wohl entscheidende Schritt bei der Entstehung einer Demenz vom Alzheimer-Typ ist die Bildung von A β -Plaques, die durch proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins entstehen.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der zellulären Alterung auf die APP-Prozessierung in Zellen unterschiedlicher neurodegenerativer Erkrankungen –familiäre Alzheimer-Erkrankung (FAD), Niemann Pick Typ C-Krankheit (NPC) und Down Syndrom (DS)- analysiert werden. Dafür sollten die untersuchten Fibroblasten zuerst in Kultur gealtert werden und der seneszente Phänotyp bestätigt werden. Anschließend sollte die APP-Prozessierung mit den beteiligten Sekretasen im Vergleich junge gegen seneszente Zellen untersucht werden und eventuelle Unterschiede, die durch die zelluläre Alterung entstehen könnten, aufgezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Absaug-System VacuSafe	Integra, Fernwald
Axiovert Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss, Göttingen
Brutschränke	Binder, Tuttlingen
Dampfsterilisator VarioClav	H+P, Oberschleißheim
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Inkubatoren	Binder, Tuttlingen
Image Master VDS Software	Pharmacia
iQ Real-Time-PCR Thermozykler	Biorad, München
Kryostat HM 500 OM	Microm, Walldorf
Luminometer	Wallac Inc.
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Thermo Labsystems, Ulm
Mini Protean III, Western Blotting System	BioRad, München
pH-Meter	inoLab, Weilheim
PCR DNA Thermozykler	Biometra, Göttingen
pH-Meter	inoLab, Weilheim
Power Pack 300	BioRad, München
Power Pack 200	BioRad, München
Sterilbänke	Heraeus, Hanau
Swing-Out Rotor (TLS 55)	Beckmann, München
Spektrophotometer	Beckmann, München
Sub-CellGT Agarose Gel Elektrophorese System	BioRad, München
Trans-Blot	BioRad, München
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckmann, Krefeld
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen
XCell Sure Lock Western Blotting System (NuPAGE)	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Chemikalien

100 bp DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
Agarose	PeqLab, Erlangen
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
APS	Sigma, Taufkirchen
Bacto-Agar	Difco Lab, Detroit, USA
β -Mercaptoethanol	Fluka, Neu-Ulm
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
ECL	Amersham, Braunschweig
Elvanol (Polyvinylalkohol)	Sigma, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
D19 Developer	Kodak, Stuttgart
dNTPs	Peqlab, Erlangen
Dulbecco's PBS	Gibco, Paisley, Schottland
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Fixierungslösung	Kodak, Stuttgart
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Paisley, Schottland
G418	Calbiochem, Frankfurt
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Serva, Heidelberg
Pferdeserum	Gibco, Paisley, Schottland
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
DMEM	Gibco Paisley, Schottland
Methanol	Merck, Darmstadt
Methyl- β -Cyclodextrin	Sigma, Taufkirchen
MgCl ₂	Merck/Gibco, Darmstadt

MnCl ₂	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NaN ₃	Merck, Darmstadt
Oligo dT ₂₃ Primer	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin-/Streptomycin-Lösung	Bio Whittaker, Rockland, USA
PCR Primer	Interactiva, Ulm
Poly-L-Ornithin	Sigma, Taufkirchen
Poly-Phenylendiamin	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma, Taufkirchen
RbCl ₂	Merck, Darmstadt
Rinderalbumin	Sigma, Taufkirchen
SDS	Merck, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Select Yeast Extract	Gibco, Paisley, Schottland
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Stripped Rinderserum	HyClone Pierce Bioscience, Bonn
Sulphosalicylsäure	Sigma, Taufkirchen
TEMED	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Gibco, Paisley, Schottland
Trypsin/EDTA	Gibco, Paisley, Schottland
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
X-Gal	Roth, Karlsruhe

2.1.3 Molekularbiologische Reaktionssysteme (Kits)

Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Reaktionssysteme, die nach Herstellerangaben eingesetzt wurden.

Bezeichnung	Hersteller
Absolutely RNA RT-PCR Miniprep Kit	Stratagene, Amsterdam, NL
Amplex®Red Cholesterol Assay Kit	Molecular Probes, Paisley, UK
α -Secretase Activity Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
Blood & Cell Culture DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, Germany
β -Secretase Activity Assay Kit	BioVision, Freiburg, Germany
CpGenome Modification Kit	Intergen, Oxford, UK
γ -Secretase Activity Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Omniscript Reverse Transcriptase	Qiagen, Hilden, Germany
pGEM®-T Easy Vector System II	Promega, Mannheim, Germany
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden, Germany
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Germany
SYBR®Green Supermix	Biorad, München, Germany
Venor®GeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin, Germany

Tabelle 2.1: Verwendete Reaktionssysteme

2.1.4 Weitere Verbrauchsmaterialien

Gel-Blotting Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Hybond N ⁺ Nylontransfermembran	Amersham, Freiburg
pH-Papier	Merck, Darmstadt
Potran Nitocellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart

2.1.5 Allgemeine Enzyme

Proteinase K	Qiagen, Hilden, Germany
RNase	Promega, Madison, USA
DNase I, RNase-frei	Boehringer, Mannheim

2.1.6 Restriktions-Endonukleasen

Eine Übersicht der verwendeten Restriktionsenzyme und die für den Verdau notwendigen Puffer und Temperaturen liefert Tabelle 2.2.

Enzym	Puffer	Inkubations- temperatur	Hersteller
<i>Bam</i> HI	NEB 2 + BSA	37 °C	New England Biolabs, Frankfurt/ Main
<i>Taq</i> I	NEB 2 + BSA	65 °C	New England Biolabs, Frankfurt/ Main

Tabelle 2.2: Verwendete Restriktions-Endonukleasen

2.1.7 Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller
6E10	Signet Laboratories, Dedham, MA, USA
22C11	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Aktin	Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
ADAM10	Chemicon, Temecula, CA, USA
Anti-APP , C-Terminal (A8717)	Sigma, Saint Louis, MO, USA
BACE1	Abcam, Cambridge, MA, USA
Caveolin 1	BD Transduction, Franklin Lakes, NJ, USA
CT-15, APP zyttoplasmatische Domäne	Biosource, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA
Neprilysin	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Nicastrin	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Notch 1	Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
p21	BD Transduction, Franklin Lakes, NJ, USA
Presenilin	Zymed, San Francisco, CA, USA
Sirt 1	Novus Biologicals Inc., Littleton, CO, USA
Thy-1	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2.3: Verwendete Primärantikörper

2.1.8 Sekundärantikörper

Tabelle 2.4 zeigt alle verwendeten Sekundärantikörper, wobei WB für Western Blot und IF für Immunfluoreszenz steht.

Bezeichnung	Hersteller
anti-Maus, HRP konjugiert (WB)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA
anti-Kaninchen, HRP konjugiert (WB)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA
anti-Ziege, HRP konjugiert (WB)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA
anti-Maus, Cy2/Cy3 (IF)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA
anti-Kaninchen, Cy2/Cy3 (IF)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA

Tabelle 2.4: Verwendete Sekundärantikörper

2.1.9 Verwendete Primer

Primerbezeichnung	Sequenz
RPL19 sense	5`-GAAATCGCCAATGCCAACTC-3`
RPL19 antisense	5`-TTCCTTGGTCTTAGACCTGCG-3`
BACE1 sense	5`-ACCGACCTGGTAAGCATCC-3`
BACE1 antisense	5`-GGAGAAGAGGTTGGGAACGTG-3`
Cav1prom1 sense	5`-TGTGTATTTTGTAATATGGTATAATTTG-3`
Cav1prom1 antisense	5`-CCATCTCTACCTTAAAACACAT-3`
Aktin sense	5`-CTACAATGAGCTGCGTGTGGC-3`
Aktin antisense	5`-CAGGTCCAGACGCAGGATGGC-3`

Tabelle 2.5: Übersicht aller verwendeten Primer

2.1.10 Computerprogramme

Computerprogramm	Verwendung
Chromas (Technelysium, Helensvale, Australien)	Auswertung von Sequenzierungen
Clone Manager 5 (Scientific & Educational software)	Planung von Klonierungsstrategien und Restriktionsanalysen
iCycler-Software (Biorad, München, Germany)	Analyse der Real-Time PCR
PubMed (bereitgestellt von NCBI, Internetadresse: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)	Literatursuche, Plasmid- (“nucleotide”) und Proteinsuche (“protein”)
BLAST (bereitgestellt von NCBI, Internetadresse: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)	Vergleichende Analyse von Nukleotid- und Proteinsequenzen

Tabelle 2.6: Verwendete Computerprogramme

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten durchgeführt. Für die Zellkultur verwendete Plastikware stammte von der Firma TPP, Trasadingen, Schweiz.

2.2.1.1 Verwendete Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden, wenn nicht anders angegeben, vom *Coriell Institut for Medical Research*, Camden, USA, bezogen.

Zellstamm	Nährmedium	Herkunft
IMR90 normale, humane Fibroblasten Catalog ID: I90	phenolrot-freies DMEM 10% Aktivkohle-behandeltes FBS 1% Natriumpyruvat 100 U/ml Penicillin/Streptomycin	1975 etabliert aus dem Lungengewebe eines klinisch normalen, 16 Wochen alten weiblichen Fötus (Karyotyp: 46, XX). [Nichols 1977]

<p>AG06840 FAD, humane Fibroblasten Catalog ID: AG06840</p>	<p>phenolrot-freies DMEM 10% Aktivkohle-behandeltes FBS 1% Natriumpyruvat 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin</p>	<p>1983 etabliert aus Zellen einer Unterarm-Hautbiopsie eines 52-jährigen Mannes mit familiärer Alzheimer-Erkrankung (Karyotyp: 46, XY) Missense-Mutation {Ala246Glu (A246E)} im AD3[Präsenilin 1(PSEN 1)] Gen [Nee <i>et al.</i> 1983]</p>
<p>AG00364 FAD, humane Fibroblasten Catalog ID: AG00364</p>	<p>phenolrot-freies DMEM 10% Aktivkohle-behandeltes FBS 1% Natriumpyruvat 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin</p>	<p>1974 etabliert aus Zellen einer Oberarm-Hautbiopsie eines 53-jährigen Mannes, der bereits mit 42 Jahren eine fortgeschrittene Demenz aufwies (Karyotyp: 46, XY). Es sind keine Angaben zu möglichen Gen-Mutationen vorhanden. [Peterson <i>et al.</i> 1986]</p>
<p>GM03123 Niemann-Pick-Type C1, humane Fibroblasten Catalog ID: GM03123</p>	<p>phenolrot-freies DMEM 10% Aktivkohle-behandeltes FBS 1% Natriumpyruvat 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin</p>	<p>Fibroblasten eines 9-jährigen Mädchens (Karyotyp 46, XX). Trägt Missens-Mutation in beiden Allelen des NPC Gen (709 C>T; 3182 T>C).</p>
<p>AG05397 Trisomie 21, humane Fibroblasten Catalog ID: AG05397</p>	<p>phenolrot-freies DMEM 10% Aktivkohle-behandeltes FBS 1% Natriumpyruvat 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin</p>	<p>1982 etabliert aus Zellen der Thorax-Hautbiopsie eines 1-jährigen Jungen (ante-mortem). Spender zeigte charakteristische Merkmale des Down Syndroms; (Karyotyp 47, XY, +21).</p>
<p>GM01652 normale, humane Fibroblasten Kontrollzelllinie für GM03123</p>	<p>phenolrot-freies DMEM 10% Aktivkohle-behandeltes FBS 1% Natriumpyruvat 100 U/ml Penicillin/</p>	<p>Etabliert aus Zellen der Unterarm-Hautbiopsie eines 11-jährigen Mädchens (Karyotyp 46, XX)</p>

Catalog ID:GM01652	Streptomycin	
GM05659 normale, humane Fibroblasten Kontrollzelllinie für AG05397 Catalog ID: GM05659	phenolrot-freies DMEM 10% Aktivkohle-behandeltes FBS 1% Natriumpyruvat 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin	Etabliert aus Zellen der Thorax- Hautbiopsie eines 1-jährigen Jungen (Karyotyp 46, XY).
N2a Maus Neuroblastom Zelllinie ATCC (American Type Cell Collection) Catalog ID:CCL-131	50% Opti-MEM 50% DMEM 10% aktives FBS 1% Natriumpyruvat 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin	Der Klon Neuro-2a wurde von einem spontanen Tumor einer A Albino-Maus gewonnen. [Klebe & Ruddle 1969]

Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten Zelllinien

2.2.1.2 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden bei 37°C im Begasungsbrutschrank bei 95% rel. Luftfeuchte und 5% CO₂ gehalten. Die Kultivierung erfolgte in dem für die Zellen angegebenen Nährmedium (siehe Tabelle 2.7). Die Zellen wurden bei 80-90%iger Konfluenz passagiert. Dazu wurde das verbrauchte Medium entfernt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und schließlich durch Zugabe von 1x Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt. Die Zellen wurden für 4 min bei 800 g abzentrifugiert, in frischem Nährmedium resuspendiert und in geeigneten Zellzahlen auf frischen Platten neu ausgesät.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Lebendzellzahl wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierfür wurden nach Trypsinierung der Zellen 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau versetzt, um die Vitalität der Zellen zu überprüfen. Dieser Farbstoff kann die Membran lebender Zellen nicht passieren, daher werden nur tote Zellen blau angefärbt. Die Zellzahl errechnet sich wie folgt:

$$\text{Lebendzellzahl / ml} = \text{Mittelwert lebender Zellen der 4 Großquadrate} \times 2 \times 10^4$$

Hierbei entspricht 10^4 dem Umrechnungsfaktor auf 1 ml und 2 dem Verdünnungsfaktor mit Trypanblau.

2.2.1.4 Bestimmung der Populationsverdopplungen (PDL)

Um das aktuelle Alter der Zellkulturen zu bestimmen, wurde bei jeder Passage die Populationsverdopplung berechnet. Bei Kenntnis der lebenden Zellen und der in der vorhergehenden Passage ausgesäten Zellen, lässt sich die Populationsverdopplung nach folgender Gleichung berechnen:

$$(\log C_h - \log C_s) / \log 2,$$

wobei C_h der Zellzahl lebender, geernteter Zellen und C_s der Zellzahl ausgesäter Zellen entspricht.

2.2.1.5 Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)/ Kryokultivierung

Eukaryontische Zellen können in flüssigen Stickstoff eingefroren und somit über Monate hinweg haltbar gemacht werden. Dazu wurden subkonfluente Zellen durch Trypsinierung von den Platten gelöst und die aktuelle PDL bestimmt (siehe 2.2.1.4). Nach anschließender Zentrifugation wurde das Pellet in Kulturmedium, welches mit 10% DMSO versetzt wurde, resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Dauerkulturen wurden in isopropanolhaltigen Einfrierboxen, welche eine Kühlungsrate von 1°C pro Minute gewährleisten, bei -80°C eingefroren und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

Eingefrorene Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem man sie nach schnellem Auftauen in Nährmedium wäscht und anschließend wieder auf Kulturplatten ausplattiert.

2.2.1.6 Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität

Die seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA β -Gal) wird von seneszenten Zellen exprimiert und ist histochemisch bei pH 6,0 nachweisbar [Dimri *et al.* 1995]. Sie dient daher als Nachweis der zellulären Seneszenz. Die Aktivität der β -Galaktosidase kann durch Spaltung von farblosen 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal) durch β -

Galaktosidase ermittelt werden. Bei der Spaltung entstehen Galaktose und ein Indoxylderivat, welches spontan dimerisiert und als blauer Farbstoff präzipitiert.



Abbildung 2.1: Spaltung von X-Gal durch β -Galaktosidase

Die Färbung erfolgte mit dem Senescent Cells Staining Kit der Firma Sigma-Aldrich und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden mindestens 500 Zellen pro Kulturschale bezüglich der Blaufärbung analysiert und die Prozente gefärbter Zellen gegen die Gesamtzellzahl errechnet.

2.2.1.7 Kontrolle der Zellkultur auf Mykoplasmenkontamination

Infektionen von Zellkulturen mit Mykoplasmen sind langwierig, schwierig zu detektieren und schwer zu beseitigen. Statistiken bewiesen, dass 30 bis 60 % aller Zellkulturen mit Mykoplasmen kontaminiert sind. Diese Kontaminationen führen zu einer veränderten Wachstumsrate, Morphologie und Entwicklungsfähigkeit der Zellen. Aus diesem Grund können Mykoplasmen die Ergebnisse von Zellkulturexperimenten stark beeinflussen. Deshalb wurden die verschiedenen Zellkulturen in regelmäßigen Abständen auf eine Mykoplasmenkontamination untersucht. Die Untersuchung wurde mit Hilfe des Mykoplasmen-Kits (Venor®GeM Mycoplasma Detection Kit) der Firma Minerva Biolabs nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Gewinnung von Zelllysate

Auf 10 cm Zellkulturschalen gewachsene Zellen wurden 2 x mit kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 - 200 μ l frisch angesetzttem 1x Lysispuffer wurden die Zellen

mechanisch von den Platten geschabt, mittels Ultraschall aufgeschlossen und anschließend 5 min bei 95°C inkubiert. Die Lagerung der Proteinproben erfolgte bei -80°C.

<i>1x Lysispuffer</i>	<i>60 mM Tris-HCL (pH 6,8)</i>
	<i>2% SDS</i>
	<i>10% Saccharose</i>
	<i>5 µg/ml Aprotinin</i>
	<i>10 mM PMSF</i>

2.2.2.2 Quantifizierung von Proteinen

Der BCA-Test stellt eine colorimetrische Methode zur Quantifizierung des Proteingehalts dar, welche auf der Bildung eines farbigen Komplexes von Cu^+ mit Bicinchoninsäure (BCA) basiert [Smith, P.K. *et al.* 1985]. Dabei wird die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ im alkalischen Milieu ausgenutzt. In dieser Arbeit wurde der auf dieser Methode beruhende BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce benutzt. Zuerst wurde eine Eichkurve mit BSA als Standard in Konzentrationen von 0,1 mg/ml bis 0,8 mg/ml erstellt. Die Proteinproben wurden 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt. Zu den verdünnten Proben bzw. zu der Eichlösung wurden je 1000 µl Testlösung (50 Teile BCA Reagenz A, ein Teil BCA Reagenz B) pipettiert und die Ansätze für 15 min bei 60°C inkubiert. Die Konzentration der Proteine wurde im Abgleich zur Eichkurve bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562$ nm photometrisch bestimmt.

2.2.2.3 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von Lipid-Rafts

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf 10 cm Schalen bis zu einer Dichte von 80% kultiviert. Nach zweimaligen Waschen mit kaltem 1x PBS wurden die Zellen in 1x PBS von der Zellkulturschale geschabt und durch Zentrifugation (14.000 rpm, 10 min) pelletiert. Das Pellet wurde in 300 µl CHAPS-Lysispuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (14.000 rpm, 10 min) wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen einer 80% (w/v) Saccharose-Lösung (in Lysispuffer ohne CHAPS) gemischt und in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Die Probe wurde mit 1300 µl einer 30% (w/v), sowie 250 µl einer 5% (w/v) Saccharose-Lösung (in Lysispuffer ohne CHAPS) überschichtet und für 2 h bei 4°C und 100.000 g unter Verwendung eines Beckmann Swing-Out Rotors (TLS 55, 55.000 rpm) zentrifugiert. Die Lipid-Rafts reichern sich unter diesen Bedingungen aufgrund ihrer geringen Dichte zwischen der 5%- und der 30%-Schicht an, während frei

Lösung	Trenngel (8%)	Trenngel (12%)	Sammelgel (4,5%)
40% Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	2 ml	3 ml	0,75 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4% SDS	2,5 ml	2,5 ml	-
0,6 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4% SDS	-	-	2,5 ml
dH ₂ O	5,5 ml	4,5 ml	6,5 ml
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Tabelle 2.8: Pipettierschema für Polyacrylamid (PAA)-Gele

Für die Elektrophorese wurden die Proben mit denaturierendem 1x Auftragspuffer versetzt und 1 min bei 99°C gekocht, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Als Größenstandard diente der Prestained PeqGold Protein-Marker IV der Firma Peqlab. Die Proben konnten bei 100 V in 1x SDS-Laufpuffer ins Gel einlaufen. Bei Erreichen des Trenngels wurde auf 150 V erhöht. Bei Verwendung der NuPAGE Bis-Tris Gradientengele diente 1x MES Puffer (Invitrogen) als Laufpuffer und die Trennung erfolgte bei 120 V. Nach Austritt der Bromphenolblau-Front wurde der Lauf gestoppt und die Gele entweder geblottet (3.2.2.6) oder gefärbt (3.2.2.5).

4x Auftragspuffer *50 mM Tris-HCl (pH 6,8)*
 2% SDS
 10% Glycerol
 0,005% Bromphenolblau
 20% (v/v) β-Mercaptoethanol

1x SDS-Laufpuffer *24 mM Tris Base*
 250 mM Glycin
 0,1% (v/v) SDS

2.2.2.5 Coomassie-Blaufärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die SDS-Gele wurden 30-60 min unter Schütteln bei Raumtemperatur (RT) in der Färbelösung inkubiert und anschließend bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden unter

mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung entfärbt. Die Dokumentation erfolgt durch Scannen des Gels.

Färbelösung *0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R 250*
50% (v/v) Ethanol
10% (v/v) HOAc
40% (v/v) H₂O bidest

Entfärbelösung *73% H₂O bidest*
20% (v/v) Ethanol
7% (v/v) HOAc

2.2.2.6 Western Blot Analyse

Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Proteine zum immunologischen Nachweis auf eine Nitrozellulose-Membran mit Hilfe einer Semi-Dry-Blotapparatur (Biorad) übertragen. Dazu wurden sechs Filterpapiere und eine Membran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Das Gel wurde auf die Nitrozellulose-Membran gelegt und zwischen Schwammplatten und Filterpapier in die Sandwichplatten geklemmt. Diese Platten wurden in die mit Transferpuffer gefüllte Tankblot-Kammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei 30 V über Nacht.

Transferpuffer *150 mM Glycin*
20 mM Tris-HCl, pH 8,3
10% Methanol (v/v)

2.2.2.7 Ponceau S-Färbung

Um den Erfolg des Proteintransfers auf die Nitrozellulose-Membran zu überprüfen, erfolgte eine reversible Ponceau S-Färbung. Nach dem Proteintransfer auf die Membran wird diese kurz in Wasser gewaschen und schließlich für 5 min in Ponceau S-Lösung inkubiert. Die Proteinbanden wurden sichtbar, sobald der Hintergrund entfärbt war. Durch mehrmaliges Waschen mit PBS konnte die Membran vollständig entfärbt werden.

<i>Ponceau S-Lösung</i>	<i>0,02% Ponceau</i>
	<i>0,3% Trichloressigsäure</i>
	<i>0,2% Sulphosalicylsäure</i>

2.2.2.8 Immunoblot

Um die zu analysierenden Proteine auf der Membran selektiv sichtbar zu machen, wurden spezifische Antikörper gegen diese Proteine eingesetzt (siehe 2.1.7/2.1.8). Zuerst wurden jedoch unspezifische Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation der Membran in Blockierungspuffer abgesättigt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in PBS/Tween-20 (PBST) über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde 3-mal für 10 min in PBST gewaschen, anschließend für 1 h mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper bei RT inkubiert und schließlich nochmals dreimal gewaschen. Um die durch den Antikörper detektierten Banden sichtbar zu machen, wurde das ECL-Protokoll der Firma Amersham benutzt. Dazu wird die Membran mit 1 ml ECL-Lösung benetzt und die Proteinbanden konnten in der Entwicklermaschine LAS-3000 (Fujifilm) oder mithilfe von Röntgenfilmen detektiert werden.

<i>Blockierungspuffer</i>	<i>1x PBS</i>
	<i>0,05% Tween-20</i>
	<i>5% (w/v) Trockenmilchpulver</i>

<i>PBS/Tween-20</i>	<i>1x PBS</i>
	<i>0,05% Tween-20</i>

<i>10x PBS</i>	<i>27 mM KCL</i>
	<i>1,37 M NaCl</i>
	<i>100 mM Na₂PO₄</i>
	<i>18 mM KH₂PO₄</i>

2.2.2.9 Strippen von Membranen

Um unterschiedliche Proteine auf derselben Membran zu detektieren, ist es notwendig, die Antikörper der vorangegangenen Detektion zu entfernen. Dazu wurde die Membran 30 min bei 60°C mit Stripping-Puffer inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für je 15 min

Primärantikörper-Lösungen

<i>Thy-1</i>	<i>1:100</i>
<i>PBS</i>	<i>1x</i>
<i>FCS</i>	<i>10% (v/v)</i>

<i>DAPI</i>	<i>1:100</i>
<i>PBS</i>	<i>1x</i>

Sekundärantikörper-Lösung

<i>Anti-mouse-Cy3</i>	<i>1:100</i>
<i>PBS</i>	<i>1x</i>
<i>FCS</i>	<i>10% (v/v)</i>

Eindeckmedium *3 g Elvanol (Polyvinylalkohol, Typ II) wurde langsam in 21 ml 1x PBS bei 60°C unter Rühren gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wird 9 ml Glycerin zugegeben und für 16 h bei RT gerührt. Der Zusatz von 30 mg poly-Phenylendiamin erfolgte unter Lichtausschluss. Die Lösung wurde auf pH 8 eingestellt, auf 1 ml Spritzen verteilt und bei -80°C im Dunkeln gelagert.*

2.2.2.11 Enzymatische Aktivitätsbestimmungen

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der α -, β - bzw. γ -Sekretasen erfolgt mit dem jeweiligen Secretase Activity Assay Kit nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde für die Bestimmung des totalen Zelllysats 25 μ g Protein eingesetzt, für die Bestimmung der Sekretase Aktivität in Lipid Raft Fraktionen je Fraktion 50 μ l.

2.2.2.12 Bestimmung des freien Cholesteringehalts

Mit Hilfe des Amplex® Red Cholesterol Assay Kit (Molecular Probes) wurde die Cholesterinbestimmung nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die in der Probe befindlichen Cholesterylester mittels der Cholesterinesterase in freies Cholesterin umgesetzt. Nach dieser ersten Reaktion lag das gesamte Cholesterin in der Probe als freies

2.2.3.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Es wurde eine 25 ml LB-Kultur mit einer Kolonie *E.coli* DH5 α inokkultiert und üN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 20 ml der frischen Übernachtskultur wurden verwendet, um 1 l LB anzuimpfen. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer Dichte von OD₆₀₀ ~ 0,5 – 0,6 (optische Dichte bei 600 nm) unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Hierbei war es erforderlich, alle 30 min eine Probe zu entnehmen, um den ungefähren Zeitpunkt des Erntens vorhersagen zu können. Die Bakteriensuspension wurde zur Abkühlung 5 min auf Eis gestellt und 10 min bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Zellsediment in 15 ml kaltem TFB 1-Puffer resuspendiert. Unter gelegentlichem Schütteln wurden die Zellen 60 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4.000 rpm und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2 ml TFB 2-Puffer vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde in Aliquots von je 200 μ l aufgeteilt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -80°C sind die Bakterien etwa 6 Monate haltbar.

TFB 1-Puffer

- 100 mM Rubidiumchlorid*
- 50 mM Magnesiumchlorid*
- 30 mM Kaliumacetat*
- 10 mM Kalziumchlorid*
- 15% Glycerol, pH 5,8*

TFB 2-Puffer

- 10 mM Rubidiumchlorid*
- 15 mM Kalziumchlorid*
- 10 mM Mops*
- 15% Glycerol, pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen*

2.2.3.3 Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock

100 μ l kompetente *E.coli* DH5 α Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 μ l Ligationsansatz vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 90-sekündigen Hitzeschock bei 42°C und Abkühlung der Bakterien auf Eis wurden diese in 500 μ l SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C und 120 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf einer antibiotikahaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Inkubator kultiviert.

Für eine Blau/Weiß-Selektion auf Plasmid-Inserts in Bakterienkolonien wurden je Agarplatte 25 µl X-Gal und 1,25 µl 1M IPTG ausplattiert oder dem Agar beigemischt. Weiße Einzelkolonien der ausplattierten Transformation wurden mit Impfösen von der LB / Amp-Agarplatte aufgenommen und in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (50-100 µg/ml) als üN-Bakterienkultur bei 37°C im Inkubator kultiviert.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Allgemeine Vorschriften für das sterile Arbeiten mit RNA finden sich in Sambrook *et al.* [Sambrook *et al.* 1989]. Alle verwendeten Substanzen und Lösungen müssen RNase-frei sein.

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde der RNA RT-PCR Miniprep Kit von Stratagen eingesetzt, welcher eine Phenol / Chloroform-freie Gewinnung von RNA mittels eines Silika-Säulenprinzips ermöglicht. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Eine zusätzliche Behandlung der isolierten Gesamt-RNA mit DNase bei 37°C für 15 min verringert die Gefahr von DNA-Kontaminationen.

2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurden diese in TE verdünnt und die Absorption bei 260 nm in einer Küvette (Schichtdicke 1 cm) gegen TE gemessen. Bei der Berechnung der Konzentration wurden folgende Werte zugrunde gelegt:

$$\text{ds DNA } 50 \mu\text{g/ml bei OD}_{260} = 1$$

$$\text{RNA } 40 \mu\text{g/ml bei OD}_{260} = 1$$

Der Quotient $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurepräparationen. Bei reinen Nukleinsäurelösungen ist er $\geq 1,8$.

2.2.4.3 Isolierung von genomischer DNA aus Säugerzellen

Die Extraktion genomischer DNA ermöglicht molekularbiologische Analysen auf chromosomaler Ebene. Zur Isolierung genomischer DNA aus Zellen wurde das Blood & Cell

Culture DNA Mini Kit von QIAGEN entsprechend dem Protokoll des Herstellers für kultivierte Zellen verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils ca. $1 - 5 \times 10^6$ Zellen. Nach der Zellyse und dem Verdau mit Proteinase K wurde die freigesetzte DNA an eine Säulenmatrix gebunden, gewaschen und eluiert. Die gewonnene DNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.4.2) bei 4°C oder bei Lagerung über einen längeren Zeitraum bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4.4 Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus mRNA

Um aus der aus den Zellkulturen isolierten RNA eine PCR zu ihrer semiquantitativen Bestimmung durchführen zu können, musste zunächst die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte durch das Omniscript RT Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Oligo dT Primer lagern sich bei 37°C an die einzelsträngige mRNA an. Diese Anlagerung ermöglicht einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) eine rückläufige Kopie dieser RNA zu synthetisieren (cDNA). Zum Schluss wird die mRNA durch die RNase-H Aktivität der reversen Transkriptase degradiert.

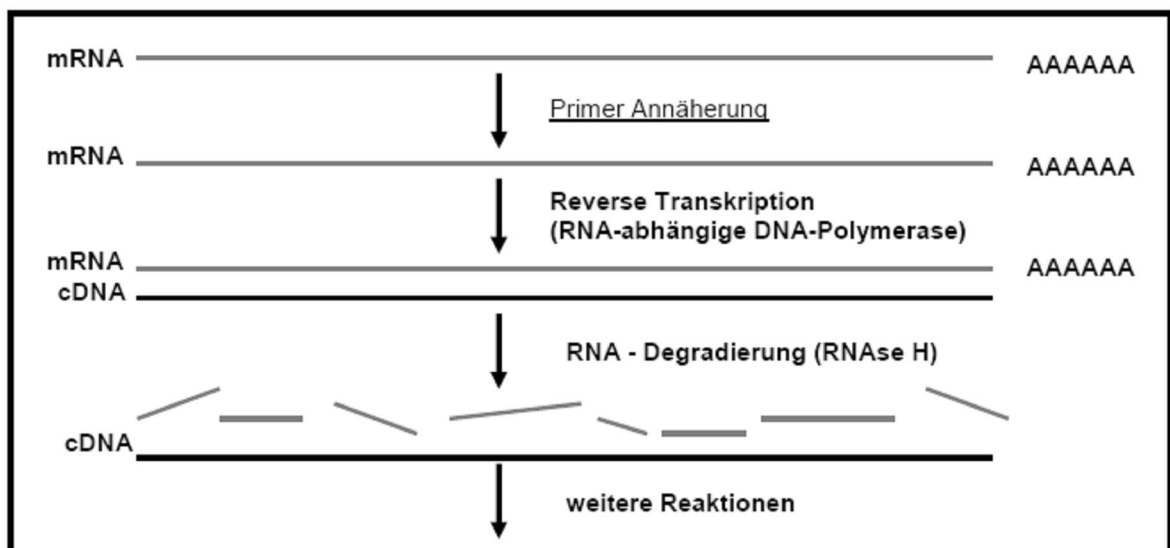


Abbildung 2.2: Prinzip der reversen Transkription (modifiziert nach Qiagen)

Mastermix

2 μl 10 x Puffer (Qiagen)

2 μl 5 mM dNTP

2 μl 10 μmol Oligo-dT₁₅-Primer

0,25 μl RNase-Inhibitor (40 U, Promega)

4 U Reverse Transkriptase (Omniscript, Qiagen)

500 ng - 2 µg Gesamt-RNA wurde mit DEPC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt und 5 min bei 65°C im Thermocycler inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren. Anschließend wurde die RNA-Lösung sofort auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der RNA-Moleküle zu verhindern. Zur RNA wurde je 10 µl Mastermix gegeben. Eine Kontrolle (Mock), die keine Reverse Transkriptase enthielt, wurde zum Nachweis auf DNA-Kontamination mitgeführt. Der Ansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert. Die cDNA wurde schließlich bei -20°C aufbewahrt. Jeweils 1 - 2 µl der cDNA wurde in die anschließende PCR zum Nachweis und zur relativen Quantifizierung bestimmter Zielgene eingesetzt.

2.2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur exponentiellen Amplifikation von Nukleinsäuren. Die PCR macht sich die Eigenschaft von DNA-Polymerasen zunutze, DNA zu duplizieren. Dabei werden zwei Oligonukleotide (ca. 20 Nukleotide), sog. Primer, benötigt, die jeweils komplementär zu den Enden der zu amplifizierenden DNA-Region sind. Die Primer müssen so orientiert sein, dass bei der Synthese der DNA-Moleküle diese aufeinander zulaufen. Nach der Hitze-Denaturierung der DNA bei 94°C können sich die Primer bei der anschließenden Abkühlung des Reaktionsansatzes an die DNA-Matrize anlagern (Annealing). Die hitzestabile *Taq*-Polymerase erstellt, ausgehend vom 3'-OH-Ende des Primers, durch Primer-Verlängerung eine Kopie der DNA-Matrize. Nachdem die gewünschte Sequenz synthetisiert ist, werden die Stränge durch Hitze einwirkung denaturiert. Durch erneute Senkung der Temperatur wird eine spezifische Bindung der Primer an die entstandenen DNA-Fragmente ermöglicht. Durch mehrmaliges Wiederholen dieses Zyklus wird eine Vervielfältigung des definierten DNA-Bereiches zwischen den Primern erreicht. Nachfolgend sind die Mengen und das Programm der PCR-Reaktion angegeben.

Reaktionsansatz:

- 1-5 ng Plasmid-DNA oder 100 ng gDNA oder 1-5 µl cDNA*
- 15 pmol sense-Primer*
- 15 pmol antisense-Primer*
- 2,5 µl 10x PCR-Puffer*
- 0,5 µl 10mM dNTP*
- 1 mM MgCl₂*
- 0,5 U Taq-Polymerase*
- ad 25 µl mit bidest. H₂O*

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Bezeichnung
1	95	300	Primäre Denaturierung
2	54-60 (Primerabhängig)	30-45	Anlagerung der Primer (Annealing)
3	72	60	DNA-Synthese (Extension)
4	95	30-45	Erneute Denaturierung
5	72	300	Vollständige Extension der teilweise synthetisierten DNA-Stränge
6	4	Pause	Abstoppen der Reaktion und Aufbewahrung

Tabelle 2.9: PCR-Cycler Programm

Die Schritte 2 bis 4 wurden, je nach Amplifikat, 30 - 40-mal wiederholt (30 - 40 Zyklen). Die Produkte der PCR-Reaktion wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.4.8) analysiert.

2.2.4.6 PCR-Analyse von Transformandenklonen

Der Erfolg einer Plasmid-Transformation von Bakterien wurde mithilfe einer PCR getestet, bei der ein spezielles Primerpaar, welches homolog zu spezifischen Sequenzen des klonierten DNA-Fragments war, verwendet wurde. Hierzu wurden Bakterien-Einzelkolonien steril von Kulturplatten in jeweils 100 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert und je Klon wurde 1 µl in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Anfangsdenaturierung bei 94°C wurde hierbei auf 10 min verlängert, um die Bakterienzellen aufzuschließen.

2.2.4.7 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR dient zur Quantifizierung von Transkripten auf cDNA-Ebene. Bei dieser PCR-Methode wird, wie bei der Visualisierung von DNA im Agarosegel durch Ethidiumbromid, die Fluoreszenz von DNA-bindenden Farbstoffen gemessen. Da die DNA während einer PCR amplifiziert wird, nimmt die Fluoreszenz, die nach jedem Zyklus bestimmt wird, in Form einer sigmoidalen Wachstumskurve zu. Durch die hier verwendete Methode konnte die Menge der Transkripte relativ, und nicht absolut, bestimmt werden. Als Standard diente das ribosomale Protein L19. Das Absorptionsmaximum des verwendeten Farbstoffes SYBR®Green I liegt bei 498 nm, das Emissionsmaximum bei 522 nm. Die PCR wurde im iCycler der Firma Biorad durchgeführt und wurde jeweils in Triplets angelegt.

Reaktionsansatz:

- 12 µl PCR-Reagenz-Mischung (SYBR®Green Supermix, Biorad)*
- 100 pmol sense Primer*
- 100 pmol antisense Primer*
- 2 µl cDNA*
- ad 2 µl mit bidest. H₂O*

Das Programm ist nahezu identisch zu dem der konventionellen PCR (siehe 3.2.4.5), jedoch folgt der Extension die Fluoreszenz-Detektion. Zusätzlich wurde am Ende des Programms die Schmelzkurve der gebildeten PCR-Produkte über die Fluoreszenz ermittelt. Somit konnte die Homogenität der Produkte kontrolliert werden. Die Quantifizierung basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwerts, dem so genannten „Threshold-Cycle“ oder C_t-Wert, bei dem die Fluoreszenz einen fixen Wert innerhalb der exponentiellen Phase der Reaktion erreicht [Gibson *et al.* 1996]. Die C_t-Werte wurden durch die iCycler-Software berechnet. Zur relativen Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta C_P$ -Methode verwendet, bei welcher die relativen Expressionsunterschiede zweier Proben auf L19 normalisiert wurden [Livak & Schmittgen 2001].

2.2.4.8 Agarose-Gelelektrophorese zur DNA-Auftrennung

Als Standard-Methode für die Analyse von DNA-Fragmenten wird die Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Durch Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle in Abhängigkeit ihrer Größe verschieden schnell in der Agarose-Matrix. Es wurden routinemäßig 1 bis 2%ige (w/v) Agarosegele in 1x TAE-Puffer mit einer Ethidiumbromid-Konzentration von 1 µl / 100 ml verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde die flüssige Agaroselösung in eine horizontale Form mit einem Kamm zur Bildung der Auftragstaschen gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde dieses mit 1x TAE-Puffer überschichtet, die Proben mit 6x Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen gegeben. Die Spannung betrug bei einem Lauf je nach Gelgröße 100 - 120 V. Der Gellauf wurde beendet, sobald die Bromphenolblaufront etwa 2/3 der Gesamtlaufstrecke erreicht hatte. Unter UV-Licht wurde die DNA durch interkaliertes Ethidiumbromid sichtbar und die Ergebnisse mittels Digitalfotografie dokumentiert.

<i>1× TAE-Puffer</i>	<i>44,5 mM Tris, pH 7,5</i> <i>44,5 mM Borsäure</i> <i>1 mM EDTA</i>
<i>6x Auftragspuffer</i>	<i>10 mM Tris-HCl, pH 8,0</i> <i>50% (v/v) Ficoll</i> <i>0,006% Bromphenolblau</i>

2.2.4.9 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die präparative Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung und Reinigung von DNA-Fragmenten im präparativen Ansatz benutzt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsfragmente wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell unter UV-Licht (312 nm) aus dem Gel herausgeschnitten. Die Isolierung der DNA erfolgte mithilfe des QIAquick-Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.4.10 Subklonierung von DNA-Fragmenten

Bei der Transkription von eukaryontischer mRNA wird am 3'-Ende durch die RNA-Polymerase II ein sogenannter Poly-A-Schwanz angefügt, der auch in der RT-PCR repliziert wird. Daher kann man ein solches PCR Produkt recht einfach in einen Vektor einbringen, der eine komplementäre Poly-T-Klonierungsstelle besitzt, wie der hier benutzte pGEM®Teasy-Vektor (Promega). Gereinigtes RT-PCR-Produkt wurde mit dem Vektor pGEM®Teasy inkubiert, wobei das Reaktionsgemisch laut Herstellerprotokoll 7 µl DNA, 1 µl Vektor, 1 µl 1x Ligase-Puffer und 1 µl T4-Ligase enthielt. Die Ligation erfolgte im Wasserbad bei 14°C für 16 Stunden.

2.2.4.11 Plasmidisolierung

Die präparative Isolierung von Plasmid DNA erfolgte unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Mini Kits gemäß den Angaben des Herstellers. Diesem Kit liegt das Prinzip der alkalischen Lyse [Birnboim & Doly 1979] zugrunde. Aus 10 ml einer Übernachtskultur konnten je nach Art des Plasmids 1 bis 10 µg DNA gewonnen werden, die direkt zur Spaltung durch Restriktionsendonukleasen (siehe 2.2.4.12) und zur Sequenzierung eingesetzt werden konnte oder bei -20°C gelagert wurde.

2.2.4.12 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme katalysieren die endonukleolytische Spaltung an palindromischen DNA-Erkennungssequenzen und ermöglichen somit die Charakterisierung bestimmter DNA-Abschnitte. Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer. Pro µg DNA wurde 1 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei der für das Enzym spezifischen Temperatur für mindestens 1 h. Nach Überprüfung auf vollständige Spaltung mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die Enzyme durch Hitzebehandlung (10 min bei 75°C) inaktiviert.

2.2.4.13 Genomische DNA Methylierung

Die meisten sequenzspezifischen Methoden zur Methylierungsanalyse basieren auf der von Frommer entwickelten Bisulfit-Reaktion [Frommer *et al.* 1992]. Diese chemische Behandlung genomischer DNA wandelt nicht methyliertes Cytosin in Uracil um, wogegen methyliertes Cytosin unverändert bleibt. Im ersten Schritt wird Cytosin mittels Natriumbisulfit an der C4-Position oxidativ deaminiert. Dabei wird eine Sulfon-Gruppe an die C6-Position angelagert. Im nächsten Schritt erfolgt eine alkalische Desulfonierung zu Uracil (Abb. 2.3). Die Methylgruppe an der C5-Position schützt das 5-Methylcytosin vor der Deaminierung und unterliegt daher keiner chemischen Umwandlung. Eine Umwandlung des Cytosin erfolgt nur in Einzelstrang-DNA, d.h. der DNA-Doppelstrang muss vor der Bisulfit-Behandlung vollständig denaturiert werden.

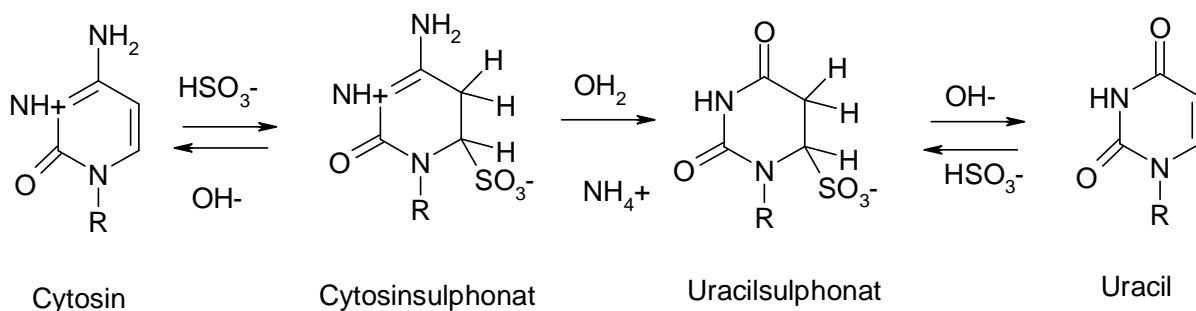


Abbildung 2.3: Bisulfitmodifikation von Cytosinresten

Für die Bisulfit-Reaktion wurde der CpG Genome DNA Modification Kit (Intergen) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Initial wurde 1 µg genomische DNA eingesetzt und bei basischem pH für 10 min bei 37°C denaturiert. Anschließend wurde unter saurem pH die

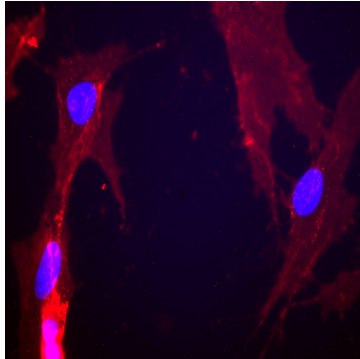
Bisulfit-Reaktion durchgeführt (16 h bei 50°C). Nach Beendigung der Reaktion wurde die DNA in 30 µl TE aufgenommen. Mittels PCR wurde der untersuchte DNA-Abschnitt amplifiziert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der Gelextraktion des gewünschten PCR-Fragments wurde dieses in den pGEM®-Teasy-Vektor subkloniert und ausgewählte Klone sequenziert (Genterprise, Mainz).

3 Ergebnisse

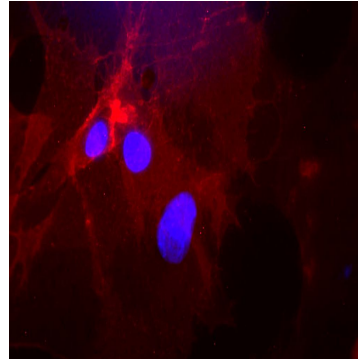
3.1 Charakterisierung der Alterung der Zellkulturen

Seit Hayflick und Moorhead im Jahre 1961 entdeckten, dass humane Fibroblasten nur eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen durchlaufen, stellen Fibroblasten ein etabliertes Modellsystem für zelluläre Altersforschung dar [Hayflick & Moorhead 1961]. Seneszente Zellen zeigen morphologische und molekulare Veränderungen wie z. B. eine Vergrößerung der Zelle, veränderte Zell-Zell Interaktionen und eine Dysregulation der Proteinfunktion [Cristofalo 1988; Trougakos *et al.* 2006].

Abbildung 3.1 zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung von jungen (Populationsverdopplung [PDL] 23) und alten (PDL 45) gesunden humanen Fibroblasten (IMR 90). Darauf ist zu erkennen, dass seneszente Zellen im Vergleich zu jungen Zellen einen erhöhten Zellumfang und eine irreguläre Gestalt aufweisen.



IMR 90 PDL 23



IMR 90 PDL 45

Abbildung 3.1: Immunfluoreszenzfärbung zur Untersuchung morphologischer Veränderungen in IMR 90-Fibroblasten. Junge und seneszente IMR 90-Fibroblasten wurden fixiert und mit dem Fibroblasten-Marker Thy-1 inkubiert. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper wurden mittels Fluoreszenz-Mikroskop visualisiert. Die Immunfärbung zeigt jeweils eine 40-fache Vergrößerung der Zellen.

3.1.1 Lebensspanne

Durch kontinuierliche Kultur der Fibroblasten bei gleich bleibenden Bedingungen wurde die Lebensspanne der einzelnen Zelllinien von der frühesten Passage bis zum Erreichen des zellulären Proliferationsstopps, der so genannten zellulären Seneszenz, bestimmt. Dazu wurde nach jeder Zellkultur-Passage die Populationsverdopplung (PDL) ermittelt (vgl. 2.2.1.4), bis sich die Zellen nicht mehr teilten und somit die PDL nicht weiter anstieg. Wie erwartet erreichten die verschiedenen Zelllinien die zelluläre Seneszenz nach unterschiedlichen Passagezahlen bzw. PDLs. Abbildung 3.2 zeigt die Anzahl der durchgeführten Passagen bis zum Erreichen der Seneszenz.

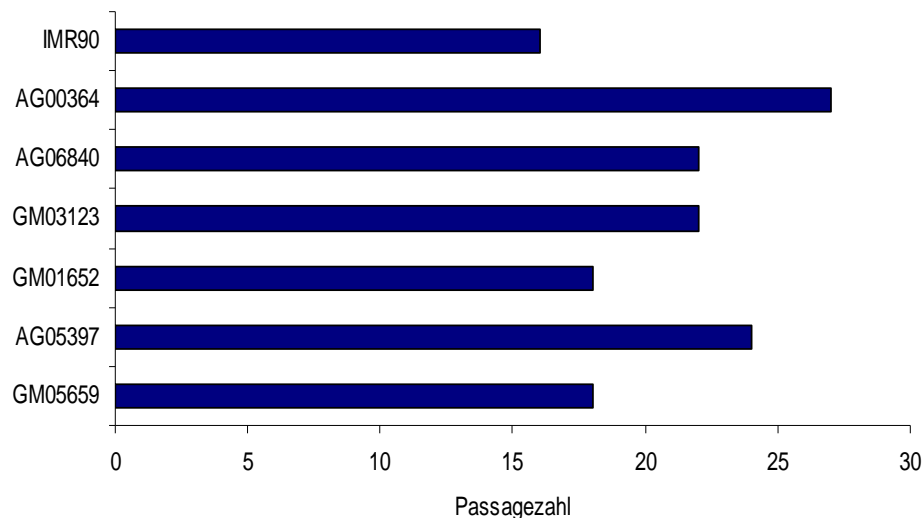


Abbildung 3.2: Maximale *in vitro* erreichte Lebensspanne der untersuchten Zelllinien. Um besser unterscheiden zu können, wie lange die verschiedenen Zelllinien passagiert werden mussten, um schliesslich Seneszenz zu erreichen, wurden alle Zelllinien bei Erhalt auf Passage 0 gesetzt.

In den folgenden Versuchen werden junge bzw. seneszente Zellen anhand der Populationsverdopplungen charakterisiert. Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht der PDLs der verschiedenen Zellen, wobei die PDLs von jungen Zellen bei Erhalt angegeben waren, während die PDLs seneszenten Zellen nach jeder Passage bis zum Erreichen des Proliferationsstopps berechnet wurden. Wird also bei einem Versuch von jungen bzw. seneszenten Zellen gesprochen, wurden Zellen der angegebenen Populationsverdopplung eingesetzt.

Zelllinie	PDL junge Zellen	PDL seneszente Zellen
IMR90	23	45
AG00364	15	47
AG06840	15	39
GM03123	21	51
GM01652	14	34
AG05397	19	50
GM05659	14	34

Tabelle 3.1: Populationsverdopplungszahlen der verwendeten Zelllinien

3.1.2 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität (SA- β -Gal-Aktivität)

Die β -Galaktosidase-Aktivität ist ein charakteristisches Merkmal des Seneszenz-assoziierten Wachstumstopps und stellt daher einen gut etablierten Biomarker für zelluläre Seneszenz dar. Die Seneszenz der vorliegenden Zellen sollte für die folgenden Versuche durch den β -Galaktosidase-Aktivitätsassay sichergestellt werden. Anhand der Blaufärbung der Zellen kann dabei ein Rückschluss auf die β -Galaktosidase-Aktivität und somit auf ein Vorhandensein seneszenten Zellen gezogen werden (vgl. 2.2.1.6).

In jungen Zellen konnte eine β -Gal-Aktivität zwischen 3% und 8% ermittelt werden, während die Aktivität in seneszenten Zellen in allen untersuchten Zelllinien bei nahezu 100% lag. Abbildung 3.3 A zeigt stellvertretend für alle anderen 6 Zelllinien das Ergebnis der β -Gal-Färbung in Trisomie 21-Fibroblasten (AG05397), in Abb. 3.3 B ist die prozentuale Anzahl der SA- β -Gal positiven Zellen aller verwendeten Zelllinien dargestellt.

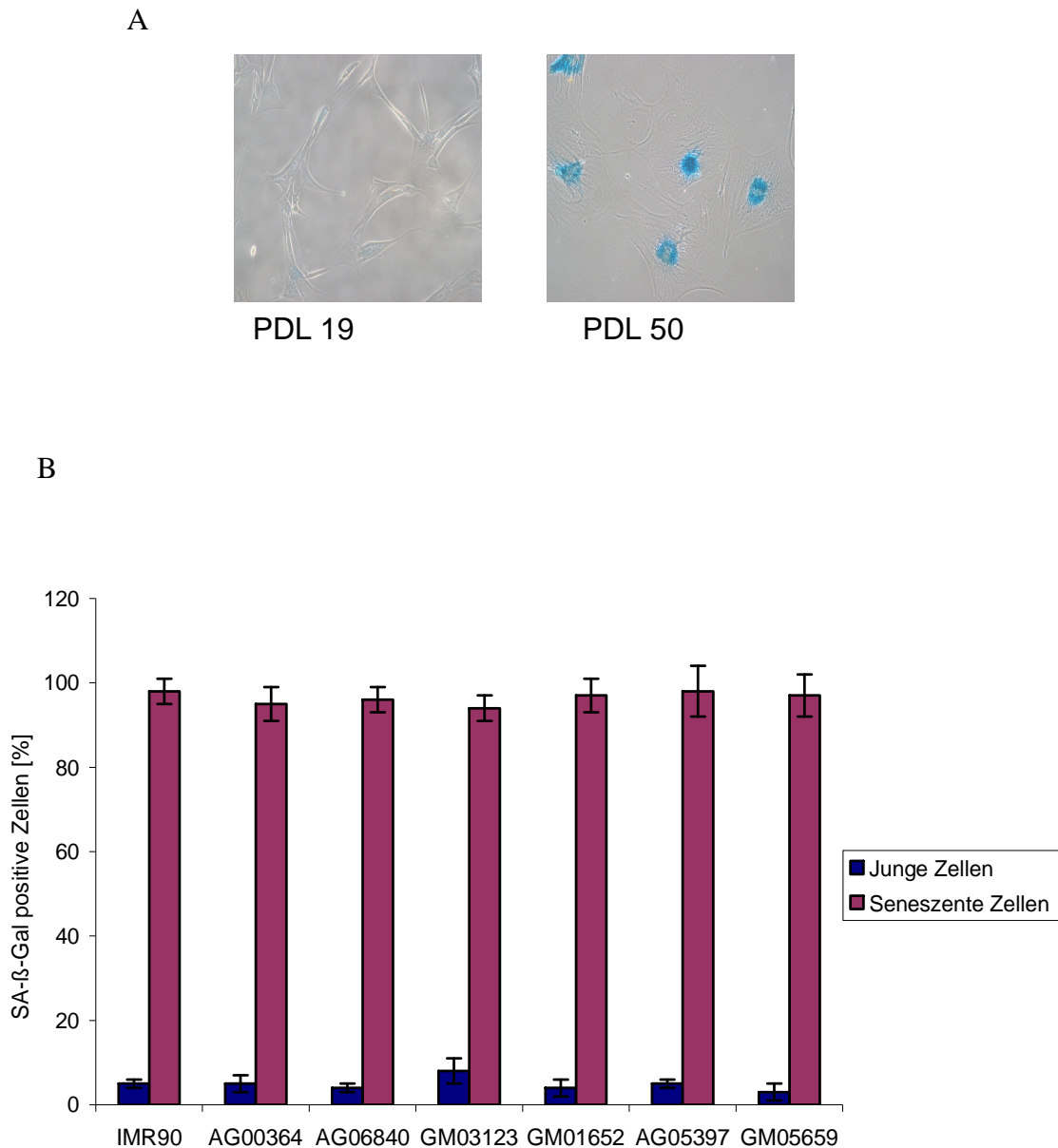


Abbildung 3.3: SA- β -Galaktosidase-Aktivität. Durch Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität konnte die zelluläre Seneszenz ermittelt werden. Pro Kulturschale wurden mindestens 500 Zellen bezüglich ihrer Blaufärbung analysiert und prozentual gegen die Gesamtzahl der untersuchten Zellen aufgetragen. (A), die Bilder zeigen Fibroblasten der Trisomie 21-Zelllinie AG05397 in 40-facher Vergrößerung. (B), prozentuale Darstellung der β -Gal positiven Zellen aller Zelllinien.

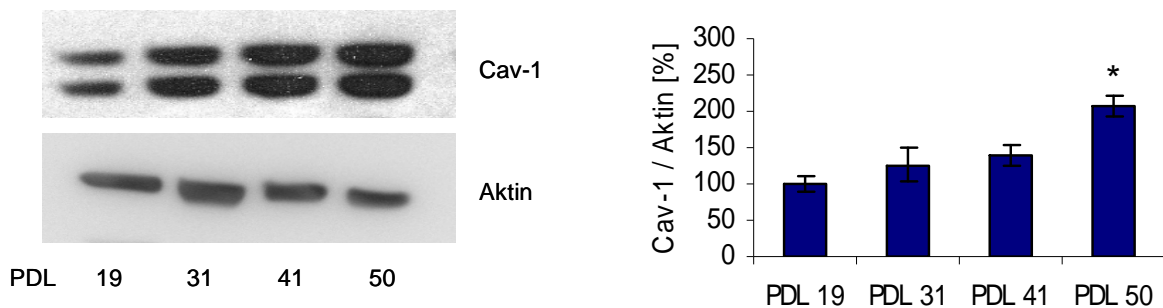
3.1.3 Biochemische Analyse des seneszenten Phänotyps

Caveolin1 und p21^{Waf1/Cip1} werden im Zuge der Alterung differentiell reguliert und können daher als biochemische Altersmarker dienen [Gartel & Radhakrishnan 2005]. Dazu wurden

von jeder Zelllinie zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proteinlysate gewonnen und mittels Western Blot Analyse auf Caveolin1 und p21^{Waf1/Cip1} Expression untersucht.

In fünf der sieben untersuchten Zelllinien (IMR90, AG00364, AG05397, GM05659 und GM01652) konnte die in der Literatur beschriebene altersabhängige Erhöhung der Caveolin1 Expression detektiert werden [Park *et al.* 2000]. In Abbildung 3.4 A ist die Western Blot Analyse der Trisomie 21-Zellen dargestellt, Abbildung 3.4 B zeigt die prozentuale Veränderung der Caveolin1 Expression in den anderen 4 Zelllinien.

A



B

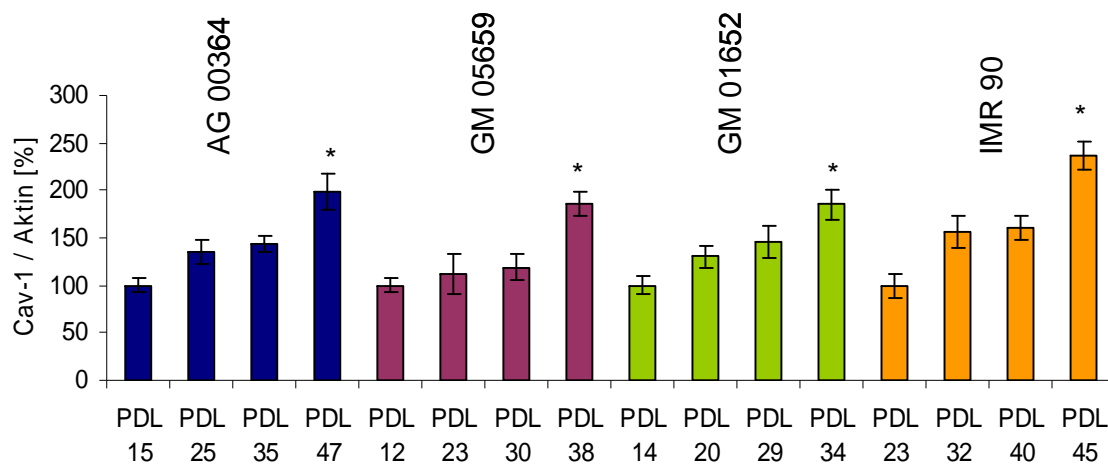


Abbildung 3.4: Altersabhängige Erhöhung der Caveolin1 Expression. Pro Zelllinie wurden 15 µg Gesamtprotein auf ein 12%iges PAA-Gel aufgetragen. Der Nachweis erfolgte durch einen spezifischen Erstantikörper gegen Caveolin1. Als Ladekontrolle diente Aktin. Die Quantifizierung erfolgte mittels der optischen Bandenintensitäten und stellt die prozentuale Veränderung zur jeweils kleinsten PDL dar. (A), gezeigt

ist die Änderung der Caveolin-Expression in Trisomie-21 Fibroblasten (AG05397). (B), prozentuale Veränderung der Caveolin 1-Expression aller untersuchten Zelllinien (Tuckey Test, * Junge Zellen zu seneszenten Zellen, $p < 0.05$, $n = 5$).

Bei der Niemann-Pick-Zelllinie GM03123 und der FAD (familiäre Alzheimer Erkrankung) Zelllinie AG06840 konnte keine Veränderung der Caveolin1 Expression beobachtet werden (Abb. 3.5).

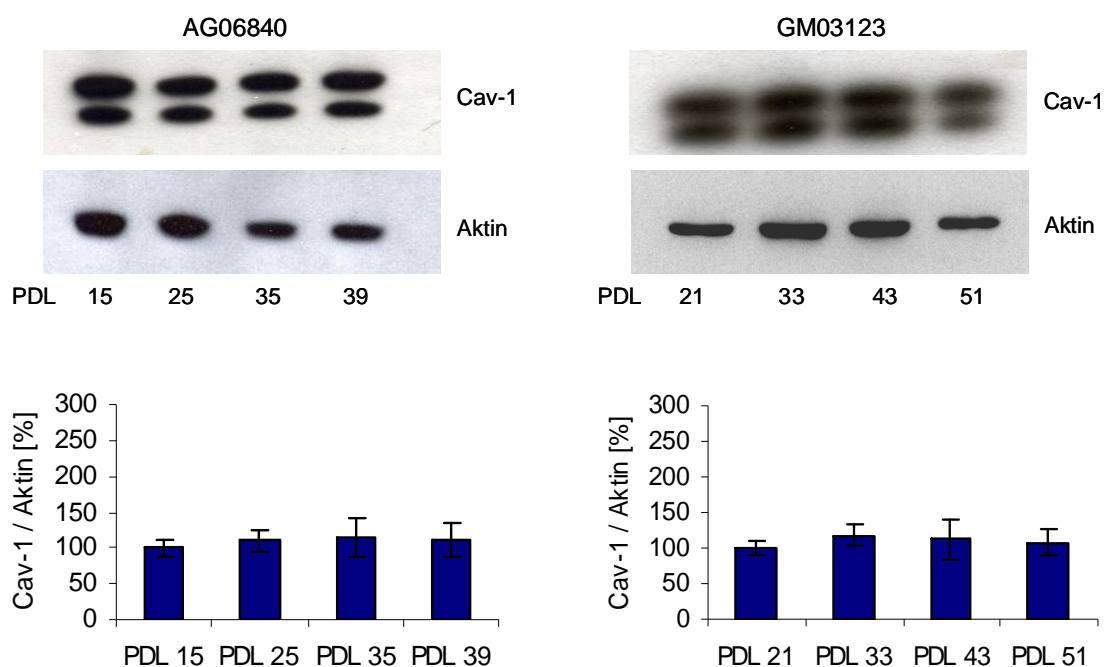


Abbildung 3.5: Expression von Caveolin1. Jeweils 15 μ g Gesamtprotein in aufsteigender PDL wurden auf einem 12%igen PAA-Gel aufgetrennt und mit einem spezifischen Caveolin1 Antikörper detektiert. Aktin diente als Ladekontrolle. In der graphischen Darstellung wurden die prozentualen Veränderungen zur jeweils kleinsten PDL ermittelt.

Die Expression von p21^{Waf1/Cip1} in FAD-Fibroblasten AG00364 zeigte einen altersassoziierten Anstieg (Abb. 3.6). Diese Beobachtung wurde ebenfalls in allen anderen Zelllinien gemacht (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigte auch aus biochemischer Sicht die Alterung der einzelnen Zelllinien.

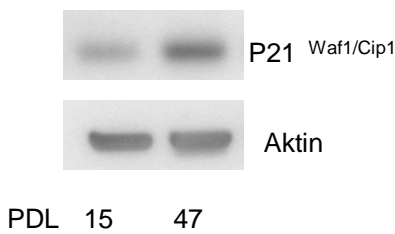


Abbildung 3.6: Untersuchung des p21^{Waf1/Cip1}-Proteinspiegels. Die Abbildung zeigt die Expression in Fibroblasten mit familiärer Alzheimer-Erkrankung (AG00364). 15µg Gesamtprotein wurden auf einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen p21-Antikörper. Als Ladekontrolle diente Aktin.

3.1.4 Methylierungsstatus des Caveolin1-Promotors in NHF-Zellen

Säugetiere besitzen die Möglichkeit, durch kovalente Bindung einer Methylgruppe an den C5-Kohlenstoff eines Cytosinrings ihr Genom epigenetisch zu verändern. Diese Methylierung findet fast ausschließlich symmetrisch an beiden DNA-Strängen des 5'-CpG-3'-Palindroms statt [Alberts *et al.* 1994; Gruenbaum *et al.* 1982] und wird von so genannten DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert [Reik & Dean 2001]. Vor fast 30 Jahren zeigten Taylor und Jones einen Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Genexpression [Taylor & Jones 1979]. Sie stellten fest, dass methylierte Gene stillgelegt werden und dass dieser Zustand durch Demethylierung reversibel ist. Ein weit verbreiteter Mechanismus zur Stilllegung von Genen ist die Promotormethylierung, wobei einzelne CpG-Dinukleotide oder ganze CpG-Inseln methyliert werden [Constancia *et al.* 1998]. CpG-Inseln werden definiert als DNA-Abschnitte von 0,2-5 kb mit einem GC-Gehalt von mindestens 50%. Diese Bereiche sind häufig am 5'-Ende von Säuger-Genen in deren Promotorregion lokalisiert [Antequera & Bird 1993; Gardiner-Garden & Frommer 1987; Larsen *et al.* 1992]. CpG-Inseln sind im Gegensatz zu anderweitig im Genom vorkommenden CpG-Dinukleotiden meist unmethyliert [Gardiner-Garden & Frommer 1987].

Zschocke und Kollegen konnten zeigen, dass Caveolin-Promotoren häufig methyliert und somit stillgelegt sind [Zschocke *et al.* 2002]. Um einen Zusammenhang zwischen dem altersabhängigen Anstieg der Caveolin1 Expression und der Promotormethylierung von Caveolin1 zu untersuchen, wurde der Methylierungsstatus junger und seneszenter IMR90 Fibroblasten analysiert.

3.1.4.1 Bisulfitsequenzierung des Promotorbereichs

Engelman *et al.* konnten 1999 zeigen [Engelman *et al.* 1999], dass der Caveolin1-Promotor die typischen Charakteristika einer nach Frommer definierten CpG-Insel aufweist. Um den Status der Promotormethylierung zu bestimmen, wurde die genomische DNA aus jungen und seneszenten normalen humanen Fibroblasten (IMR90) isoliert. Mit der gewonnenen DNA wurde eine Bisulfitbehandlung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.4.13). Die Bisulfitbehandlung von genomischer DNA ist eine selektive, chemische Umwandlung von Cytosinbasen abhängig von ihrem Methylierungsstatus [Grunau *et al.* 2001]. Dabei werden unmethylierte Cytosinreste hydrolytisch zu Uracilen desaminiert, während methylierte Cytosine nicht verändert werden [Clark *et al.* 1994; Frommer *et al.* 1992] (siehe Abb. 2.3).

Die Unterscheidung methylierter und unmethylierter Cytosinreste erfolgte über eine PCR-Amplifikation der zu analysierenden Promotorregion mit spezifischen Primern. Die dabei verwendeten Primer „Cav1prom1s“ und „Cav1prom1as“ (siehe Tabelle 2.5) wurden an die veränderte Sequenz nach erfolgreicher Bisulfitreaktion angepasst und enthielten keine CpG-Dinukleotide. Dadurch war eine Amplifikation aller bisulfitbehandelten DNA-Stränge unabhängig vom Methylierungsstatus möglich.

Da bei der Bisulfitbehandlung die Desaminierungsreaktion meist nicht vollständig abläuft, kommt es vor, dass in bestimmten Subpopulationen von DNA-Einzelsträngen keine Umwandlung von Cytosin zu Uracil stattfindet. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die erhaltenen PCR-Produkte aus dem Agarosegel isoliert und anschließend in den Sequenzierungsvektor pGEM®-T Easy subkloniert (Vektordiagramm siehe Anhang). Eine erfolgreiche Klonierung konnte durch Amplifikation mit den spezifischen Bisulfit-Primern nachgewiesen werden. Diese PCR lieferte ein 353 bp-großes Amplifikat.

Die Bisulfitreaktion konnte durch einen *Bam* HI-Restriktionsverdau des Amplifikats überprüft werden. In der ursprünglichen DNA findet sich im untersuchten Promotorbereich eine *Bam* HI-Schnittstelle, die jedoch bei der erfolgreichen Bisulfitkonvertierung eliminiert wird und somit nach *Bam* HI – Verdau ein Produkt von 353 bp Länge entsteht (siehe Abb. 3.7). Nicht-konvertierte DNA wird hingegen geschnitten, woraus 2 Fragmente der Längen 253 bp und 100 bp entstehen. Durch diese Überprüfung wurden nur Plasmid-Klone ursprünglich Bisulfit-konvertierter DNA einer Sequenzanalyse unterzogen und deren Methylierungsstatus bestimmt (Daten nicht gezeigt).

Die untersuchte Region des Caveolin1-Promotors umfasste die Region -877 bis -525 ausgehend vom Translationsstartkodon ATG mit insgesamt 7 CpG-Dinukleotiden. Die CpG-Stellen wurden stromabwärts von 1-7 durchnummeriert (Abb. 3.7).

A

```

-884 AACATTTTGT GTATTTTGCA AATATGGCAT AACCTGTTGG CATAAAATTC CATTGTTCCA
      1                                     2 3
-824 GAAAATATCG GTAATAAAAT TATAGAAAAG TTAAAGATCT TCATTTCTTA TTTCGAAGCG
      4
-764 TTTGGGAGAC ATTTTCAGAAA CGGATGGGAA ATGTTAAATT CTGCATGCCT GCTTAAGTTT
      5 6
-704 CCATCCACAC CGACTAGATG TAAACGAGTG TCACCAAAG TACACCACAG GCACCCACAC
      Bam HI
-644 AGATTCCTTC CATAAGGGAT CCACAAAGTT TAGATGTGAA ATGTACCTAA AGGTTCTTAG
      7
-584 CCGTCTTTCA TCCCTCCCTC TGTGAAACAG GGAGACACAT GTGTTTTAAG GCAGAGATGG

```



Bisulfit-Behandlung

B

```

      Sense Primer Cav1prom-1s
-884 AATATTTTGT GTATTTTGTA AATATGGTAT AATTGTTGG TATAAAATTT TATTGTTTTA
      1                                     2 3
-824 GAAAATATNG GTAATAAAAT TATAGAAAAG TTAAAGATTT TTATTTTTTTA TTTNGAAGNG
      4
-764 TTTGGGAGAT ATTTTAGAAA NGGATGGGAA ATGTTAAATT TTGTATGTTT GTTTAAGTTT
      5 6
-704 TTATTTATAT NGATTAGATG TAAANGAGTG TTATTTAAAAG TATATTATAG GTATTTATAT
-644 AGATTTTTTTT TATAAGGGAT TTATAAAGTT TAGATGTGAA ATGTATTTTAA AGGTTTTTTAG
      7
      Antisense Primer Cav1prom-1as
-584 TNGTTTTTTTA TTTTTTTTTTT TGTGAAATAG GGAGATATAT GTGTTTTTAAG GTAGAGATGG

```

Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der untersuchten Promotorregion. (A) zeigt den Sequenzausschnitt vor Bisulfitbehandlung und (B) nach Bisulfitbehandlung. CpG-Dinukleotide sind rot markiert, die Bindungsstellen für die spezifischen Primer sind gelb unterlegt. N entspricht entweder Cytosin (vor Bisulfitbehandlung methyliert) oder Thymin (vor Bisulfitbehandlung nicht methyliert). Die *Bam* HI-Schnittstelle in der unbehandelten DNA verschwindet nach Bisulfitbehandlung (GATCC → GATTT).

Die Analyse ergab, dass alle sieben CpG-Dinukleotide sowohl in jungen als auch in seneszenten Zellen unmethyliert vorlagen und daher im Sequenzdiagramm als Thymin erschienen (Abb. 3.8). Dies zeigte, dass die verstärkte Expression von Caveolin1 nicht auf eine Änderung des Methylierungsstatus zurückzuführen ist.

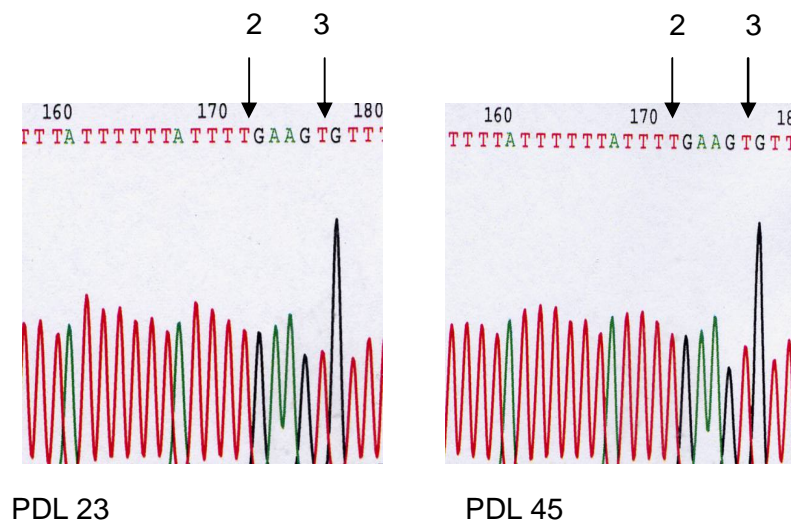


Abbildung 3.8: Ausschnitt aus dem Sequenzdiagramm von IMR 90 PDL 23 und PDL 45. Die Pfeile zeigen die CpG- Stellen Nummer 2 und 3 nach Bisulfitbehandlung und Sequenzierung. Da Cystin unmethyliert vorlag, wird es bei der Bisulfitbehandlung in Uracil umgewandelt und erscheint daher als Thymin im Sequenzdiagramm.

3.1.5 Untersuchung des zellulären Cholesterinspiegels

Da sowohl Lokalisation als auch die mRNA Menge von Caveolin vom Cholesterinspiegel abhängen [Smart *et al.* 1996], wurde der zelluläre Cholesteringehalt im Laufe der Alterung bestimmt. Die Untersuchung zeigte, dass der zelluläre Cholesterinspiegel im Alter ansteigt. Die höchsten Werte wurden in der Niemann-Pick Typ C Zelllinie (GM03123) gemessen. Obwohl in allen Zellen ein Cholesterinanstieg zu verzeichnen war, wurde nur in normalen humanen Fibroblasten IMR90 und GM01652 und in FAD-Fibroblasten (AG00364) ein signifikanter Anstieg verzeichnet (Abb. 3.9).

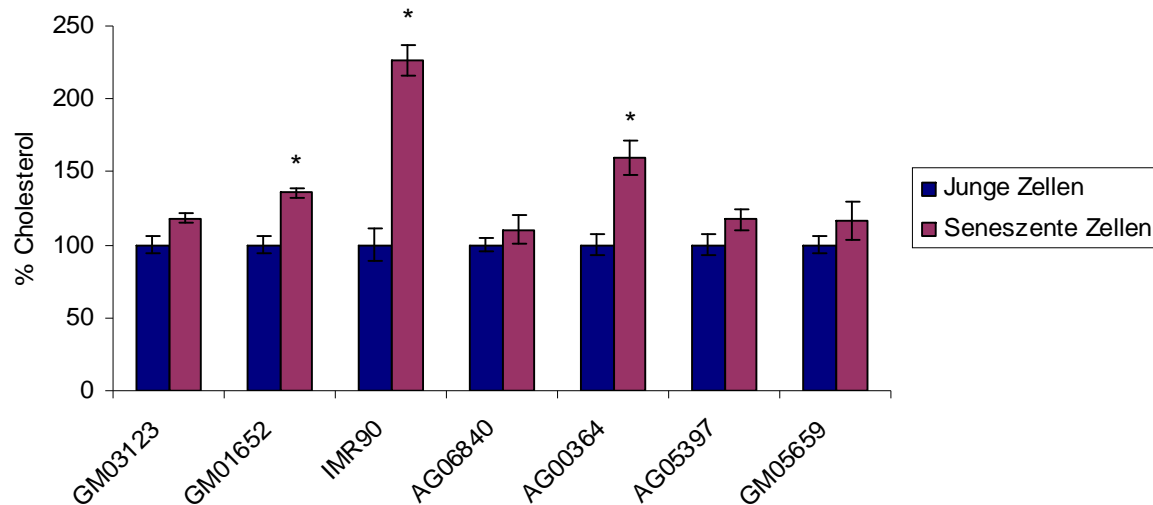


Abbildung 3.9: Untersuchung der Cholesterinspiegel. Zur Ermittlung des Cholesteringehalts diente der Amplex Red Cholesterol Assay Kit (siehe 2.2.2.12). Es wurden jeweils 15 µg zelluläres Gesamtlysatz eingesetzt (Tuckey Test, * junge Zellen zu seneszenten Zellen, $p < 0.05$, $n = 4$).

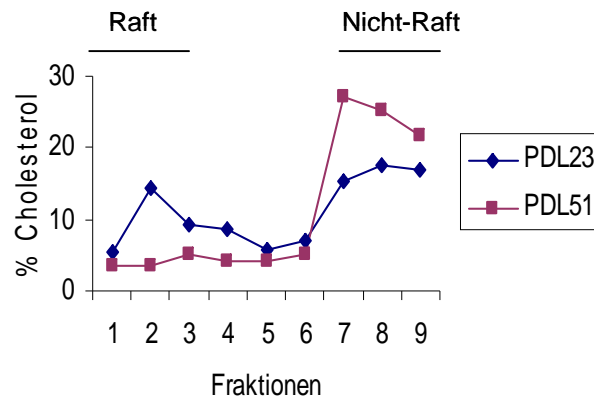
3.1.6 Untersuchung von Lipid Rafts

Caveolin1 und Cholesterin sind strukturelle Komponenten von so genannten Lipid Rafts [Stan 2005]. Da beide Komponenten im Zuge der Zellalterung ansteigen, wurde deren Einfluss auf die strukturelle Integration von Lipid Rafts untersucht. Rafts sind in Gegenwart des Detergens Triton X-100 unlöslich und können über einen Dichtegradienten von in Detergens löslichen Membranen getrennt werden. Dabei flotieren Lipid Rafts aufgrund ihrer geringen Dichte innerhalb des Saccharosegradienten in die Grenzregion zwischen 5% und 30%.

Die Untersuchung zeigte in allen Zelllinien, dass Cholesterin in jungen Zellen in erhöhtem Maß in den Raft-Fractionen (Fractionen 1-3) zu finden ist. In seneszenten Zellen migrierte Cholesterin von der Raft-Fraktion in die Nicht-Raft-Fraktion (Fractionen 7-9; Abb. 3.10 A). Auch Caveolin1 zeigte eine altersassoziierte Verschiebung von der Raft-Fraktion hin zur Nicht-Raft-Fraktion (Abb. 3.10 B).

Dieses Ergebnis legt nahe, dass Lipid Rafts im Alter vermutlich in geringeren Gesamtmengen auftreten.

A



B

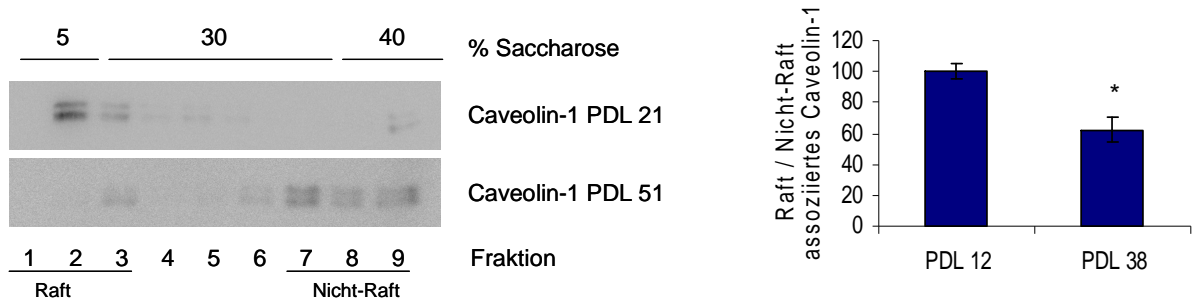


Abbildung 3.10: Altersassoziierte Disintegration der Lipid Rafts am Beispiel der NHF AG05659. (A), unter Verwendung des Amplex Red Cholesterol Assay Kits wurden pro Fraktion 50 μ l zur Bestimmung des Cholesterinspiegels eingesetzt. (B), von jeder Fraktion wurden 30 μ l auf einem 12%igen PAA-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen Caveolin1. Die graphische Auswertung wurde mittels der optischen Bandenintensitäten durchgeführt und ist als prozentuale Veränderung der Raft-Fraktion (Fraktionen 1-3) zur Nicht-Raft-Fraktion (Fraktion 7-9) dargestellt (Tuckey Test,* PDL 12 zu PDL 38, $p < 0.05$, $n = 5$).

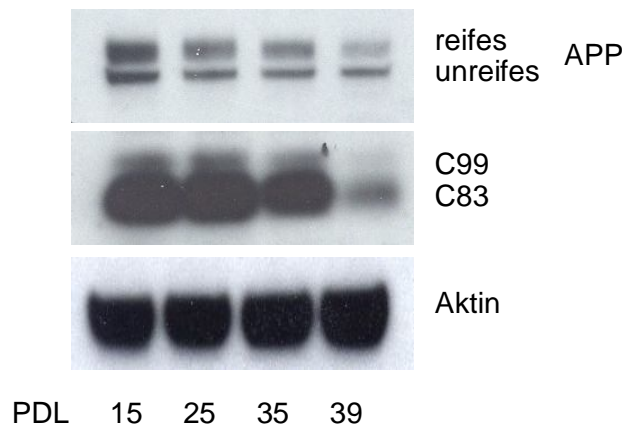
3.2 Altersassoziierte Veränderung der APP-Prozessierung

Ein mit entscheidender Schritt bei der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung ist wahrscheinlich die Produktion des A β -Peptids durch proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins APP. Bei den folgenden Experimenten sollte der Einfluss der Zellalterung auf die Prozessierung von APP untersucht werden.

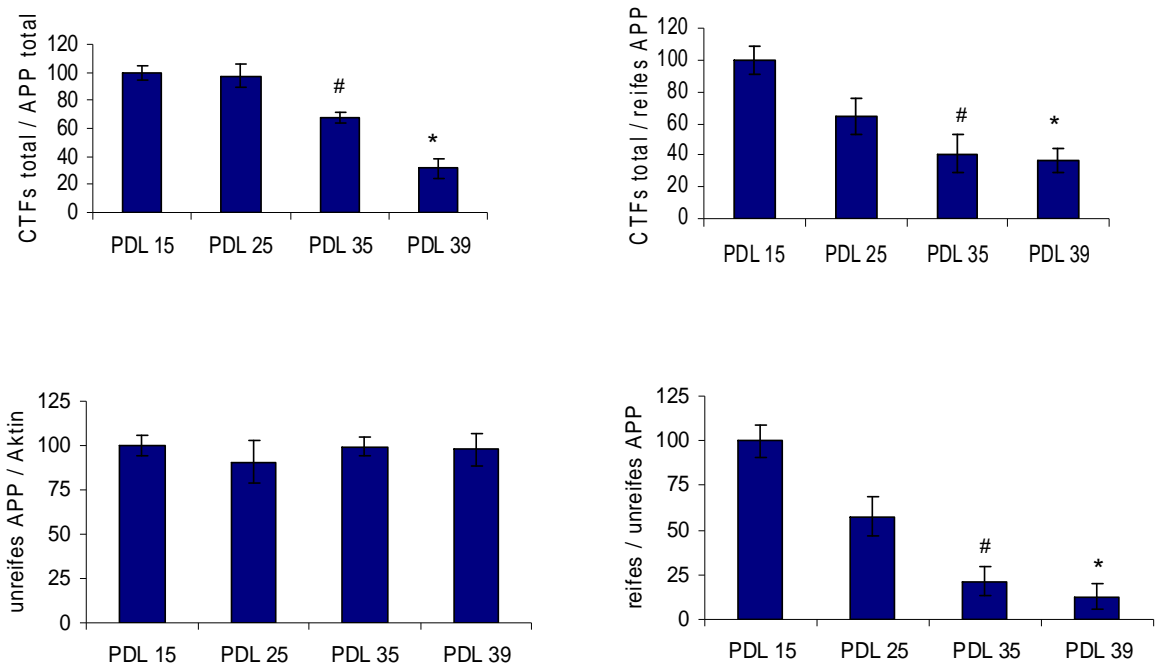
3.2.1 Untersuchung der APP-Spiegel und der intrazellulären APP-Spaltfragmente

Bei der Alterung der Fibroblasten wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proteinlysate gewonnen, die mittels Western Blot Analyse einen Rückschluss auf die APP-Prozessierung während der Zellalterung erlaubten. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme von maturem APP in seneszenten Zellen, während die Spiegel von unreifem APP unverändert blieben (Abb.3.11 A und B). Dies führte zu einer kontinuierlichen Abnahme des Verhältnisses von reifem zu unreifem APP im Laufe der Alterung. Die Werte schwankten in den unterschiedlichen Zelllinien zwischen 35% und 70% (Abb.3.11 C). Die reduzierten Spiegel von reifem APP in seneszenten Fibroblasten zeigen eine verminderte Reifungseffizienz des Proteins auf.

A



B



C

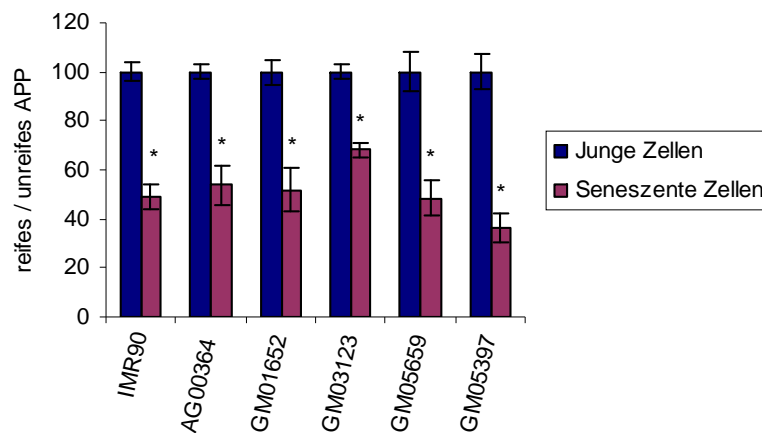


Abbildung 3.11: Analyse der APP-Spiegel und der APP-Spaltfragmente (A), Western Blot Analyse von FAD Fibroblasten AG06840. Je PDL wurden 15 μ g Gesamtprotein auf einem 4-12%igen NuPage Gradientengel aufgetragen. Die Detektion von APP erfolgte mit dem Antikörper A8717. Als Ladekontrolle diente Aktin. (B), die graphische Auswertung erfolgte mittels optischer Bandenintensitäten und ist dargestellt als prozentuale Veränderung zu PDL 15 (Tuckey Test, # PDL 15 zu PDL 25, * PDL 15 zu PDL 35, $p < 0.05$, $n = 5$). (C), graphische Darstellung des Verhältnisses reifes zu unreifem APP aller verwendeten Zelllinien als prozentuale Veränderung zu jungen Zellen (Tuckey Test, * Junge Zellen zu seneszenten Zellen, $p < 0.05$, $n = 5$).

Die Untersuchung der intrazellulären Spaltprodukte C99 und C83 zeigte ebenfalls eine signifikante Abnahme in seneszenten Zellen (Abb. 3.11 A). Daraus resultierte eine Reduktion

im Verhältnis der Gesamt-CTFs zu reifem APP als auch zum Gesamt-APP (Abb. 3.11 B), was auf eine allgemeine Verringerung der APP-Prozessierung durch die α - und die β -Sekretase hinweist.

3.2.2 Untersuchung der extrazellulären Spaltfragmente

Das Transmembranprotein APP unterliegt der enzymatischen Spaltung durch die α -, β - und γ -Sekretase. Erfolgt die Spaltung mittels β - und γ -Sekretase, wird das amyloide A β -Peptid freigesetzt [Vassar & Citron 2000]. Die α -Sekretase schneidet innerhalb der A β -Sequenz und verhindert dadurch deren Entstehung. Eine Abnahme der APP-Prozessierung zieht konsequenterweise auch eine Abnahme der extrazellulären Spaltprodukte nach sich.

Durch die Untersuchung der extrazellulären Spaltfragmente wurde dies bestätigt. Das Medium von jungen und alten Zellen wurde nach 72 h Inkubation gesammelt, auf einem 8%igen PAA-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot Analyse untersucht. Hier zeigte sich, dass sowohl sAPP α als auch die Gesamtmenge an sAPP, die der Menge von sAPP α und sAPP β entspricht, während der Alterung in allen untersuchten Zelllinien progressiv abnahmen. Das Verhältnis von sAPP α zu sAPP β blieb konstant und zeigt, dass während der Alterung weder der nicht-amyloidogene noch der amyloidogene Weg bevorzugt wurde. Abbildung 3.12 zeigt die Western Blot Analyse der Kontrollzelllinie GM05659, stellvertretend für die anderen untersuchten Zelllinien.

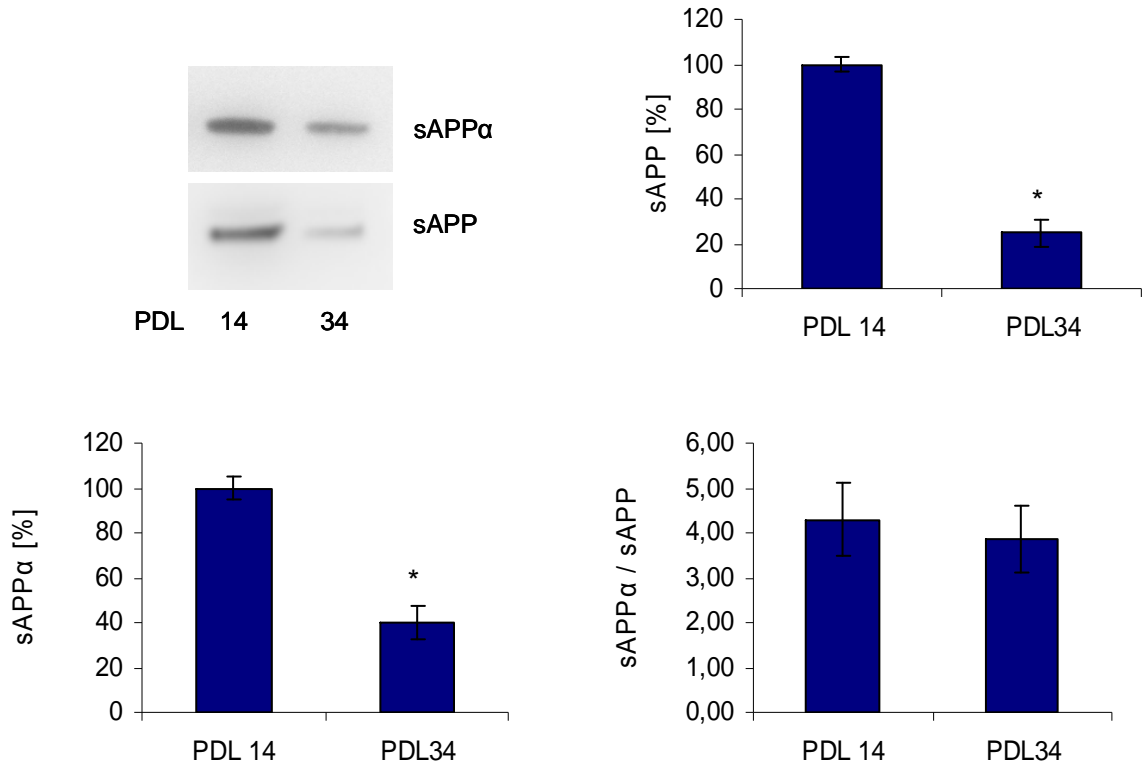


Abbildung 3.12: Abnahme der extrazellulären APP-Spaltfragmente. Nach 72h Inkubation wurde das Kulturmedium junger und seneszenten normaler humaner Fibroblasten (GM05659) auf ein 8%iges PAA-Gel aufgetragen und aufgetrennt. sAPP α wurde mithilfe des monoklonalen Antikörpers 6E10 detektiert, die Gesamtmenge an sAPP mit dem Antikörper 22C11. Die graphischen Darstellungen erfolgten mittels Auswertung der optischen Bandenintensitäten und sind dargestellt als prozentuale Veränderung zu PDL 14 (Tuckey Test, * PDL 14 zu PDL 34, $p < 0.05$, $n = 4$).

3.3 Untersuchung der APP-Sekretasen

APP kann auf seinem sekretorischen Prozessierungsweg von verschiedenen Sekretasen gespalten werden, den α -, β - und γ -Sekretasen [Haass, C. & Steiner 2002]. Da die Prozessierung von APP altersabhängig abnimmt, wurden im Folgenden auch die beteiligten Sekretasen auf eine mögliche Altersregulation hin untersucht.

3.3.1 Einfluss der Zellalterung auf die α -Sekretase

Die α -Sekretase ist eine Zink-abhängige Metalloprotease [Parvathy *et al.* 1998], die das APP-Protein innerhalb der A β -Sequenz schneidet. Bisher wurden 3 Enzyme identifiziert, welche

die typischen Charakteristika einer α -Sekretase aufweisen. Dabei handelt es sich um Vertreter der ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*)-Familie: ADAM9 [Koike *et al.* 1999], ADAM10 [Lammich *et al.* 1999] und ADAM17 [Buxbaum *et al.* 1998]. Es ist jedoch noch unklar, ob nur eine oder alle drei zusammen die physiologisch relevante α -Sekretase bilden [Lichtenthaler & Haass 2004]. Im Folgenden wurde ADAM10 näher analysiert.

Bei der Untersuchung der ADAM10-Proteinspiegel wurden in keiner der verwendeten Zelllinien altersassoziierte Veränderungen gefunden (Daten nicht gezeigt). Abbildung 3.13 zeigt den Western Blot der Kontrollzelllinie GM01652.

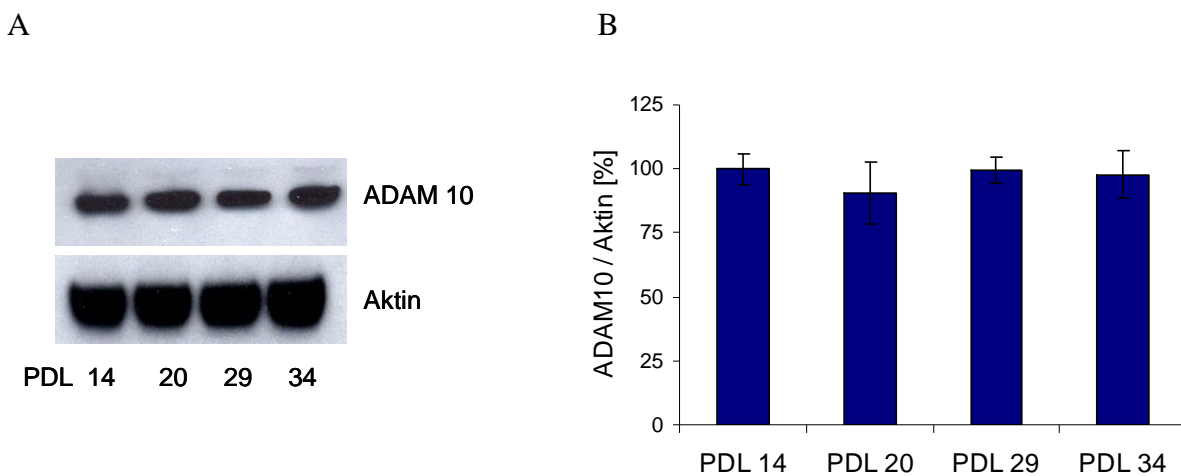


Abbildung 3.13: ADAM10 Expression in der Kontrollzelllinie GM01652. (A), 15 μ g Gesamtzelllysate aufsteigender PDL wurde auf einem 4-12%igen Gradientengel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem ADAM10-spezifischen Antikörper. Als Kontrolle diente Aktin. (B), die graphische Auswertung erfolgte mittels optischer Bandenintensitäten und ist dargestellt als prozentuale Veränderung zu PDL 15.

Die Aktivität der α -Sekretase wurde mithilfe des α -Secretase Activity Kits bestimmt. Dabei wurde das künstliche APP-Peptid „YEVHHQKLV“ verwendet, welches mit den Reporter-molekülen „EDANS“ und „DABCYL“ konjugiert ist. In der ungeschnittenen Form ist die Fluoreszenzemission von EDANS durch physische Nähe von DABCYL gequencht. Die Spaltung des Peptids durch die α -Sekretase führt zur Trennung von EDANS und DABCYL und ermöglicht so die Freisetzung eines Fluoreszenzsignals, das schließlich detektiert werden kann.

Die α -Sekretase-Aktivität nahm in allen untersuchten Zelllinien mit zunehmendem Alter ab (Abb. 3.14). Bis auf die Zelllinie von Niemann-Pick GM03123 und Trisomie 21 AG05397 war diese altersabhängige Abnahme der α -Sekretase-Aktivität signifikant.

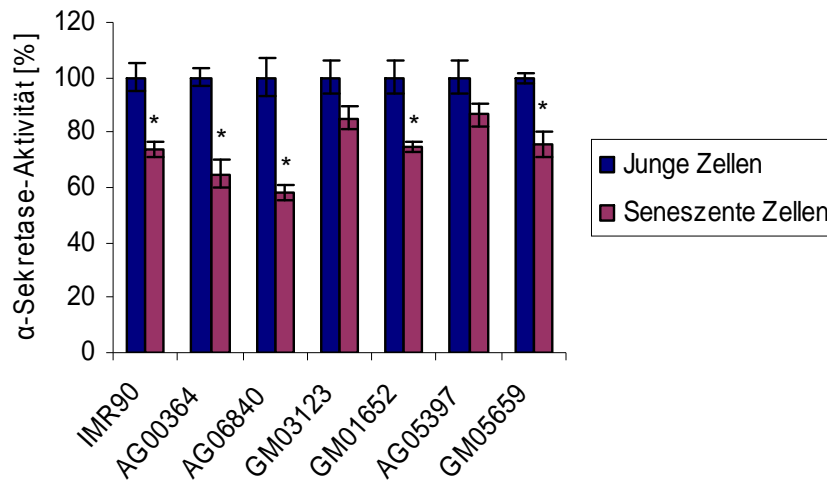


Abbildung 3.14: Untersuchung der α -Sekretase-Aktivität. Es wurden jeweils 25 μ g Gesamt-Proteinlysate eingesetzt. Die graphische Auswertung zeigt die prozentuale Veränderung der α -Sekretase-Aktivität (Tuckey Test, * junge Zellen zu seneszenten Zellen, $p < 0.05$, $n = 4$).

3.3.2 Einfluss der Zellalterung auf die β -Sekretase

BACE1 (*α - β -site APP-cleaving enzyme*) ist ein N-glycosyliertes Typ I-Membranprotein und besitzt die Spezifität einer Aspartatprotease [Citron 2002; Yan *et al.* 1999]. Eine weitere β -Sekretase ist BACE2, die 64% Sequenzhomologie zu BACE1 aufweist [Cai *et al.* 2001; Howlett *et al.* 2000; Walter *et al.* 2001] und im Gegensatz zu BACE1 stärker in peripheren statt in neuronalem Gewebe exprimiert wird [Vassar *et al.* 1999]. Bei der Amyloidogenese spielt BACE2 nur eine untergeordnete Rolle, da die A β -Produktion gänzlich von BACE1 abhängig ist [Luo, Y. *et al.* 2001; Roberds *et al.* 2001]. Daher wurde in dieser Arbeit nur BACE1 untersucht.

Die Analyse von BACE1 zeigte, dass die Proteinexpression in allen Zelllinien konstant blieb. Stellvertretend für die anderen Zelllinien zeigt Abbildung 3.15 die BACE1 Expression in Niemann-Pick Typ C Fibroblasten.

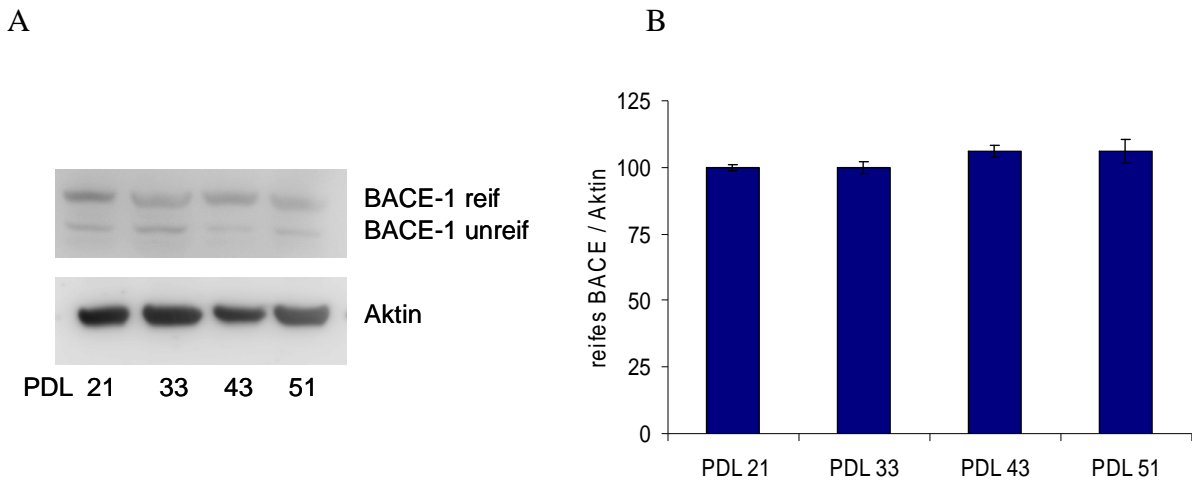


Abbildung 3.15: BACE1-Expression in Niemann-Pick Typ C Zellen (GM03123). (A), je 15 μ g Gesamtzelllysate wurde auf einem 4-12%igen Gradientengel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen BACE1. (B), die graphischen Darstellungen erfolgten mittels Auswertung der optischen Bandenaktivitäten und sind als prozentuale Veränderung zu PDL21 dargestellt.

Die Analyse der β -Sekretase-Aktivität erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei der α -Sekretase-Aktivität. Interessanterweise nahm die β -Sekretase-Aktivität im Laufe der Alterung in allen untersuchten Zelllinien zu. Die Werte lagen dabei zwischen 25 und 40% (Abb. 3.16).

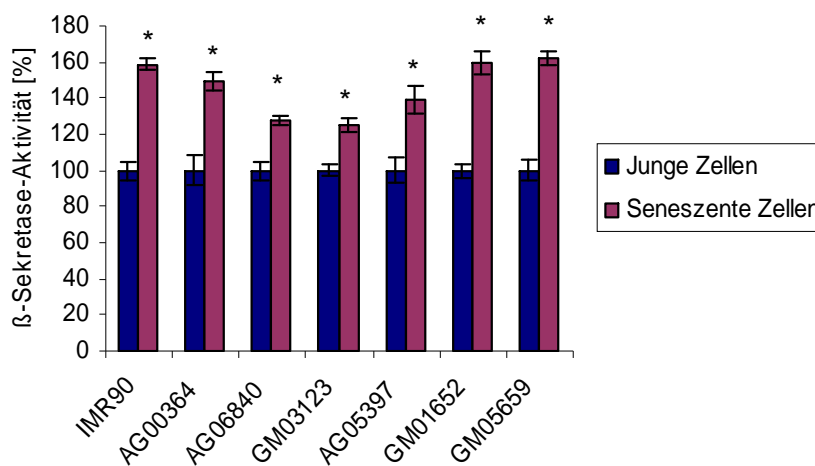


Abbildung 3.16: β -Sekretase-Aktivität aller untersuchten Zelllinien. Je Assay wurde 25 μ g Proteinlysate eingesetzt. Die graphische Darstellung zeigt die prozentuale Veränderung der β -Sekretase-Aktivität jeweils bezogen auf die jungen Zellen (Tuckey Test, * junge Zellen zu seneszenten Zellen, $p < 0.05$, $n = 4$).

Reifes BACE1, reifes APP und der γ -Sekretase-Komplex sind in Lipid Rafts lokalisiert [Cordy *et al.* 2003; Eehalt *et al.* 2003; Kalvodova *et al.* 2005; Vetrivel *et al.* 2004; Wada *et al.* 2003]. Da die Lipid Rafts im Zuge der Alterung disintegrieren [Kern *et al.* 2006], wurde ein möglicher Einfluss auf die β -Sekretase-Aktivität überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass in jungen Zellen aller untersuchten Zelllinien die Aktivität der β -Sekretase mit Lipid Rafts assoziiert ist, während sie in seneszenten Zellen ausschließlich in der Nicht-Raft Fraktion nachweisbar ist. Die folgende Abbildung zeigt stellvertretend für alle untersuchten Zelllinien die β -Sekretase-Aktivitätsverteilung von Trisomie 21-Fibroblasten AG05397 (Abb. 3.17).

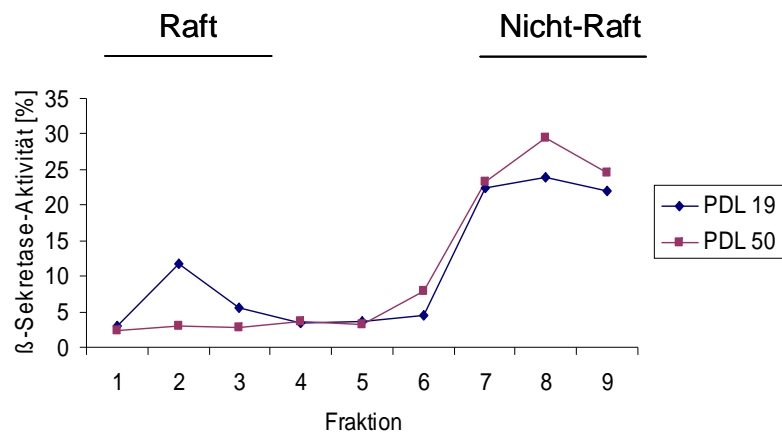


Abbildung 3.17: β -Sekretase-Aktivität in Lipid Rafts von Trisomie 21-Fibroblasten (AG05397). Nach Isolation der Lipid Rafts durch die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe 2.2.2.3) wurden 50 μ l jeder Fraktion für den β -Sekretase-Aktivitätsassay eingesetzt (siehe 2.2.2.11). Die Summe aller Fraktionswerte wurde auf 100% gesetzt. Fraktionen 1-3 wurden als Raft-Fraktion zusammengefasst, Fraktionen 7-9 als Nicht-Raft-Fraktion.

Die Fraktionen des Saccharosegradienten wurden auch auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse untersucht. Dabei zeigte sich auch hier, dass BACE1 in seneszenten Zellen in der Nicht-Raft-Fraktion lokalisiert ist. Stellvertretend für alle untersuchten Zelllinien zeigt Abbildung 3.18 die Western Blot Analyse der FAD-Zelllinie AG00364.

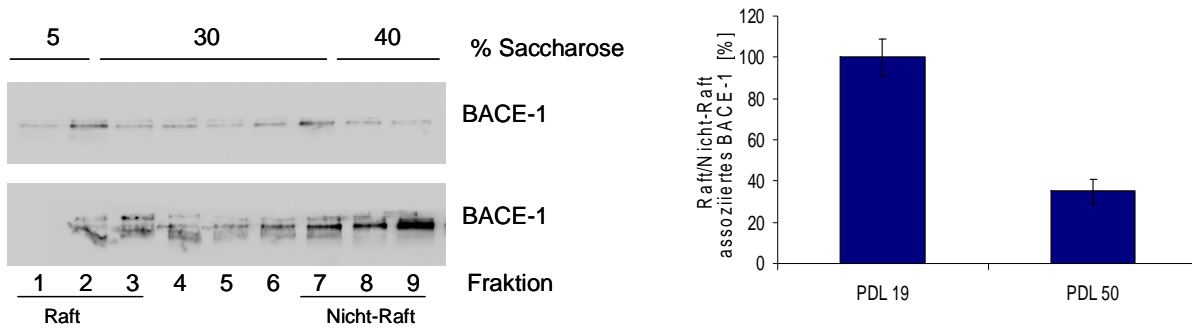


Abbildung 3.18: Untersuchung der Lokalisation von BACE1 in AG00364-Fibroblasten. Nach Isolation der Lipid Rafts mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe 2.2.2.3) wurden 30 μ l jeder Fraktion auf 12%igen PAA-Gelen aufgetrennt. Der Nachweis von BACE1 erfolgte mit einem spezifischen BACE1 Primärantikörper. Die graphische Auswertung erfolgte mittels der optischen Bandenintensitäten. Die Fraktionen 1-3 wurden als Rafts-Fraktion zusammengefasst und die Fraktionen 7-9 als Nicht-Raft-Fraktion.

3.3.3 Einfluss der Zellalterung auf die γ -Sekretase

Die γ -Sekretase ist ein Proteinkomplex bestehend aus Nicastrin [Edbauer *et al.* 2003; Kopan & Goate 2002], Pen-2 (presenilin enhancer protein 2) [Francis *et al.* 2002; Luo, W. J. *et al.* 2003], APH-1 (anterior pharynx effective 1) [Goutte 2002; Luo, W. J. *et al.* 2003] und den Transmembranproteinen Presenilin-1 und Presenilin-2 [Levy-Lahad *et al.* 1995; Sherrington *et al.* 1995]. Die Preseniline wurden mit der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebracht, da viele FAD-Mutationen in diesen Genen bekannt sind, welche die A β -Produktion fördern [Borchelt *et al.* 1996; Haass, C. & Steiner 2002]. Es ist mittlerweile bekannt, dass alle 4 Komponenten für die γ -Sekretase-Aktivität notwendig sind [Francis *et al.* 2002]. In dieser Arbeit wurden Presenilin-1 (PS1) und Nicastrin näher untersucht.

Die Western Blot Analyse von PS1 und Nicastrin zeigte eine altersassoziierte Abnahme der Expression beider Proteine in allen untersuchten Zelllinien, die in Abbildung 3.19 von der FAD-Zelllinie AG06840 repräsentiert werden.

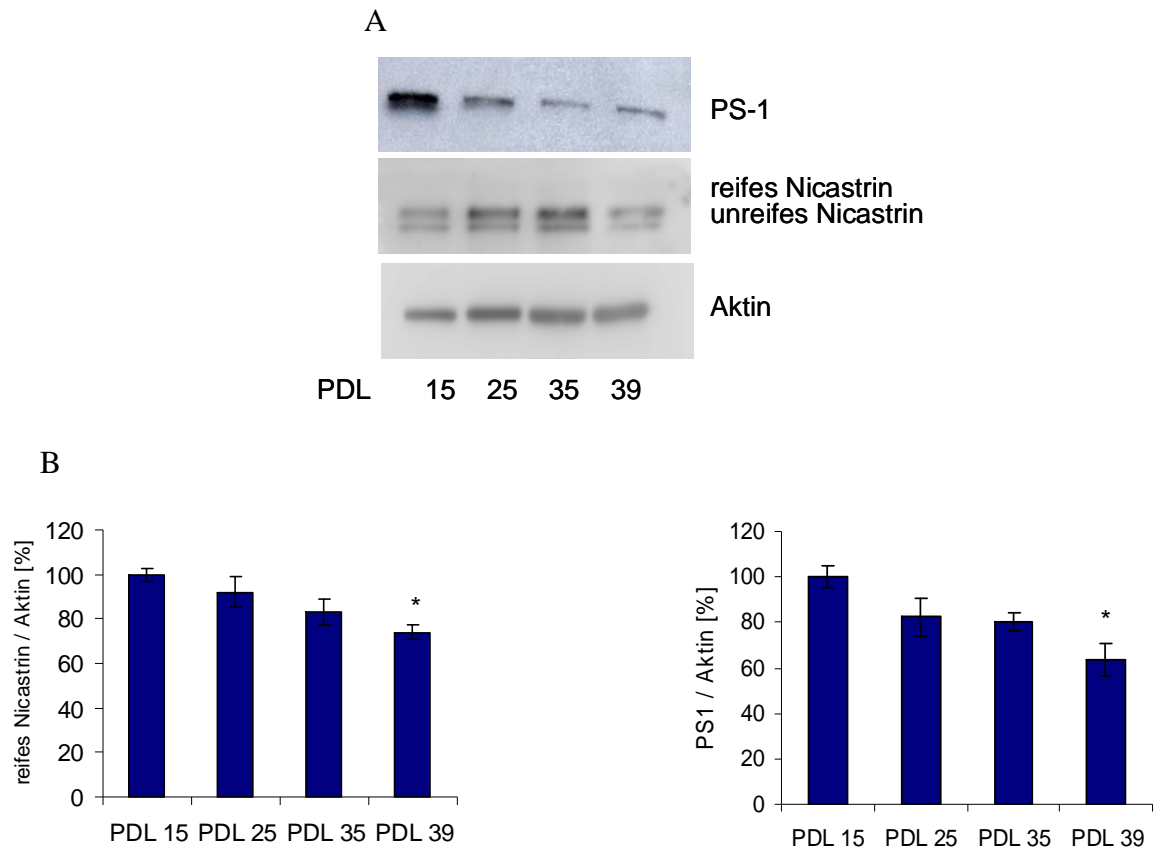


Abbildung 3.19: Expression der γ -Sekretase-Komponenten Presenilin-1 und Nicastrin in AG06840-Fibroblasten. (A), es wurde je PDL 15 μ g Gesamt-Zelllysate auf einem 4-12%igen PAA-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen PS1 bzw. Nicastrin. Als Ladekontrolle diente Aktin. (B), die graphische Darstellung erfolgte mittels Auswertung der optischen Bandenintensitäten und ist dargestellt als prozentuale Veränderung zu PDL 15 (Tuckey Test, * PDL 15 zu PDL 39, $p < 0.05$, $n = 5$).

Die Aktivität der γ -Sekretase wurde mit einem γ -Sekretase Aktivitätsassay bestimmt, der nach dem gleichen Prinzip funktioniert wie die Assays der α - bzw. β -Sekretase-Aktivität (siehe 2.2.2.11 bzw. 3.3.1). Ähnlich wie bei den untersuchten γ -Sekretase-Komponenten PS1 und Nicastrin konnte auch hier eine altersabhängige Abnahme der γ -Sekretase-Aktivität aller untersuchten Zelllinien festgestellt werden (Abb. 3.20).

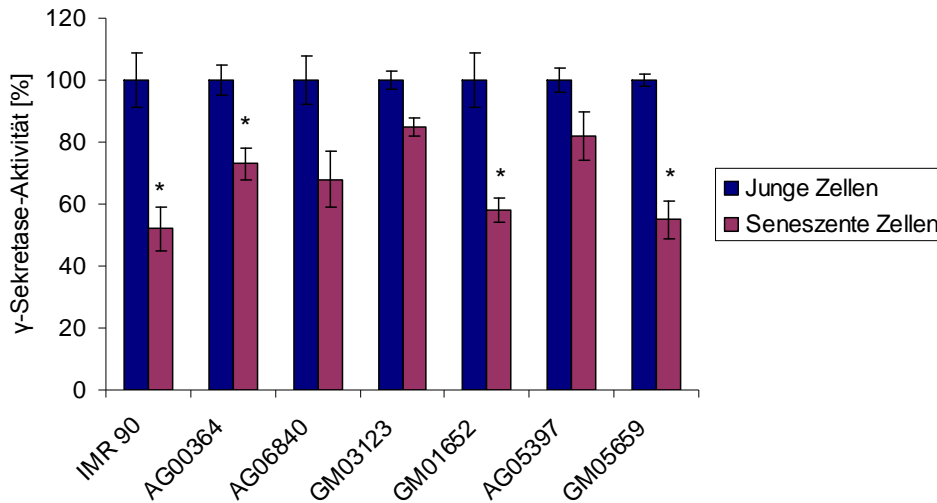


Abbildung 3.20: γ -Sekretase-Aktivität aller untersuchten Zelllinien. Für das γ -Sekretase-Aktivitätsassay wurden jeweils 15 μ g Proteinlysate eingesetzt. Die Abbildung zeigt die prozentuale Veränderung zu jungen Zellen (Tuckey Test, * Junge Zellen zu seneszenten Zellen, $p < 0.05$, $n = 4$).

Wie bereits unter 3.3.2 erwähnt, ist der γ -Sekretase-Komplex ebenfalls in Lipid Raft lokalisiert. Daher wurde auch bei der γ -Sekretase die Aktivitätsverteilung in Lipid Rafts bestimmt. Interessanterweise wurden hier keine Unterschiede in der Lokalisation der γ -Sekretase-Aktivität gefunden. Abbildung 3.21 zeigt stellvertretend für die gesamten untersuchten Zelllinien die γ -Sekretase-Aktivitätsverteilung in normalen humanen Fibroblasten GM01652.

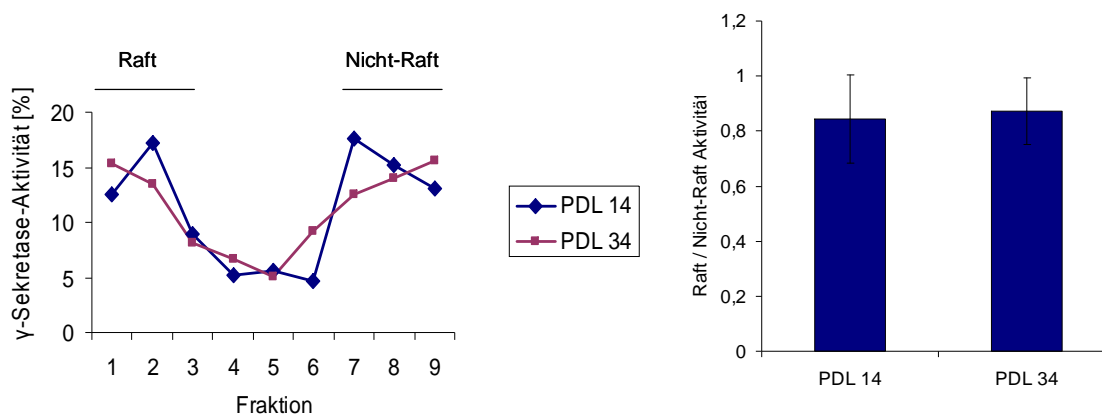


Abbildung 3.21: Lokalisation der γ -Sekretase-Aktivität in Lipid Rafts. Die Abbildung zeigt die Daten der Kontrollzelllinie GM01652. Je Fraktion wurden 50 μ l in den γ -Sekretase-Aktivitätsassay eingesetzt. Die Summe der Fraktionswerte jeder PDL wurde als 100% definiert. Für die graphische Auswertung wurden Fraktionen 1-3 als Raft-Fraktion und Fraktionen 7-9 als Nicht-Raft-Fraktionen zusammengefasst.

3.4 Weiterführende Untersuchungen der α - und β -Sekretase-Aktivitäten

Bei den Analysen der α - und β -Sekretasen wurde interessanterweise trotz gleich bleibender Proteinspiegel eine Änderung in der Aktivität festgestellt (siehe 3.3.1 und 3.3.2), während sich die Abnahme der Expression der γ -Sekretase-Komponenten Presenilin-1 und Nicastrin auch in einer Abnahme der γ -Sekretase-Aktivität widerspiegelte.

Daraufhin wurden im Folgenden Aktivitäten der α - und β -Sekretase näher untersucht. Dafür wurden, wenn nicht anders erwähnt, nur normale humane Fibroblasten IMR90 verwendet.

3.4.1 Zusammenhang zwischen α -Sekretase-Aktivität und SIRT1

Der größte Risikofaktor neurodegenerativer Erkrankung ist das Alter, wobei besonders die Alzheimer Erkrankung eine hohe Prävalenz aufweist [Riedel-Heller *et al.* 2001]. In vielen Studien wurde gezeigt, dass Kalorienrestriktion (CR) zu einer Lebensverlängerung in Hefe, Würmern, Fliegen und Säugern führen kann [Bordone & Guarente 2005; Gray & Ekström 2001; Smith, J.S. *et al.* 2000]. Ebenso wurde von Wang *et al.* (2005) gezeigt, dass CR in Tiermodellen vor Alzheimer-typischer amyloider Neuropathologie schützt und dass CR-Mäuse einen 30%igen Anstieg in der Expression von ADAM10 aufweisen [Wang *et al.* 2005]. Blander *et al.* (2004) zeigten, dass, bedingt durch die Kalorienreduktion, SIRT1 in einer Vielzahl von Geweben induziert wird [Blander & Guarente 2004]. SIRT1 ist eine NAD⁺-abhängige Deacetylase und wird mit vielen Effekten wie Stressresistenz und verminderter Apoptose in Verbindung gebracht.

Dieser Zusammenhang zwischen SIRT1 und ADAM10 wurde nachfolgend näher untersucht.

3.4.1.1 Untersuchung zur SIRT1 Expression im Alter

Wie schon unter 3.3.1 gezeigt, blieb die Expression von ADAM10 im Laufe der Zellalterung unverändert, während die α -Sekretase-Aktivität abnahm. Die Untersuchung von SIRT1 zeigte, dass die Expression altersabhängig um nahezu 50% abnahm (Abb. 3.22).

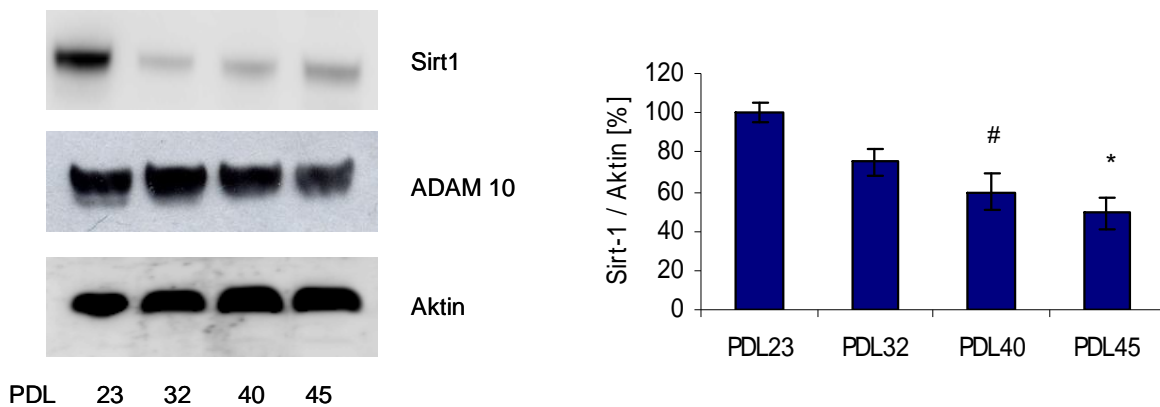


Abbildung 3.22: Expression von SIRT1 in IMR90-Fibroblasten. Pro untersuchter PDL wurden 15 µg Zelllysate auf einem 4-12%igen NuPage-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem SIRT1 spezifischen Primärantikörper. Die graphische Auswertung erfolgte mittels optischer Bandenintensitäten und ist dargestellt als prozentuale Veränderung zu PDL 23 (Tuckey Test, # PDL 23 zu PDL 40, * PDL 23 zu PDL 45, $p < 0.05$, $n = 5$).

3.4.1.2 Altersabhängige Untersuchung nach Inhibition von SIRT1

Sirtinol ist ein zellpermeables 2-Hydroxy-1-Naphthaldehyd-Derivat und ein chemischer Inhibitor von NAD^+ -abhängigen Sirtuinen (für nähere Informationen: Calbiochem, San Diego, Kalifornien). Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss eine SIRT1 Inhibition auf die α -Sekretase-Aktivität und die APP-Prozessierung hat.

Sowohl junge als auch seneszente IMR90-Fibroblasten wurden bei einer 80%igen Konfluenz zuerst 3 x mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 24 h mit je 10 µM Sirtinol behandelt. Danach wurden die gewonnenen Zelllysate einerseits auf α -Sekretase-Aktivität und andererseits per Western Blot-Analyse auf APP-Prozessierung hin untersucht.

Es zeigte sich, dass es in jungen und alten Zellen zu einer Abnahme der α -Sekretase-Aktivität kommt, wobei die Reduktion in seneszenten Zellen deutlicher ausfällt (Abb. 3.23).

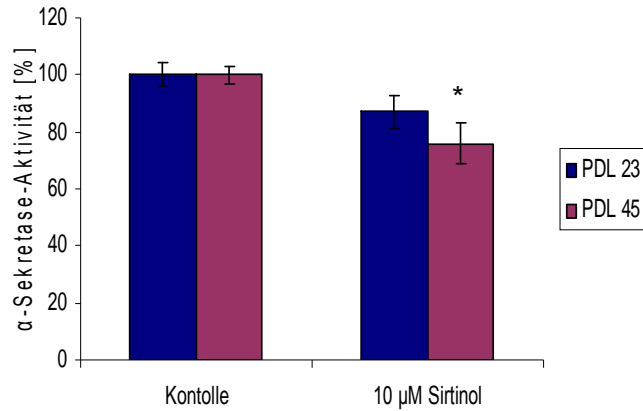
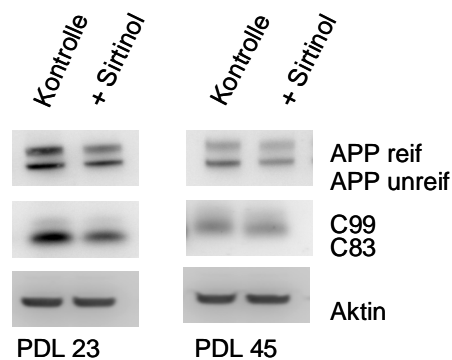


Abbildung 3.23: α -Sekretase-Aktivität nach Inhibition mit Sirtinol. IMR90-Fibroblasten wurden 24 h mit 10 μ M behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Je 25 μ g Proteinlysate wurden in das α -Sekretase-Aktivitätsassay eingesetzt. Die Graphik zeigt die prozentuale Veränderung zu PDL 23 (Tuckey Test, * PDL 23 zu PDL 45, $p < 0.05$, $n = 4$).

Die Western Blot-Analyse von APP zeigte in jungen und seneszenten Zellen keinerlei Änderungen im Verhältnis reifen zu unreifen APP. Für die CTFs (C-terminale Fragmente) seneszenten Zellen wurden keine signifikanten Veränderungen gefunden, während in jungen Zellen jedoch eine Abnahme der CTFs zu verzeichnen war. Somit kam es zu einer Verringerung des Verhältnisses dieser APP-CTFs bezogen auf totales APP sowie ausschließlich reifem APP (Abb. 3.24).

A



B

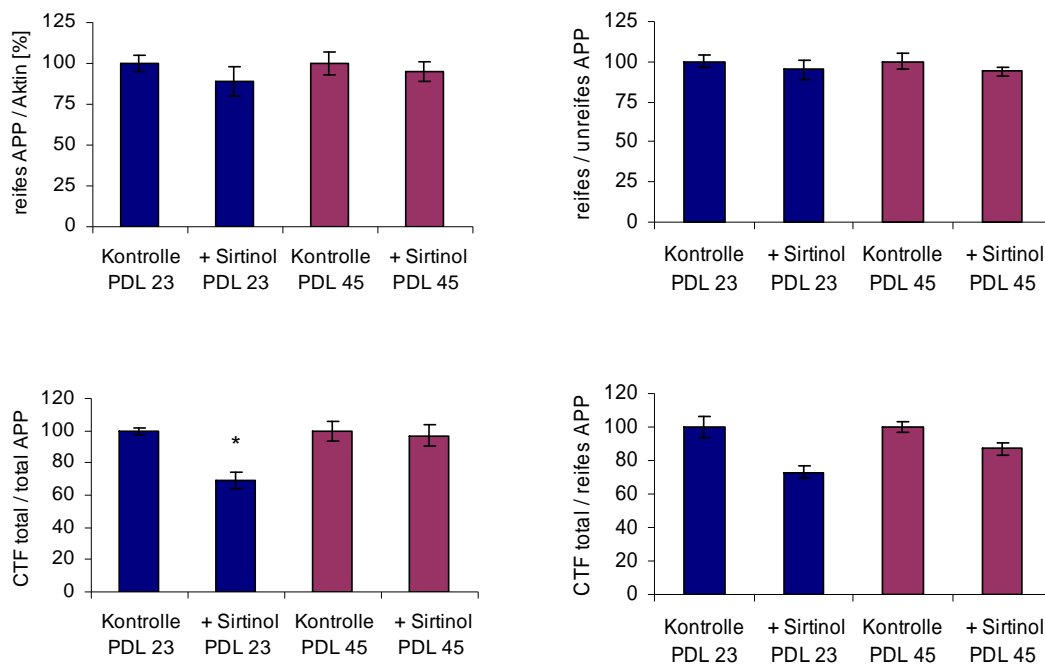


Abbildung 3.24: Western Blot Analyse der APP-Prozessierung nach Sirtinol-Inhibition. (A), junge und seneszente IMR90-Fibroblasten wurden 24 h mit 10 μ M Sirtinol behandelt. Danach wurden die Zelllysate auf einem 4-12% NuPage-Gel aufgetrennt und mit dem APP-Antikörper A8717 detektiert. Als Ladekontrolle diente Aktin. (B), die graphische Darstellung erfolgte mittels Auswertung der optischen Bandenintensitäten und ist wiedergegeben als prozentuale Veränderung zur jeweiligen Kontrolle (Tuckey Test, * Kontrolle PDL 23 zu mit Sirtinol behandelten IMR90 PDL 23, $p < 0.05$, $n = 4$).

Nach 72 h Inkubation wurde konditioniertes Medium gesammelt und auf Veränderungen der extrazellulären Spaltfragmente untersucht. Hier konnte in jungen Zellen eine starke Abnahme von sAPP α um 75% nach Behandlung mit Sirtinol gezeigt werden, während die Gesamtmenge an sAPP, die der Menge von sAPP α und sAPP β entspricht, leicht anstieg (Abb. 3.25). Seneszente Zellen wiesen keine signifikanten Änderungen von sAPP α bzw. sAPP auf.

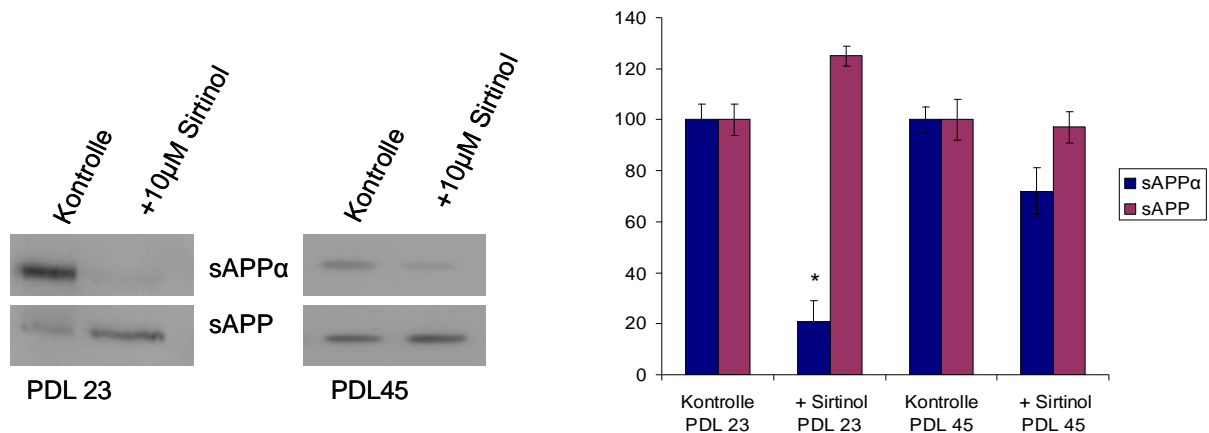


Abbildung 3.25: Analyse der extrazellulären Spaltfragmente nach Sirtinol-Inhibition. Konditioniertes Medium wurde gesammelt und auf einem 8%igen PAA-Gel aufgetrennt. sAPP α wurde mit dem Antikörper 6E10 detektiert, sAPP mit 22C11. Die graphische Darstellung erfolgte durch Auswertung der optischen Bandenintensitäten und wurde als prozentuale Veränderung zu den Kontrollen dargestellt (Tuckey Test, * Kontrollzellen PDL 23 zu Sirtinol-behandelten Zellen PDL 23, $p < 0.05$, $n = 4$).

3.4.1.3 Behandlung von IMR90-Fibroblasten mit dem ROCK1-Inhibitor Y27632

Qin *et al.* konnten 2006 zeigen, dass durch die Inhibition der Rho Kinase ROCK1 die α -Sekretase-Aktivität ansteigt [Qin *et al.* 2006 b]. Daher wurden junge und seneszente Fibroblasten mit einem ROCK1-Inhibitor (Y27632) behandelt und nachfolgend auf Änderungen in der APP Prozessierung und α -Sekretase-Aktivität untersucht.

Abbildung 3.26 zeigt die erwartete Zunahme der α -Sekretase-Aktivität nach Rock-1 Inhibition. Dazu wurden Zellen bei 80% iger Konfluenz für 24 h mit 10 μ M Y27632 behandelt und anschließend lysiert. Pro Versuch wurden 25 μ g Lysat in den α -Sekretase-Aktivitätsassay eingesetzt. Sowohl in jungen als auch in seneszenten NHF konnte ein signifikanter Anstieg der α -Sekretase-Aktivität beobachtet werden.

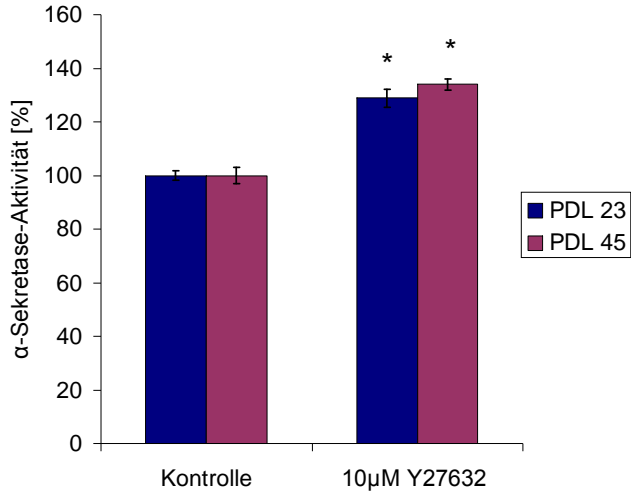


Abbildung 3.26: α -Sekretase-Aktivitätsmessung nach Rock1-Inhibition.

Es wurden jeweils 25 μ g Proteinlysate in den Sekretase-Aktivitäts-assay eingesetzt. Die graphische Darstellung zeigt die prozentuale Veränderung zur Kontrolle (Tuckey Test, * jeweils Kontrollzellen zu Y27632-behandelten Zellen, $p < 0.05$, $n = 4$).

Auf Proteinebene konnten keine Veränderungen der APP-Spiegel und der intrazellulären Spaltprodukte festgestellt werden. Dies zeigte, dass die erhöhte α -Sekretase-Aktivität zu keiner verstärkten Produktion von C83 führte (Abb. 3.27).

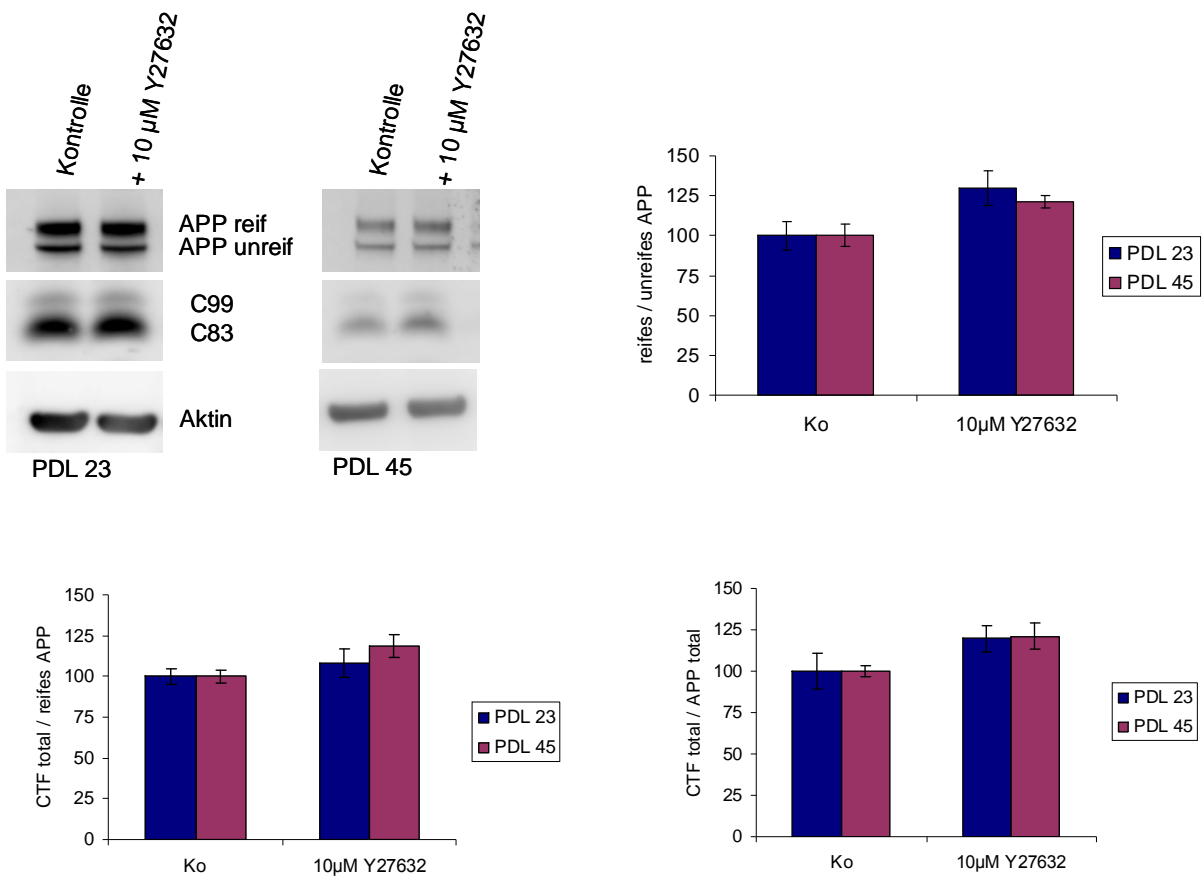


Abbildung 3.27: Analyse der APP-Prozessierung nach Rock1-Inhibition. Es wurden je 15 μ g Lysat auf einem 4-12%igen NuPage Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit dem A8717-Antikörper. Als Ladekontrolle diente Aktin. Die Graphik entstand durch Auswertung der optischen Bandenintensitäten und zeigt die prozentuale Veränderung jeweils zur Kontrolle.

3.4.2 Untersuchungen zur β -Sekretase-Aktivität

3.4.2.1 Behandlung junger Fibroblasten mit Mediumüberstand seneszenten Fibroblasten

Wie unter 3.3.2 gezeigt, nahm die β -Sekretase-Aktivität in seneszenten Zellen im Gegensatz zur α - bzw. γ -Sekretase-Aktivität zu. Die Proteinspiegel von BACE1 blieben dabei unverändert. Da bekannt ist, dass seneszente Zellen verschiedene Faktoren ins Medium sezernieren (zur Übersicht [Krtolica & Campisi 2002]), stellte sich die Frage, ob die erhöhte β -Sekretase-Aktivität dadurch verursacht wurde. Um dies zu überprüfen, wurden junge Zellen mit dem Mediumüberstand seneszenten Zellen behandelt und die β -Sekretase-Aktivität bestimmt. Dazu wurde frisches Medium für 72 h auf seneszente Zellen gegeben, danach abgenommen und für 72 h auf junge Zellen gegeben. Unbehandelte junge und seneszente Zellen dienten als Kontrolle. Interessanter Weise stieg bei dieser Behandlung die β -Sekretase-Aktivität an (Abb. 3.28).

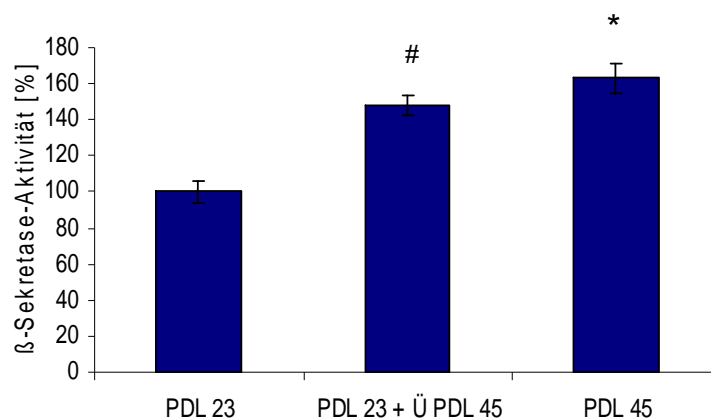


Abbildung 3.28: β -Sekretase-Aktivität von IMR90-Fibroblasten. Junge Zellen mit einer Konfluenz von 60% wurden für 72 h mit dem Überstand seneszenten Zellen behandelt. Nach Lyse wurden jeweils 25 μ g in den β -Sekretase-Aktivitätsassay eingesetzt. Die Graphik zeigt die prozentuale Veränderung zu PDL 23 (Tuckey Test, # PDL 23 zu PDL 23 + Überstand PDL 45, * PDL 23 zu PDL 45, $p < 0.05$, $n = 3$).

Nach einer Quantifizierung von BACE1 mittels Real-Time PCR konnten Veränderungen auf mRNA-Ebene ausgeschlossen werden (Abb. 3.29).

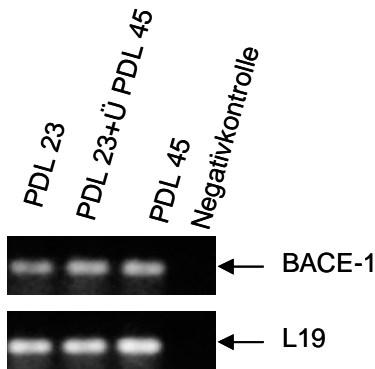


Abbildung 3.29 Untersuchung der BACE1 mRNA-Spiegel. Mittels Real-Time PCR Analyse wurde die Expression von BACE1 untersucht (zur näheren Erläuterung der Real-Time PCR siehe 2.2.4.7). Zur Visualisierung wurden die Proben auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. L19 diente als Kontrolle.

Die Untersuchung der APP-Prozessierung auf Proteinebene zeigte bei jungen Zellen keinen Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Fibroblasten. In alten Zellen jedoch kam es, wie schon unter 3.2.1 untersucht, zu einer signifikanten Abnahme der APP-Prozessierung (Abb.3.30).

A

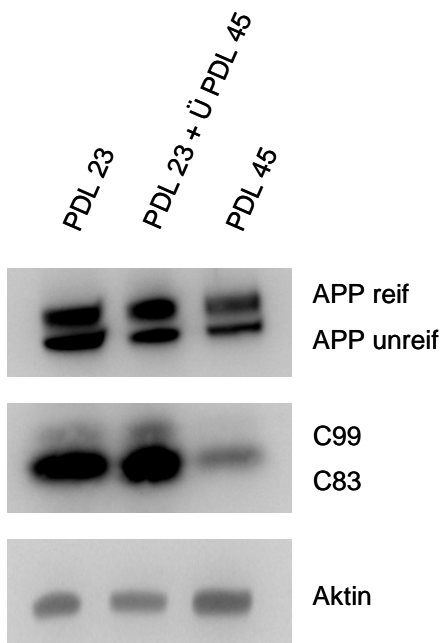
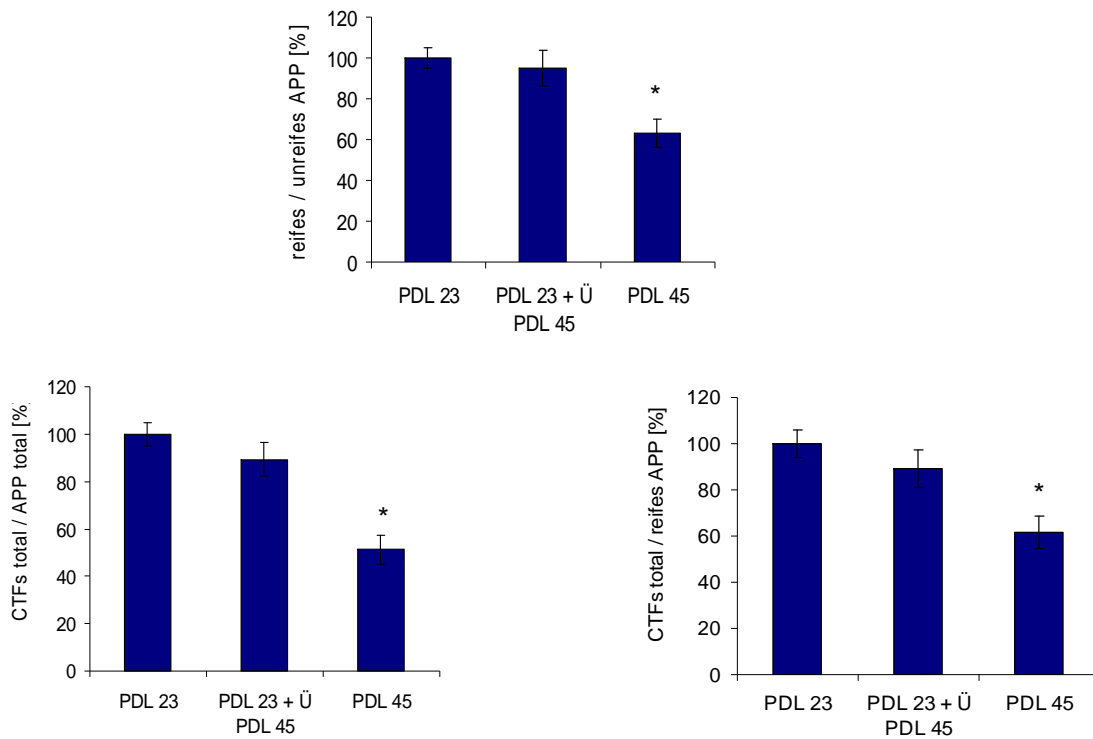


Abbildung 3.30: APP-Prozessierung in mit konditioniertem Medium behandelten jungen NHFs. (A), es wurden jeweils 15 µg Zelllysate auf einem 4-12% NuPage-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgt mit einem APP-spezifischen Primärantikörper A8717. (B), die graphische Darstellung erfolgte mittels Auswertung der optischen Bandenintensitäten und zeigt die prozentuale Veränderung zu PDL 23 (Tuckey Test, * PDL 23 zu PDL 45, $p < 0.05$, $n = 4$).

B



3.4.2.2 Übertrag auf Neuroblastoma-Zellen N2a

Die Zunahme der β -Sekretase-Aktivität nach Behandlung mit konditionierten Medium seneszenten Zellen konnte auch in neuronalen Zellen nachgewiesen werden. Dazu wurden N2a-Zellen für 72 h mit dem Medium seneszenten Fibroblasten behandelt und anschließend auf ihre β -Sekretase-Aktivität untersucht. Auch hier findet man einen Anstieg der Aktivität um 45 % (Abb. 3.31).

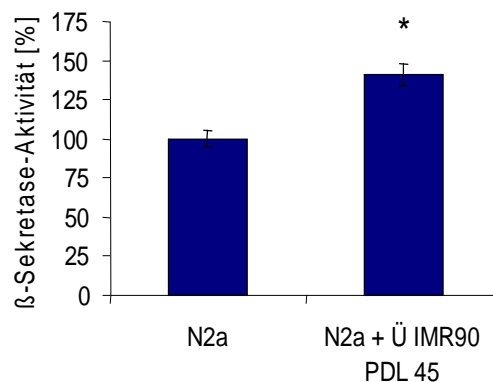


Abbildung 3.31: β -Sekretase-Aktivität in N2a-Zellen nach Behandlung mit konditioniertem Medium seneszenten Fibroblasten. N2a-Zellen wurden 72 h mit dem Überstand seneszenten IMR90-Fibroblasten inkubiert. Nach Zellyse wurden ja 25 μ g Proteinlysate in den β -Sekretase-Aktivitätsassay eingesetzt. Die Graphik zeigt die prozentuale Veränderung der β -Sekretase-Aktivität bezogen auf unbehandelte N2a-Zellen (Tuckey Test, * unbehandelte N2a-Zellen zu mit Überstand behandelte N2a-Zellen, $p < 0.05$, $n = 3$).

3.4.2.3 Behandlung von Fibroblasten mit Aphidicolin

Seneszente Zellen unterliegen einem Proliferationsstopp in der G1-Phase, was zu molekularbiologischen Veränderungen bei der Regulation des Zellzykluses führt [CHEN 2000]. Um zu überprüfen, ob der Zellzyklus-Arrest eine Auswirkung auf die β -Sekretase-Aktivität hat, wurden IMR90-Fibroblasten mit dem Zellzyklus-Inhibitor Aphidicolin behandelt. Aphidicolin hält den Zellzyklus in der frühen S-Phase an, indem es die DNA-Polymerase A und somit die DNA-Replikation inhibiert. Für diese Untersuchung wurden Zellen für 24 h mit 1 μ g/ml Aphidicolin inkubiert und anschließend die β -Sekretase-Aktivität bestimmt. In jungen Zellen konnte ein Anstieg der β -Sekretase-Aktivität beobachtet werden, während in seneszenten Zellen keine Änderungen zu sehen waren (Abb.3.32).

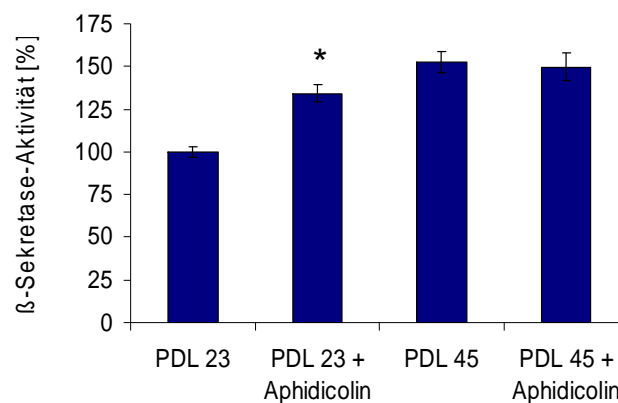


Abbildung 3.32: Behandlung von Fibroblasten mit dem Zellzyklus-Inhibitor Aphidicolin. Junge und seneszente IMR90-Fibroblasten wurden für 24 h mit 1 μ g/ml Aphidicolin behandelt und nach Zellyse die β -Sekretase-Aktivität mittels des β -Sekretase-Aktivitätskits bestimmt. Die graphische Darstellung zeigt die prozentuale Veränderung bezogen auf die jungen Zellen (PDL 23) (Tuckey Test, * unbehandelte Zellen PDL 23 zu Aphidicolin-behandelte Zellen PDL 23, $p < 0.05$, $n = 3$).

Um die Expression auf Proteinebene zu untersuchen, wurden 15 μg Proteinlysate auf einem 4-12%igen NuPage-Gel aufgetrennt und BACE1 mit einem spezifischen Primärantikörper detektiert. Es wurden keine Veränderungen in der BACE1 Expression gefunden (Abb 3.33).

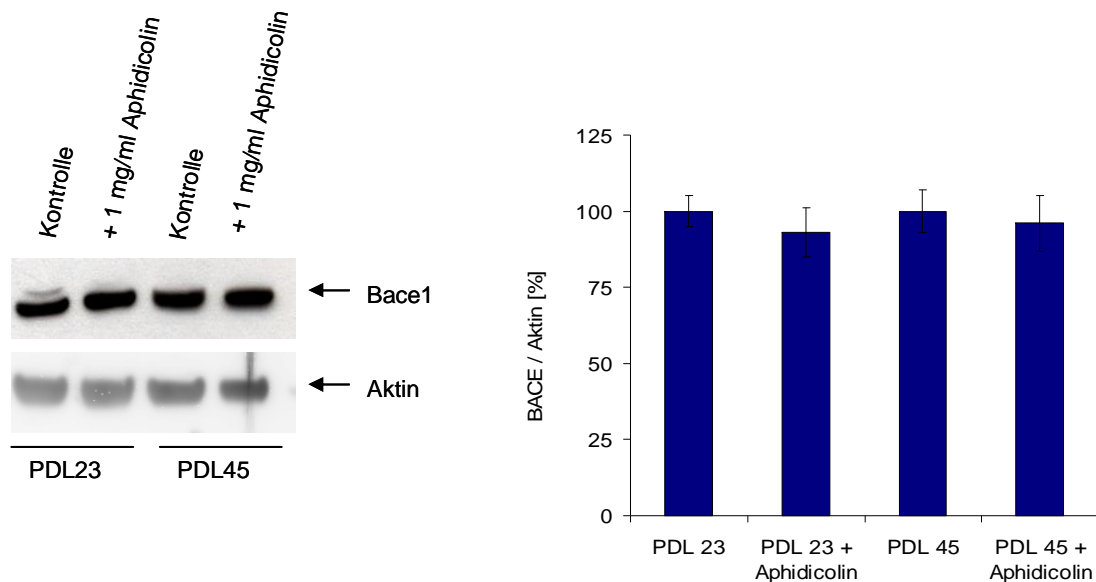
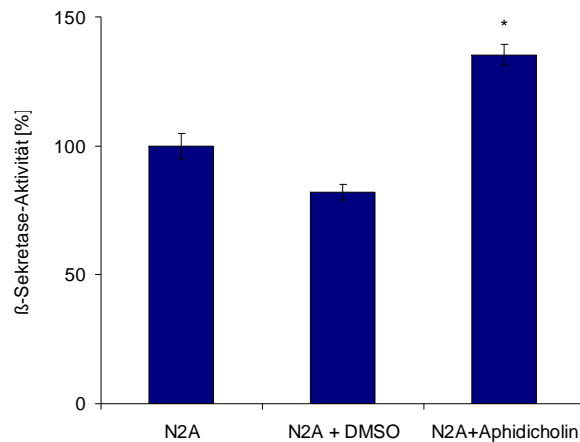


Abbildung 3.33: Proteinexpression von BACE1 nach Aphidicolin-Behandlung. Je 15 μg Gesamtzelllysate wurden auf einem 4-12% NuPage-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen Primärantikörper gegen BACE1, als Ladekontrolle diente Aktin. Die Graphik zeigt die prozentuale Veränderung der BACE1 Expression bezogen auf PDL 23.

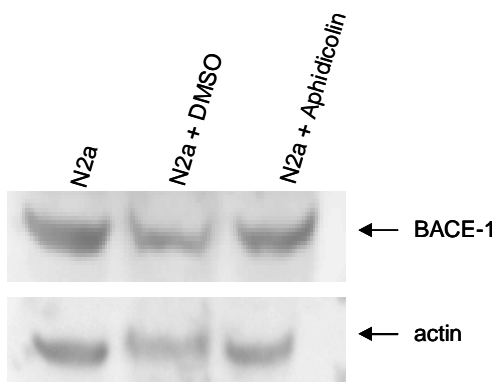
3.4.2.4 Behandlung von N2a-Zellen mit Aphidicolin

Um auch auf neuronaler Ebene den Einfluss eines Zellzyklus-Inhibitors auf die β -Sekretase-Aktivität zu überprüfen, wurden N2a-Zellen für 24 h mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aphidicolin behandelt. Auch hier zeigte sich ein Anstieg der β -Sekretase-Aktivität um 35 %, während es keine Änderung der Aktivität in der DMSO-Kontrolle gab (Abb. 3.34 A). Auf Proteinebene wurde ebenfalls keine Änderung der BACE1 Expression beobachtet (Abb. 3.34 B).

A



B



C

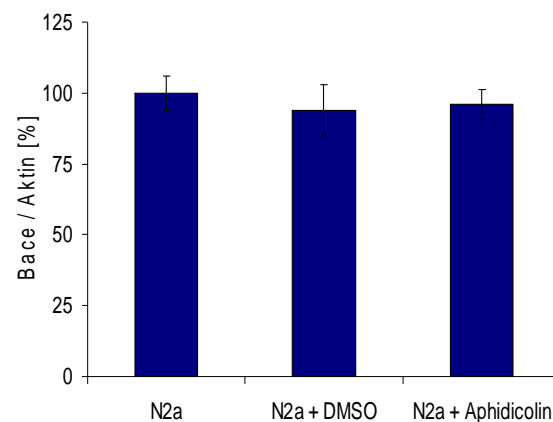


Abbildung 3.34: Einfluss von Aphidicholin auf die β -Sekretase-Aktivität und BACE1 Expression. In den β -Sekretase-Aktivitätsassay wurden je 25 μ g Proteinlysate eingesetzt, zur Western Blot Analyse 15 μ g. (A) zeigt die prozentuale Veränderung der β -Sekretase-Aktivität bezogen auf unbehandelte N2a-Zellen (Tuckey Test, * unbehandelte N2a-Zellen zu Aphidicholin-behandelte N2a-Zellen, $p < 0.05$, $n = 3$). (B), die BACE1 Expression wurde mit einem spezifischen Erstantikörper detektiert. Aktin diente als Ladekontrolle. (C), die graphische Darstellung erfolgte mittels Auswertung optischer Bandenintensitäten und ist als prozentuale Veränderung zu unbehandelten N2a-Zellen dargestellt.

3.4.2.5 Einfluss von Zytokinen auf die β -Sekretase-Aktivität

Aufgrund der Tatsache, dass die Behandlung junger Zellen mit dem Überstand seneszenten Zellen einen Anstieg der β -Sekretase-Aktivität nach sich zieht, wurde nach Substanzen gesucht, die von seneszenten Fibroblasten sezerniert werden und eventuell diesen β -

Sekretase-Aktivitätsanstieg verursachen. Eine interessante Gruppe stellten dabei die Zytokine dar. Van Damme *et al.* und Giovine & Duff konnten z. B. zeigen, dass Fibroblasten Interferon- β bzw. Interleukin-1 ins Medium sezernieren [di Giovine & Duff 1990; Van Damme *et al.* 1985]. Da inflammatorische Zytokine immer öfter mit der Alzheimer Erkrankung in Verbindung gebracht werden (zur Übersicht: [McGeer, E. G. & McGeer 2003]), wurde der Einfluss der drei Zytokine IFN α , IFN γ und IL6 auf die β -Sekretase-Aktivität untersucht.

Bei diesen Versuchen konnte in jungen Zellen eine signifikante Erhöhung der β -Sekretase-Aktivität nach Behandlung mit IFN α bzw. IL6 gezeigt werden (Abb. 3.35), während in seneszenten Zellen die Zugabe von Zytokinen keinen maßgeblichen Einfluss auf die β -Sekretase-Aktivität hat.

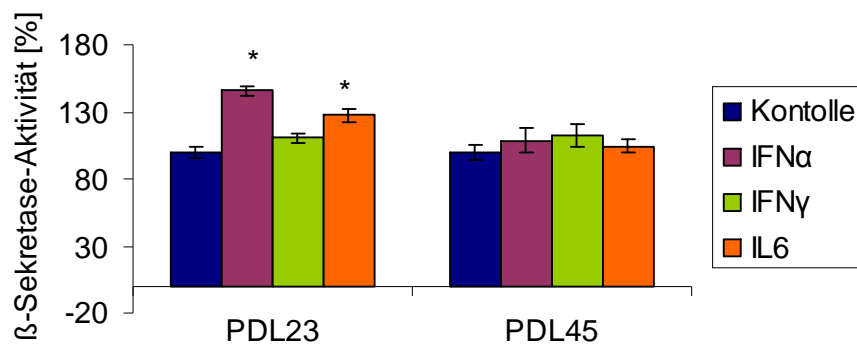


Abbildung 3.35: β -Sekretase-Aktivität in Zytokin-behandelten Fibroblasten. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 10 ng/ml des entsprechenden Zytokins für 24 h behandelt. In den β -Sekretase-Aktivitätsassay wurden je 25 μ g Proteinlysate eingesetzt. Die Graphik zeigt die prozentuale Veränderung der β -Sekretase-Aktivität in jungen (PDL 23) und seneszenten (PDL 45) IMR90-Fibroblasten bezogen auf die Kontrolle junger bzw. seneszenten Fibroblasten (Tuckey Test, * unbehandelte junge IMR-90 (Kontrolle) zu mit IFN γ - bzw. IL6-behandelten jungen IMR90, $p < 0.05$, $n = 3$).

Es wurden ebenfalls Western Blot Analysen bezüglich der APP-Prozessierung unternommen, da die Ergebnisse jedoch so unterschiedlich ausfielen, war keine Quantifizierung möglich (Daten nicht gezeigt). Dies muss in zukünftigen Studien detaillierter untersucht werden.

4 Diskussion

Den größten Risikofaktor, um an einer Hirnleistungsstörung zu erkranken, stellt nach wie vor das Alter dar. Dabei ist die Demenz vom Alzheimer-Typ (AD) mit über 60% die häufigste Erkrankung [Schmidtke 2005]. Die AD hat nach heutigem Erkenntnisstand nicht eine einzelne Ursache, sondern scheint vielmehr aus einer Anzahl verschiedener pathologischer Prozesse zu resultieren. Ein mit entscheidender Schritt bei der Entstehung der AD ist die Prozessierung des Amyloid Vorläuferproteins APP [Selkoe, D.J 2004].

Kern *et al.* (2006) zeigten erstmals einen Zusammenhang zwischen Alterung und Veränderung der APP-Prozessierung. In der vorliegenden Arbeit sollte nun der Einfluss der Zellalterung auf die pathobiochemischen Prozesse von Morbus Alzheimer und weiterer neurodegenerativer Erkrankungen untersucht werden. Für die Analysen der altersrelevanten Veränderungen der APP-Prozessierung wurden Fibroblasten verwendet, die aufgrund ihrer definierten Teilungsfähigkeit ein etabliertes Altersmodell darstellen (siehe 1.7).

4.1 Verwendete Fibroblasten

Etwa 10-15% aller Alzheimer-Erkrankungen treten familiär gehäuft auf und haben einen frühen Ausbruch gemein (< 65 Jahre). Sie sind auf Mutationen im APP-Gen oder in den Presenilin-Genen PS1 oder PS2 zurück zu führen [Goate *et al.* 1991; Levy-Lahad *et al.* 1995; Sherrington *et al.* 1995]. Diese Mutationen ziehen eine gesteigerte Produktion von A β ₄₂ bzw. eine Erhöhung des A β ₄₂ zu A β ₄₀ Verhältnisses nach sich [Borchelt *et al.* 1996; Citron *et al.* 1997; Duff *et al.* 1996].

Für diese Arbeit wurden zwei Zelllinien mit bekannter familiärer Alzheimer-Erkrankung (AG06840 und AG00364) verwendet. Es ist jedoch nur von AG06840 die genaue Mutation im PS1-Gen bekannt [Nee *et al.* 1983]. Die Zellen der Linie AG00364 stammen von der Hautbiopsie eines Mannes, der einen sehr frühen Ausbruch der Alzheimer-Erkrankung zeigte. Dies lässt mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Mutation im PS1-Gen schließen, da dies zu einem frühen Einsetzen der Alzheimer-Erkrankung führt [Levy-Lahad *et al.* 1995; Sherrington *et al.* 1995].

Sowohl das amyloide Vorläuferprotein APP als auch die β -Sekretase BACE1 ist auf Chromosom 21 lokalisiert. Patienten mit Down Syndrom, aufgrund des zusätzlichen Chromosom 21 auch Trisomie 21 genannt, entwickeln alle eine charakteristische Alzheimer Neuropathologie einschließlich dem Auftreten neuritischer Plaques und neurofibrillärer Bündel (Tangles) [G.G. Glenner 1984b; G.G. Glenner 1984a; Hardy J. 2002]. Diese dritte, zusätzliche Kopie von Chromosom 21 bedingt höhere Spiegel von APP und somit auch des C-terminalen Fragments C99 und des A β -Proteins [Busciglio *et al.* 2002]. Daher bieten sich Zellen von DS-Patienten hervorragend zur Untersuchung der APP-Prozessierung an. In dieser Arbeit wurden Trisomie 21-Fibroblasten (AG05397) und eine passende Age-match-Kontrolle (GM05659) zur Untersuchung eingesetzt.

Ein weiteres wichtiges Merkmal der Alzheimer Pathologie sind neben den A β -Plaques die neurofibrillären Bündel, die aufgrund einer Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins gebildet werden [Goedert & A. 1996; Iqbal & Khatoon 2005]. Diese Tangles wurden auch in der Niemann Pick Typ C - Krankheit (NPC) gefunden, einer vererbten Lipidspeicherkrankheit, die durch Mutationen im NPC-Gen verursacht wird. NPC ist unter anderem charakterisiert durch eine progressive Neurodegeneration [Patterson *et al.* 2001], die normalerweise rasch zu Demenz und Tod führt. Ebenso zeigen sowohl AD als auch NPC frühe lysosomale Störungen. Nachdem eine Änderung der Cholesterin-Homöostase immer öfter mit der APP-Prozessierung und der Entstehung von A β in Verbindung gebracht wird (siehe zur Übersicht [Nixon 2004]), gewinnt die Pathobiologie von NPC an Bedeutung, da man sich davon erhofft, Rückschlüsse auf die AD ziehen zu können. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die APP-Prozessierung im Laufe der Alterung auch an NPC-Fibroblasten (GM03123) und einer dazu passenden Age-match-Kontrollzelllinie (GM01652) untersucht.

4.2 Charakterisierung des seneszenten Phänotyps

Replikative Seneszenz wurde als erstes von Hayflick und Kollegen beschrieben. Sie zeigten, dass normale humane Fibroblasten nur eine definierte Anzahl von Zellteilungen durchlaufen, bis sie einem Proliferationsstopp unterliegen, der als replikative Seneszenz bezeichnet wurde [Hayflick & Moorhead 1961; Hayflick 1965]. Diese seneszenten Zellen bieten aufgrund des limitierten Proliferationspotentials ein wichtiges Modell um Alterung auf zellulärem Level zu untersuchen [Goldstein 1990].

Die untersuchten Fibroblasten wurden bis zum Eintritt des Proliferationsstopps im Wachstumsfaktor-defizienten Medium kultiviert (vgl. Abbildung 3.2). Atamna *et al.* zeigten, dass dieses Medium die Alterung beschleunigt, aber ansonsten keinen Einfluss auf den seneszenten Phänotyp ausübt [Atamna *et al.* 2001]. Der Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität (vgl. Abbildung 3.3), die verstärkte Expression von Caveolin1 und p21^{Waf1/Cip1} (vgl. Abbildungen 3.4 und 3.6) sowie die veränderte Morphologie (vgl. Abbildung 3.1) in den gealterten Zellen bestätigten den seneszenten Phänotyp.

In NPC-Fibroblasten GM03123 und FAD-Fibroblasten AG06840 wurde eine konstante Expression von Caveolin1 (vgl. Abbildung 3.5) gefunden. Dies könnte darauf zurück zu führen sein, dass sowohl in NPC als auch in FAD mit PS1-Mutation eine gestörte Cholesterin-Homöostase vorliegt und der Cholesterinspiegel ebenfalls maßgeblich für die mRNA-Menge von Caveolin verantwortlich ist [Smart *et al.* 1996]. Auch wurde von Fielding und Fielding gezeigt, dass bei hoher Cholesterinkonzentration in der Zelle die Caveolin1 Expression ansteigt [Fielding & Fielding 1997].

Die Untersuchung der zellulären Cholesterinspiegel zeigte einen altersabhängigen signifikanten Anstieg in normalen humanen Fibroblasten (IMR 90 und GM01652) und in FAD-Fibroblasten AG00364 (vgl. Abbildung 3.9). In der NPC-Zelllinie GM03123 wurde der höchste Cholesterinwert aller jungen Zellen gemessen und der zweithöchste in der FAD-Zelllinie AG06840 (Daten nicht gezeigt). Dies könnte dazu führen, dass Caveolin1 in diesen beiden Zelllinien aufgrund der hohen Cholesterinmenge schon in jungen Zellen stark exprimiert wird und daher im Zuge der Alterung keinen großen Schwankungen unterliegt.

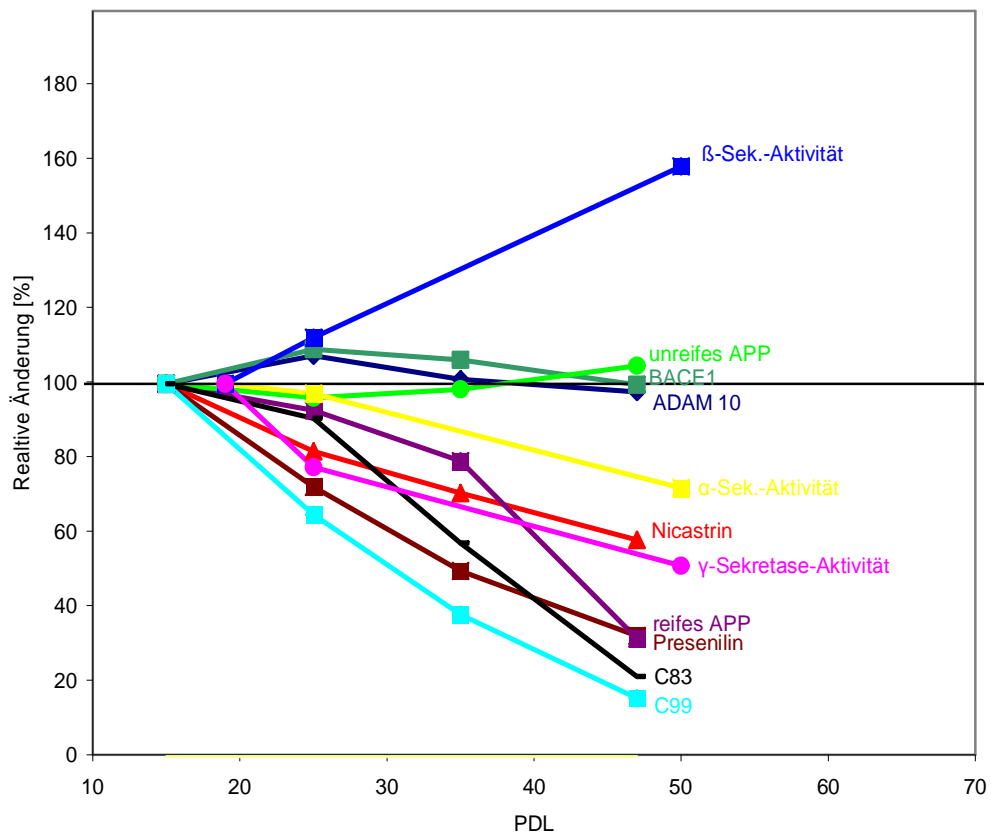
Da bekannt ist, dass der Caveolin-Promotor häufig methyliert ist [Zschocke *et al.* 2002], stellte sich die Frage, ob die gesteigerte Expression von Caveolin1 in IMR90-Fibroblasten auf eine Demethylierung des Promotors zurück zu führen ist (vgl. 3.1.4). Epigenetische Modifikationen sind in der Lage, die Regulation der Genexpression zu beeinflussen. Unter Epigenetik versteht man den klonal vererbaren Einfluss auf Chromosomen oder Genfunktion, der nicht von einer Veränderung der DNA-Basensequenz begleitet wird. Eine der bekanntesten epigenetischen Modifikationen ist die genomische Prägung durch DNA-Methylierung („Genomic Imprinting“ [Li, E. 2002]). Von Taylor und Jones wurde gezeigt, dass Gene im methylierten Zustand stillgelegt werden und dass diese Stilllegung von Genen reversibel ist, wenn die Methylierung verloren geht [Taylor & Jones 1979].

Die Untersuchung des Promotorbereichs zeigte in normalen humanen Fibroblasten IMR90, dass sowohl in jungen und seneszenten Zellen die CpG-Dinukleotide der analysierten CpG-Insel unmethyliert vorlagen. Daher kann eine Demethylierung, die zu einer verstärkten Expression von Caveolin1 im Alter führen würde, ausgeschlossen werden.

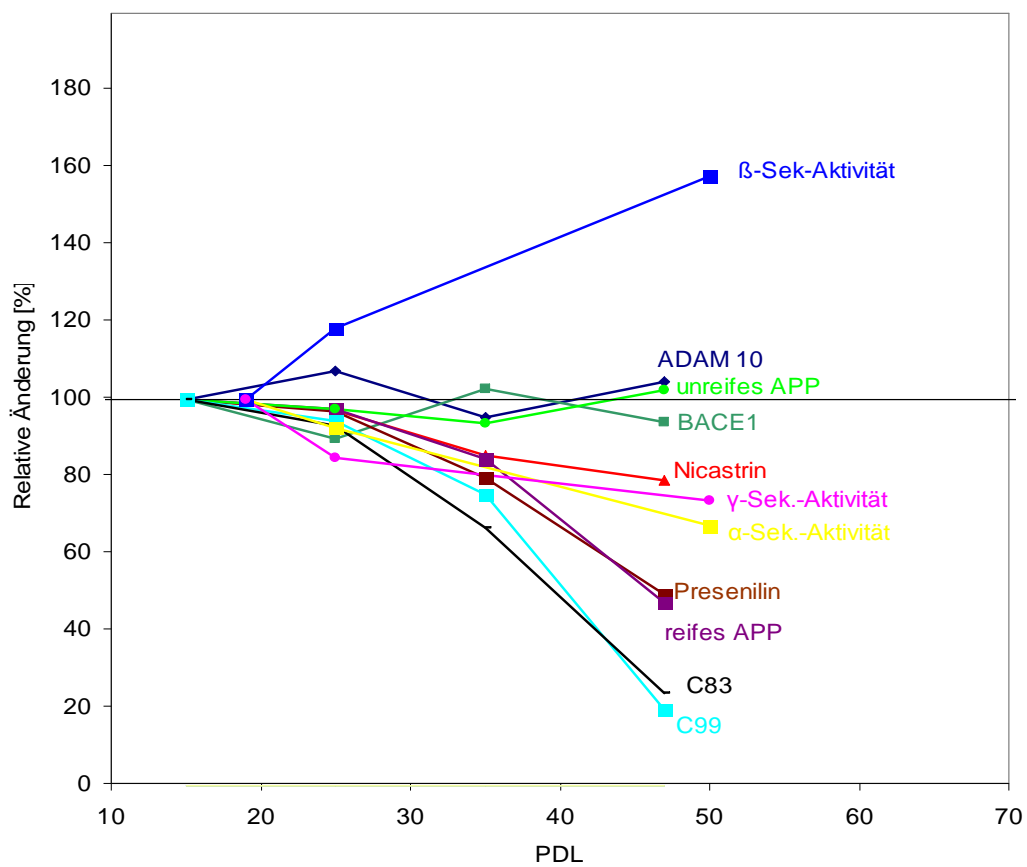
4.3 Einfluss der Zellalterung auf die APP-Prozessierung

Bei der Analyse der APP-Prozessierung wurde, unabhängig vom genetischen Hintergrund der untersuchten Zelllinien, eine altersabhängige Regulation der Proteinspiegel und der Sekretase-Aktivitäten festgestellt. Als Beispiel zeigt Abbildung 4.1 eine Übersicht der erhaltenen Ergebnisse in normalen humanen Fibroblasten IMR90 und GM05659 und in der neurodegenerativen FAD-Zelllinie AG00364.

A: IMR90-Fibroblasten



B: FAD-Fibroblasten AG00364



C: normale humane Fibroblasten GM05659

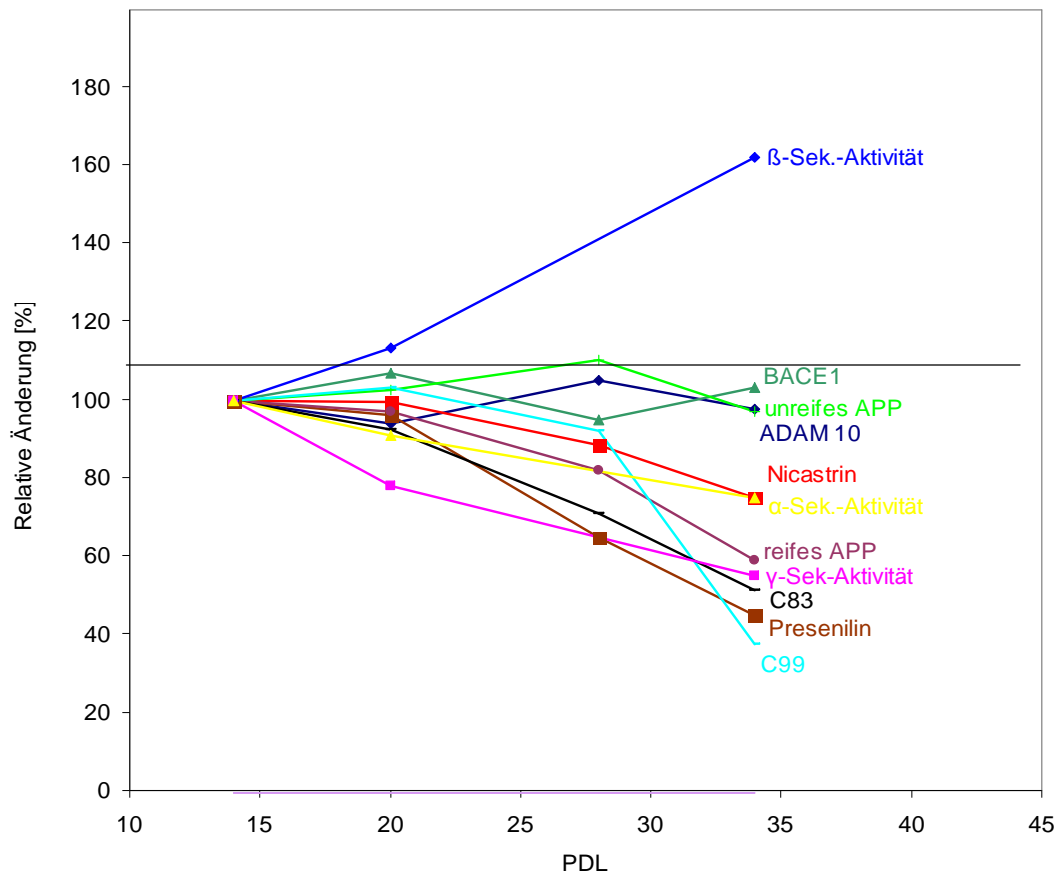


Abbildung 4.1: Altersabhängige Veränderungen bei der APP-Prozessierung: (A) zeigt die Änderungen in normalen humanen Fibroblasten IMR90, (B) zeigt die Änderungen in FAD-Fibroblasten AG00364 und (C) zeigt die Änderungen in normale humane Fibroblasten GM05659.

4.3.1 Der Einfluss der zellulären Alterung auf die APP-Reifung

APP ist ein ubiquitär exprimiertes Typ-I Transmembranprotein, welches auf Chromosom 21 lokalisiert ist [Kang *et al.* 1987; Selkoe, D.J. 1996]. Das APP-Protein gelangt während der Translation in das endoplasmatische Retikulum (ER) und über die Golgivesikel zur Zellmembran. Während seiner Biosynthese wird es N- und O-glykosyliert [Weidemann *et al.* 1989], sulphoryliert [Suzuki *et al.* 1994] und phosphoryliert [Hung & Selkoe 1994]. Unreifes APP ist nur N-glykosyliert und verbleibt vermutlich im ER/Golgi-Komplex und gelangt daher nicht an die Membran [Tamboli *et al.* 2005; Tomita *et al.* 1998].

In seneszenten Zellen ist die Menge an reifen APP verringert, während unreifes APP keiner Änderung unterliegt (vgl. Abbildung 3.11). Dies führte zu einer Abnahme des Verhältnisses

reifen zu unreifen APP. Obwohl weniger reifes APP vorhanden ist, kommt es nicht zu einer Akkumulation von unreifen APP in seneszenten Zellen.

Die hohen Cholesterinspiegel im Alter könnten der Grund für die reduzierte Reifungseffizienz sein. Galbete *et al.* konnten zeigen, dass durch erhöhte Cholesterinmengen die Glykosylierung von APP im Golgi-Apparat inhibiert und somit die Maturierung von APP gestört wurde [Galbete *et al.* 2000]. Ebenfalls konnte von Kern *et al.* gezeigt werden, dass Cholesterin die APP-Reifung direkt beeinflusst [Kern *et al.* 2006].

Aus der verringerten APP-Reifung resultierten geringere Substratspiegel und somit eine reduzierte Prozessierung von APP. Dies führte zu den beobachteten Abnahmen sowohl der intrazellulären Spaltfragmente C99 und C83 (vgl. Abbildung 4.1) als auch der extrazellulären Spaltfragmente sAPP α und sAPP (vgl. Abbildung 3.12), wie dies auch schon für IMR90-Fibroblasten gezeigt wurde [Kern *et al.* 2006] (vgl. Abbildung 4.1). Diese progressive Abnahme der APP-Prozessierung konnte in allen untersuchten Zelllinien, unabhängig vom genetischen Hintergrund, gezeigt werden.

4.3.2 Der Einfluss der zellulären Alterung auf die APP-Sekretasen

APP wird auf den sekretorischen Prozessierungsweg von α -, β - und γ -Sekretasen geschnitten. Es zeigte sich, dass die α - und γ -Sekretase-Aktivität mit steigendem Alter abnahm. Die Proteinspiegel von zwei Komponenten der γ -Sekretase, Nicastrin und Presenilin, wurden ebenfalls altersabhängig verringert, während die α -Sekretase ADAM10 keine Regulation aufwies. Interessanterweise nahm im Gegensatz dazu die β -Sekretase-Aktivität in seneszenten Zellen bei gleich bleibender Proteinexpression zu. Der Einfluss der zellulären Alterung auf die APP-Sekretasen soll im Folgenden näher erläutert werden.

4.3.2.1 Die α -Sekretase

Bei der Spaltung durch die α -Sekretase entsteht ein großes, lösliches N-terminales APP-Fragment (sAPP α) und ein in der Membran verankertes C-terminales Fragment C83 [Schubert *et al.* 1989; Weidemann *et al.* 1989]. Die α -Sekretase-Spaltung erfolgt intrazellulär,

vorwiegend nach N- und O-Glykosylierung und Sulfatierung in einem späten Kompartiment des sekretorischen Transportwegs sowie an der Zellmembran.

Die Proteinspiegel von ADAM10 blieben in allen untersuchten Zelllinien im Laufe der zellulären Alterung konstant, während die α -Sekretase-Aktivität abnahm (vgl. Abbildungen 3.13 und 3.14). Da in seneszenten Zellen weniger APP-Substrat vorhanden ist, kommt es folglich auch zu weniger Spaltprodukten. Dies zeigte sich in verminderten C83-Proteinspiegeln (vgl. Abbildung 3.11 A).

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass durch eine Anreicherung von Cholesterin in der Membran sAPP α vermindert freigesetzt wird [Bodovitz & Klein 1996; Racchi *et al.* 1997]. Ebenso wurde die Aktivität von ADAM10 durch eine erhöhte Cholesterinkonzentration erniedrigt, während eine Behandlung mit Cholesterin-senkenden Medikamenten die α -Sekretase-Aktivität als auch die Expression von ADAM10 stimuliert [Kojro *et al.* 2001]. Auch führte eine Extraktion von Cholesterin durch entweder Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) oder Simvastin (Cholesterin-senkendes Medikament) zu einer drastischen Verringerung der A β -Produktion [Fassbender *et al.* 2001; Simons *et al.* 1998].

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass es durch die hohen Cholesterinspiegel in seneszenten Zellen (vgl. Abbildung 3.9) zu einer Abnahme der α -Sekretase-Aktivität, sowie zu verminderten Proteinspiegel des extrazellulären Spaltprodukts sAPP α (vgl. Abbildung 3.12) und des intrazellulären Spaltprodukts C83 kommt (vgl. Abbildung 3.11 A).

Normalerweise führt eine verminderte Prozessierung von APP durch ADAM10 zu einer vermehrten Spaltung durch die β -Sekretase und somit zu einer Anreicherung von C99 und A β [Postina *et al.* 2004]. In seneszenten Zellen jedoch waren sowohl die C83- als auch die C99-Spiegel erniedrigt, während das Verhältnis von sAPP α zu sAPP konstant blieb. Dies zeigte, dass bei der zellulären Alterung weder der amyloidogene noch der nicht-amyloidogene Weg bevorzugt werden.

Ein weiterer Einfluss auf die α -Sekretase-Aktivität wurde von vielen Gruppen mit der Expression von SIRT1, einer NAD⁺-abhängigen Histon-Deacetylase, verknüpft [Patel *et al.* 2005; Qin *et al.* 2006 a; Qin *et al.* 2006 b; Wang *et al.* 2005]. Dies wird unter 4.4 näher diskutiert.

4.3.2.2 Die β -Sekretase

Die Spaltung durch die β -Sekretase liefert das lösliche sAPP β und ein ca. 12 kDa großes, membranverankertes Fragment C99 [Sinha & Lieberburg 1999; Vassar *et al.* 1999; Vassar 2001]. Die Proteolyse erfolgt wie auch die Prozessierung durch die α -Sekretase im TGN, im späten Golgi und der Plasmamembran, kann aber auch in Endosomen stattfinden [Ehehalt *et al.* 2003; Vassar *et al.* 1999; Walter *et al.* 2001]. BACE1 stellt die hauptsächliche β -Sekretase *in vivo* dar [Cai *et al.* 2001; Luo, Y. *et al.* 2001; Hussain *et al.* 1999].

Obwohl die BACE1 Expression im Laufe der Alterung konstant blieb, konnte ein starker Anstieg der β -Sekretase-Aktivität verzeichnet werden (vgl. Abbildungen 3.15 und 3.16). Besonders hoch war der Anstieg der Aktivitäten in normalen humanen Fibroblasten (ca. 60%), während in den FAD-, DS- und NPC-Fibroblasten der Anstieg etwas niedriger ausfiel (ca. 30%). Fukumoto *et al.* konnten zeigen, dass im Gehirn gealterter Affen, Mäusen und Menschen eine erhöhte β -Sekretase-Aktivität bei konstanter Expression von BACE1 vorhanden ist [Fukumoto *et al.* 2004]. Die gesteigerte β -Sekretase-Aktivität führte jedoch nicht zu der erwarteten Zunahme der intra- (C99) und extrazellulären (sAPP β) Spaltprodukte (vgl. Abbildungen 3.11 und 3.12).

Die β -Sekretase liegt zum Teil mit Lipid Rafts assoziiert vor [Ehehalt *et al.* 2003; Simons *et al.* 1998; Simons *et al.*; Lee *et al.* 1998], während die α -Sekretase aus diesen Detergens-resistenten Membranbereichen (DRMs) ausgeschlossen zu sein scheint [Kojro *et al.* 2001; Simons *et al.* 2001]. Es wurde lange angenommen, dass eine Anreicherung von Lipid Rafts in der Membran zu einem verstärkten amyloidogenen Abbau führt [Fassbender *et al.* 2001; Racchi *et al.* 1997; Simons *et al.* 1998; Sawamura *et al.* 2004]. Im Gegensatz dazu konnte jedoch gezeigt werden, dass eine moderate Verringerung des Cholesterinspiegels in Membranen zu einer Erhöhung der BACE1-APP Kolokalisation führt und es dabei zu einer verstärkten Produktion von A β kommt [Abad-Rodriguez *et al.* 2004; Kaether & Haass 2004]. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass APP nicht in DRMs vorliegt, während die Sekretasen des amyloiden Abbauweges, die β - und γ -Sekretasen, mit Lipid Rafts assoziiert sind.

Bei der Analyse der Lipid Rafts konnte gezeigt werden, dass BACE1 im Zuge der Alterung von der Lipid Rafts-Fraktion in die Nicht-Raft-Fraktion migrierte (vgl. Abbildung 3.18) und auch die β -Sekretase-Aktivität verschob sich in seneszenten Zellen in den Nicht-Raft-Bereich

(vgl. Abbildung 3.19). Cholesterin und Caveolin1 migrierten im Alter ebenfalls die die Nicht-Raft-Fraktion (vgl. Abbildung 3.10). Dieses Ergebnis legt nahe, dass Lipid Rafts in seneszenten Zellen vermutlich in geringeren Gesamtmengen auftreten.

Die Zunahme der β -Sekretase-Aktivität führte jedoch nicht zu einer Zunahme von C99 und sAPP β . Dies könnte auf die geringen Spiegel von APP in seneszenten Zellen zurück zu führen sein. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass BACE1 nicht mehr genügend mit APP binden kann. Das kann zum einem durch post-translationale Modifikationen der Fall sein oder durch eine allosterische Hemmung des Enzyms, z. B. über die Kupfer-Bindungsstelle in der C-terminalen Domäne von BACE1 [Angeletti *et al.* 2005]. Bis jetzt ist nur wenig über die Enzym-Substrat-Erkennung von APP und BACE1 bekannt. Naiverweise wurde angenommen, dass eine erhöhte β -Sekretase-Aktivität auch eine erhöhte A β -Produktion nach sich zieht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine moderate BACE1 Überexprimierung in Mäusen zum erwarteten Anstieg von A β führt, eine hohe Überexprimierung jedoch zu einer Abnahme der A β -Spiegel [Lee *et al.* 2005]. Weitere mögliche Einflüsse auf die β -Sekretase-Aktivität werden unter 4.5 diskutiert.

4.3.2.3 Die γ -Sekretase

Die durch die α - bzw. β -Sekretase entstandenen C-terminalen Fragmente C83 und C99 werden von der γ -Sekretase erneut gespalten, woraus im Falle von C99 das A β -Peptid resultiert (siehe 1.3.1.1). Die γ -Sekretase ist ebenso wie die β -Sekretase in Lipid Rafts lokalisiert [Ehehalt *et al.* 2003; Wada *et al.* 2003] und besteht aus Nicastrin, Pen-1, APH-1 und den Presenilinen PS1 und PS2. Nicastrin benötigt die Preseniline, um auf den sekretorischen Weg zur Plasmamembran zu gelangen, während Nicastrin im Gegenzug den Presenilinen als stabilisierender Faktor dient [Edbauer *et al.* 2002].

Im Laufe der zellulären Alterung wurden in allen untersuchten Zelllinien reduzierte PS1- und Nicastrin-Spiegel detektiert (vgl. Abbildung 3.19), was mit einer allgemeinen Verringerung des γ -Sekretase-Komplexes einherging. Die verminderten γ -Sekretasespiegel führten wiederum zu einer Abnahme der γ -Sekretase-Aktivität (vgl. Abbildung 3.20). Die erniedrigten Proteinspiegel könnten dadurch zu erklären sein, dass durch die Reduktion des Nicastrinspiegels die Preseniline nicht mehr genügend stabilisiert werden und somit der gesamte γ -Sekretase-Komplex instabil wird und schneller vom Proteasom abgebaut wird.

Auch stellen die Preseniline die katalytisch aktive Untereinheit des Komplexes dar [Francis *et al.* 2002]. Durch den Stabilitätsverlust können PS1 und PS2 ihre katalytische Aktivität womöglich nicht mehr aufrechterhalten, was eine Abnahme der γ -Sekretase-Aktivität nach sich ziehen würde.

Die Untersuchung der Lipid Rafts zeigte keine Lokalisationsunterschiede der γ -Sekretase-Aktivität im Vergleich junge zu seneszenten Zellen (vgl. Abbildung 3.21). Schon in jungen Zellen war sowohl in Lipid Rafts als auch in der Nicht-Raft-Fraktion eine γ -Sekretase-Aktivität festzustellen. Für ein anderes γ -Sekretase-Substrat, Notch, ist bekannt, dass die Spaltung außerhalb von Lipid Rafts erfolgt [Vetrivel *et al.* 2005]. Daher ist die gemessene Aktivität nicht zwangsläufig mit Lipid Rafts assoziiert.

Zusammenfassend konnte für die γ -Sekretase festgestellt werden, dass es aufgrund der verringerten Proteinspiegel zu einer Abnahme der Enzymaktivität kommt. Die reduzierten Mengen der intrazellulären Spaltfragmente von APP, C99 und C83 beruhen daher nicht auf einem gesteigerten Abbau aufgrund verstärkter Prozessierung durch die γ -Sekretase.

4.4 Der Einfluss von SIRT1 auf die α -Sekretase-Aktivität in IMR90-Fibroblasten

Die Analyse der α -Sekretase-Aktivitäten zeigte eine deutliche Abnahme im Laufe der zellulären Alterung (vgl. Abbildung 3.14), obwohl die Proteinspiegel von ADAM10 konstant blieben (vgl. Abbildung 3.13). Wie unter 1.7 erläutert, gibt es einen Zusammenhang zwischen ADAM10-Expression und SIRT1-Aktivierung. Durch Kalorienrestriktion (CR) bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass die SIRT1-Expression zunahm und diese Erhöhung von SIRT 1 zu einer Steigerung der α -Sekretase-Aktivität führte [Qin *et al.* 2006 b]. Dies lief vermutlich über eine Abnahme von der Rho-Kinase ROCK1 [Pedrini *et al.* 2005; Qin *et al.* 2006 a].

Daher wurde auch die SIRT1-Expression im Laufe der Alterung bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von SIRT1 altersabhängig reduziert wurde (vgl. Abbildung 3.22). Die Inhibition von SIRT1 mit Sirtinol führte in seneszenten IMR90-Zellen zu einer signifikanten Abnahme der α -Sekretase-Aktivität (vgl. Abbildung 3.23). Dies könnte damit

erklärt werden, dass in seneszenten Zellen weniger SIRT1 vorhanden ist als in jungen Fibroblasten und daher eine Inhibition von SIRT1 stärker ins Gewicht fällt.

Bei der Analyse der Proteinspiegel wurden keine Änderungen in der Reifung von APP weder in jungen noch in seneszenten Zellen festgestellt. In seneszenten Zellen kam es trotz der signifikanten Abnahme der α -Sekretase-Aktivität nicht zu einer veränderten Produktion der intrazellulären Spaltprodukte, während in jungen Zellen das intrazelluläre Spaltprodukt C83 reduziert vorlag (vgl. Abbildung 3.24 A). Auch zeigten die extrazellulären Spaltfragmente in jungen Zellen eine starke Verringerung von sAPP α bei gleich bleibenden sAPP-Spiegeln. Dies lässt auf eine verstärkte Prozessierung durch die β -Sekretase schließen. Seneszente Zellen dagegen zeigten zwar eine Abnahme von sAPP α , die jedoch nicht signifikant war. Auch hier blieb die Expression von sAPP konstant (vgl. Abbildung 3.25). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine SIRT1-Inhibition womöglich einen stärkeren Einfluss auf die APP-Prozessierung junger Zellen hat als auf die Prozessierung in seneszenten Zellen.

Im Gegensatz zur SIRT1-Inhibition zeigte die Hemmung der Rho-Kinase ROCK1 durch Y27632 eine Aktivierung der α -Sekretase-Aktivität sowohl in jungen als auch in seneszenten IMR90-Fibroblasten um 30 bzw. 35% (vgl. Abbildung 3.26). Diese gesteigerte Aktivität hatte jedoch keinen Einfluss auf die nicht-amyloidogene Prozessierung, da die APP-CTF-Proteinspiegel unverändert blieben (vgl. Abbildung 3.27).

Ob die SIRT1- bzw. ROCK1-Inhibition einen Einfluss auf die A β -Produktion hat, der sich womöglich nicht in geänderten Spiegeln der Spaltprodukte niederschlägt, konnte mit den verwendeten Zellen nicht quantifiziert werden. APP liegt in Fibroblasten endogen und daher nur in geringen Konzentrationen vor. Deshalb es war nicht möglich, A β - Spiegel zu messen und dadurch eine endgültige Aussage zum Einfluss von SIRT1 auf die APP-Prozessierung zu treffen. Dies muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

4.5 Weiterführende Analysen der β -Sekretase-Aktivität in IMR90-Fibroblasten

Die β -Sekretase-Aktivität nahm in gealterten Zellen zu, während die Proteinspiegel unverändert bleiben (siehe 4.3.2.2). Interessanterweise konnte in jungen IMR90-Fibroblasten nach Behandlung mit dem konditionierten Medium seneszenter IMR90-Zellen ein Anstieg der

β -Sekretase-Aktivität verzeichnet werden (vgl. Abbildung 3.28). Weder auf Proteinebene (Daten nicht gezeigt) noch auf mRNA-Ebene konnte eine Änderung der Expression festgestellt werden (vgl. Abbildung 3.29). Auch bei der Analyse der APP-Prozessierung mittels Western Blot wurde trotz der erhöhten β -Sekretase-Aktivität der behandelten jungen Zellen kein Unterschied zu den unbehandelten jungen Zellen gefunden. Diese Ergebnisse ließen sich auch auf neuronale Zellen übertragen (vgl. Abbildung 3.31). Es stellte sich die Frage, welche weiteren Faktoren einen Einfluss auf die β -Sekretase-Aktivität ausüben könnten.

4.5.1 Der Einfluss von Aphidicolin auf die β -Sekretase-Aktivität

Zellen, die durch Konfluenz einem Zellzyklus-Arrest unterliegen, wiesen eine erhöhte β -Sekretase-Aktivität auf (Daten nicht gezeigt). Daher wurde ein möglicher Einfluss des Zellzyklus auf die β -Sekretase-Aktivität vermutet.

Um diese These zu überprüfen wurden IMR90-Fibroblasten mit dem Zellzyklus-Inhibitor Aphidicolin behandelt. In jungen IMR90-Fibroblasten führte der induzierte Proliferationsstopp zu einer signifikanten Erhöhung der β -Sekretase-Aktivität, während es wie erwartet in seneszenten Zellen zu keinem Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen kommt (vgl. Abbildung 3.32). Die Expression von BACE1 blieb dabei in allen Zellen konstant (vgl. Abbildung 3.33). Diese Ergebnisse konnten auch in den neuronalen Zellen N2a bestätigt werden (vgl. Abbildung 3.34).

Dieser Einfluss der Zellzyklus-Regulation auf die β -Sekretase-Aktivität könnte durch mögliche Änderungen in der Phosphorylierung oder Glykosylierung erklärt werden. Kürzlich wurde mit Pin1 ein Bestandteil des regulatorischen Zellzyklus mit Alzheimer in Verbindung gebracht. Das Enzym Pin1, eine so genannte Prolyl-Isomerase, war bislang als wichtiges Protein des Zellkerns bekannt, welches den Eintritt und das Fortschreiten der mitotischen Zellteilung steuert. Es konnte gezeigt werden, dass Pin1 für die richtige Konformation von Tau und APP verantwortlich ist, die Pin1-Aktivität in AD allerdings dereguliert ist [Pastorino *et al.* 2006]. Der genaue Einfluss von Komponenten des Zellzyklus auf die β -Sekretase Aktivität und die APP-Prozessierung muss in zukünftigen Studien näher analysiert werden.

4.5.2 Der Einfluss von Zytokinen auf die β -Sekretase-Aktivität

Eine weitere Möglichkeit, durch die die β -Sekretase-Aktivität beeinflussen werden könnte, sind Faktoren, die von seneszenten Zellen ins Medium sezerniert werden. Dazu gehören auch Zytokine, die schon in vielen Studien mit der Alzheimer Erkrankung in Verbindung gebracht wurden (siehe zur Übersicht [McGeer, E. G. & McGeer 2003]). IL6 konnte z. B. schon vor Ausbruch der Alzheimer Erkrankung in Plaques im Gehirn nachgewiesen werden [Hull *et al.* 1996]. IFN γ kann zusammen mit TNF α die Produktion von A β verstärken und dabei die Sekretion von sAPP α inhibieren [Blasko *et al.* 1999]. IFN α gehört zu den anti-inflammatorischen Typ I Interferonen. Eine Abnahme von IFN α wird mit der lokalen CNS Entzündung bei der Alzheimer Erkrankung in Verbindung gebracht [An *et al.* 1994; Brod 2000].

Die Behandlung IMR90-Fibroblasten mit IFN α , IFN γ bzw. IL6 zeigte in seneszenten Zellen keine Änderung der β -Sekretase-Aktivität, während in jungen Zellen bei Zugabe von IFN α und IL6 eine signifikante Zunahme der Aktivität zu verzeichnen war. Welchen Einfluss diese Aktivitätserhöhung auf die APP-Prozessierung hatte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr quantifiziert werden. Vorläufige Untersuchungen der Proteinexpressionen zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse. Der Zusammenhang zwischen IFN α bzw. IL6 und erhöhten β -Sekretase-Aktivitäten muss in zukünftigen Studien weiter erforscht werden.

4.6 Relevanz der Ergebnisse bezüglich der APP-Pathologie und Ausblick

Das Alter gilt als größter Risikofaktor, an einer Alzheimer-Demenz zu erkranken. Um neue, effektive Therapien zu entwickeln, ist das Verständnis zellulärer Mechanismen der Pathogenese eine Grundvoraussetzung. Ein mit entscheidender Schritt bei der Entstehung der Alzheimer Erkrankung ist die Produktion des A β -Peptids, welches durch Prozessierung das amyloiden Vorläuferproteins APP entsteht [Haass, C. 2004]. Warum es schließlich im Alter zur vermehrten Produktion von A β kommt, ist bis heute nicht genau geklärt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es im Zuge der zellulären Alterung zu einer Verringerung der APP-Prozessierung kommt. Diese Abnahme der APP-Prozessierung scheint ein genereller Mechanismus zu sein, da der genetische Hintergrund der untersuchten Fibroblasten keinen Einfluss auf die altersassoziierte Prozessierung hatte. Daher lässt sich die

gesteigerte A β -Konzentration im Gehirn möglicherweise nicht auf eine erhöhte APP-Prozessierung zurückführen. Die altersabhängig erhöhte Cholesterinmenge hat ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die APP-Reifung und die Aktivität der beteiligten Sekretasen.

Obwohl die β -Sekretase-Aktivität in seneszenten Zellen signifikant erhöht war, wurde keine verstärkte APP-Prozessierung durch BACE1 beobachtet. Die α -Sekretase-Aktivität wiederum war in seneszenten Zellen erniedrigt, was aber nicht zu einer verstärkten Prozessierung durch die β -Sekretase führte. Durch die weiteren Untersuchungen zur α - und β -Sekretase-Aktivität konnte gezeigt werden, dass hier mehrere verschiedene Faktoren, wie z. B. Sirtuine, inflammatorische Zytokine oder die Regulation des Zellzyklus einen Einfluss auf die Aktivität haben können. Auch sind Änderungen in der Enzym-Substrat-Bindung oder eine mögliche allosterische Hemmung des Enzyms denkbar. Des Weiteren sind für BACE1 auch andere Substrate bekannt, wie z. B. LRP („low-density lipoprotein receptor-related protein“) [von Arnim *et al.* 2005], die Sialyltransferase ST6Gal-I [Kitazume *et al.* 2001], APLP1 oder APLP2 [Li, Q. & Südhof 2004; Pastorino *et al.* 2004]. Eventuell hat die erhöhte β -Sekretase-Aktivität bei diesen Substraten einen stärkeren Einfluss als auf APP. Um eine vollständige Aussage der altersassoziierten Veränderungen von BACE1 machen zu können, müssen diese Substrate bei weiteren Studien ebenfalls analysiert werden

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine veränderte Biochemie von APP bei zellulärer Alterung auf, die auch in Fibroblasten von NPC, Trisomie 21 und FAD gleich verläuft. Diese Erkenntnisse geben einen neuen Einblick in die Pathobiochemie der Alzheimer Erkrankung und können somit zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen, die an die veränderte APP-Prozessierung im Alter angepasst sind.

5 Zusammenfassung

In unserer alternden Gesellschaft stellen neurodegenerative Krankheiten eine große Herausforderung für die medizinische Forschung dar. Grundlage für die Entwicklung neuer effektiver Therapieansätze ist das Verständnis zellulärer Mechanismen der Pathogenese dieser Krankheiten. Hierbei ist es von großer Bedeutung, ob es zu grundlegenden Änderungen biochemischer Prozesse im Zuge der Alterung kommt. Die am häufigsten auftretende altersassoziierte neurodegenerative Krankheit ist die Alzheimer Demenz. Ein mit entscheidender Schritt bei der Entstehung der Alzheimer Erkrankung ist wahrscheinlich die Produktion des A β -Peptids durch proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins APP.

In der vorliegenden Arbeit wurde die altersabhängige Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) in Fibroblasten von Hautbiopsien von Familiärer Alzheimer-, Trisomie 21- und Niemann-Pick Typ C-Krankheit untersucht. Seit Hayflick und Moorhead entdeckten, dass Fibroblasten nur eine limitierte Anzahl von Populationsverdopplungen (PDLs) durchlaufen, bevor sie einem Proliferationsstopp unterliegen, stellen diese ein weit verbreitetes Modell zur Untersuchung von Alterungsvorgängen *in vitro* dar. In der Phase des irreversiblen Wachstumsstopps bleiben die Zellen weiterhin intakt und metabolisch aktiv. Die in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten wurden bis zum Erreichen des zellulären Wachstumsstopps (replikative Seneszenz) seriell passagiert und die Untersuchungen erfolgten an Zellen aufsteigender PDL. Dabei zeigte sich, dass, unabhängig von dem durch die Krankheit vorliegenden genetischen biochemischen Hintergrund, die APP-Prozessierung im Laufe der Zellalterung progressiv verringert wird. Die altersabhängig ansteigenden Cholesterinspiegel führten zu einer Reduktion der APP-Reifung und infolge dessen nahmen sowohl die intrazellulären APP-Spaltfragmente (C99, C83 und AICD) als auch die extrazellulären APP-Fragmente (sAPP α , sAPP) ab.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass die γ -Sekretase-Aktivität abnimmt. Dies war verbunden mit einem Rückgang der Proteinspiegel von Nicastrin und Presenilin, beides Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes. Obwohl die Proteinexpression der α -Sekretase ADAM10 altersassoziiert konstant blieb, nahm die α -Sekretase-Aktivität mit steigendem Lebensalter ab. Erste Untersuchungen zeigten, dass die NAD⁺-abhängige Histon-Deacetylase SIRT1 eine wichtige Rolle im Bezug auf die α -Sekretase-Aktivität spielen könnte.

Im Gegensatz zu den Abnahmen der α - und γ -Sekretase-Aktivitäten konnte eine erhöhte Aktivität der β -Sekretase in seneszenten Zellen beobachtet werden. Die mRNA-Menge und Proteinspiegel der β -Sekretase BACE1 blieben dabei unverändert. Des Weiteren zeigte sich eine Zunahme der β -Sekretase-Aktivität bei Behandlung von jungen Zellen mit konditioniertem Medium seneszenten Zellen. Da senescente Zellen einem Proliferationsstopp in der G1-Phase unterliegen, wurde der Einfluss des Zellzyklus-Inhibitors Aphidicolin auf die β -Sekretase untersucht. Hier wurde sowohl in IMR90 Fibroblasten als auch in Neuroblastoma-Zellen N2a eine Zunahme der β -Sekretase-Aktivität nach Zugabe der Inhibitoren beobachtet.

Auch kommt es im Zuge der Alterung zu einer verstärkten Expression inflammatorischer Zytokine, die mit der Entstehung von A β -Peptiden in Verbindung gebracht werden. Deshalb wurde der Einfluss von Zytokinen auf die β -Sekretase-Aktivität untersucht. Die Zugabe von Interferon- γ und Interleukin 6 führte bei jungen IMR90-Zellen zu einem Anstieg der β -Sekretase-Aktivität, während bei alten Zellen keine Änderung zu verzeichnen war.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in allen untersuchten Zelllinien eine altersabhängige Regulation der APP-Reifung und Prozessierung zu verzeichnen ist. Die erhaltenen Daten führen zu einem verbesserten Verständnis der biochemischen Vorgänge im Zuge der Alterung und können dazu beitragen, Medikamente zu entwickeln, die der veränderten Biochemie der Alzheimer Erkrankung im Alter gerecht werden.

6 Abstract

Neurodegenerative diseases are one of the biggest challenges in today's aging society. Understanding the mechanisms involved in the pathogenesis of these diseases is the basis for the development of new therapies and diagnostic methods. Characterizing the age-related changes on a molecular level plays a key role in this task. Alzheimer's Disease (AD) is the most common neurodegenerative disease. One of the critical steps in its pathogenesis is the cleavage of the amyloid precursor protein (APP) yielding the A β peptide.

This work investigates the age-related processing of APP in fibroblasts from biopsies of familiar AD, Trisomie 21 and Nieman Pick Type C disease. Since Hayflick and Moorhead discovered the limited cell division of fibroblasts, these cells have been used to identify age-related changes in humans at the molecular level. In culture, fibroblasts undergo a limited number of population doubling levels (PDLs) before entering a state of irreversible growth arrest. At this stage the cells remain intact and metabolically active. This infinite nonreplicative state is termed "replicative senescence". The fibroblasts used in this work were sequentially passaged until growth arrest and the APP processing was analyzed throughout the *in vitro* life span of the cultures. The results show a progressive decrease of the APP processing with age irrespective of the investigated disease type. The age-related increase of cholesterol levels resulted in a decrease of APP processing and therefore a reduction of intracellular APP fragments (C99, C83 and ACID) as well as extracellular APP fragments (sAPP α and sAPP).

The study of γ -secretase showed a age-dependent decrease of the APP-processing activity. This went along with reduced protein concentrations of two major components of γ -secretase, namely Nicastrin and Presenilin. The activity of α -secretase showed a decrease as well, while the protein levels of the α -secretase ADAM10 showed no significant changes. First studies showed that the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1 could play an important role referring to α -secretase activity.

In contrast to the decreased α - and γ -secretase activities, β -secretase activity increased with age whereas BACE1 protein levels and mRNA levels remained unchanged. β -secretase activity could be increased by treating young cells with conditioned medium from senescent cells. Senescent cells are known to come to a cell cycle arrest at phase G1. Due to this the

influence of the cell cycle inhibitor Aphidicolin on β -secretase activity was investigated. This resulted in an increase of β -secretase activity in IMR90 fibroblasts and N2a-cells from a neuroblastoma derived cell line.

In the course of cell aging there is an increase of inflammatory cytokines which have been discussed to be involved in Alzheimer's Disease. Addition of the cytokines interferon- γ and interleucine-6 to IMR90-fibroblasts resulted in an increase of β -secretase activities in young cells whereas it didn't had any significant effect on senescent cells.

In summary, an age-related modulation of APP maturing and processing was registered in all investigated cell lines. The resulting increase in the understanding of biochemical processes of cell aging could be the basis for developing therapies that specifically target the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

7 Literatur

Abad-Rodriguez, J., M. D. Ledesma, et al. (2004). "Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation." J Cell Biol **167**(5): 953-960.

Akiyama, H., S. Barger, et al. (2000). "Inflammation and Alzheimer's disease" Neurobiol. Aging **21**: 383-421.

Alberts, B., D. Bray, et al. (1994). "Molecular Biology of the Cell." New York, Garland Publishing.

Alvarez, A., R. Toro, et al. (1999). "Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents β -amyloid-induced neuronal death." FEBS Lett **459**: 421-426.

An, S., K. K. Khanna, et al. (1994). "mRNA levels and methylation patterns of the 2-5A synthetase gene in control and Alzheimer's disease (AD) fibroblasts." Biochem Mol Biol Int **33**(5): 835-40.

Anderson, J., F. Esch, et al. (1991). "Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells." Neurosci Lett **128**: 126-128.

Angeletti, B., K. J. Waldron, et al. (2005). "BACE1 cytoplasmic domain interacts with the copper chaperone for superoxide dismutase-1 and binds copper." J. Biol. Chem. **280**: 17930-7.

Antequera, F. and A. Bird (1993). "CpG islands." Exs **64**: 169-85.

Atadja, P., H. Wong, et al. (1995). "Increased Activity of p53 in Senescing Fibroblasts." PNAS **92**: 8348-8352.

Atamna, H., C. ROBINSON, et al. (2001). "N-t-Butyl hydroxylamine is an antioxidant that reverses age-related changes in mitochondria in vivo and in vitro." FASEB J. **15**(12): 2196-2204.

Behl, C., J. B. Davis, et al. (1994). "Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity." Cell **77**(6): 817-827.

Benvenuti, S., R. Cramer, et al. (2002). "Identification of novel candidates for replicative senescence by functional proteomics." Oncogene **21**: 4403-4413.

Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.

Blander, G. and L. Guarente (2004). "The Sir2 family of protein deacetylases." Annu Rev Biochem **73**: 417-35.

Blasko, I., F. Marx, et al. (1999). "TNF α plus IFN γ induce the production of Alzheimer beta-amyloid peptides and decrease the secretion of APPs." Faseb J **13**: 63.

Blasko, I., F. Marx, et al. (1999). "TNF α plus IFN γ induce the production of Alzheimer

beta-amyloid peptides and decrease the secretion of APPs." Faseb J **13**: 63-68.

Bodovitz, S. and W. L. Klein (1996). "Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein." J. Biol. Chem. **271**: 4436-4440.

Borchelt, D. R., G. Thinakaran, et al. (1996). "Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo." Neuron **17**(5): 1005-13.

Bordone, L. and L. Guarente (2005). "Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(4): 298-305.

Braak, H. and E. Braak (1998). "Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease." J. Neural Transm. Suppl. **53**: 127-140.

Brachmann, C. B., J. M. Sherman, et al. (1995). "The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression and chromosome stability." Genes Dev **9**: 2888-2902.

Braunstein, M., A. B. Rose, et al. (1993). "Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation." Genes Dev **7**: 592-604.

Brod, S. A. (2000). "Upregulated inflammation shortens human functional longevity." Inflamm res **49**: 561-570.

Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1999). "A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood." Proc Natl Acad Sci USA **96**: 11041-11048.

Brunet, A., L. B. Sweeney, et al. (2004). "Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase." Science **303**: 2011-2015.

Burns, M. P., W. J. Noble, et al. (2003). "Co-localization of cholesterol, apolipoprotein E and fibrillar Abeta in amyloid plaques." Brain Res Mol Brain Res **31** **110**(1): 119-125.

Busciglio, J., A. Pelsman, et al. (2002). "Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome." Neuron **33**: 677-688.

Bush, A. I., G. Multhaup, et al. (1993). "A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease." J Biol Chem **268**: 16109-16112.

Buxbaum, J. D., K. N. Liu, et al. (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." J Biol Chem **273**(43): 27765-7.

Cai, H., Y. Wang, et al. (2001). "BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons." Nat Neurosci **4**(3): 233-4.

Campisi, J. (2003). "Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes." Exp Gerontol **38**: 5-11.

- Campisi, J., G. P. Dimri, et al. (1996). "Coming of age in culture." Exp Gerontol **31**(1-2): 7-12.
- Carstea, E. D., J. A. Morris, et al. (1997). "Niemann–Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis." Science **277**(5323): 228-231.
- CHEN, Q. M. (2000). "Replicative Senescence and Oxidant-Induced Premature Senescence. Beyond the Control of Cell Cycle Checkpoints." Ann N Y Acad Sci **908**: 111-125.
- Citron, M. (2002). "Beta-secretase as a target for the treatment of Alzheimer's disease." J. Neurosci Res. **70**: 373-379.
- Citron, M., D. Westaway, et al. (1997). "Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid betaprotein in both transfected cells and transgenic mice." Nat Med **3**: 67-72.
- Clark, S. J., J. Harrison, et al. (1994). "High sensitivity mapping of methylated cytosines." Nucleic Acids Res **22**(15): 2990-7.
- Constancia, M., B. Pickard, et al. (1998). "Imprinting mechanisms." Genome Res **8**(9): 881-900.
- Cordy, J. M., I. Hussain, et al. (2003). "Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11735-40.
- Cristofalo, V. J. (1988). "Cellular biomarkers of aging." Exp Gerontol **23**(4-5): 297-307.
- Cristofalo, V. J., A. Lorenzini, et al. (2004). "Replicative senescence: a critical review." Mechanisms of Ageing and Development **125**: 827-848.
- Cruz, J. C., S. Sugii, et al. (2000). "Role of Niemann-Pick type C1 protein in intracellular trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol." J Biol Chem **275**: 4013-4021.
- Davis, S. and S. Laroche (2003). "What can rodent models tell us about cognitive decline in Alzheimer's disease?" Mol. Neurobiol. **27**: 249-276.
- di Giovine, F. S. and G. W. Duff (1990). "Interleukin 1: the first interleukin." Immunol Today **11**: 13-20.
- Dimri, G. P., X. Lee, et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-7.
- Down, J. H. L. (1866). "Observation on an ethnic classification of idiots." London Hosp. Clin Lect Rep **3**: 259.
- Duff, K., C. Eckman, et al. (1996). "Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1." Nature **383**: 710-713.

Edbauer, D., E. Winkler, et al. (2002). "Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid β -peptide production via complex formation." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **99**: 8666-8671.

Edbauer, D., E. Winkler, et al. (2003). "Reconstitution of gamma-secretase activity." Nat Cell Biol. **5**: 486-488.

Ehehalt, R., P. Keller, et al. (2003). "Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts." J Cell Biol **160**(1): 113-23.

Eikelenboom, P. and W. A. van Gool (2004). "Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease." J. Neural Transm. **111**: 281-294.

Eikelenboom, P., S. S. Zhan, et al. (1994). "Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease." Trends Pharmacol. Sci. **15**: 447-450.

Engelman, J. A., X. L. Zhang, et al. (1999). "Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines." FEBS Lett **448**(2-3): 221-30.

Esch, F. S., P. S. Keim, et al. (1990). "Cleavage of amyloid b peptide during constitutive processing of its precursor." Science **248**: 1122-1124.

Fassbender, K., M. Simons, et al. (2001). "Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5856-5861.

Fielding, C. J. and P. E. Fielding (1997). "Intracellular cholesterol transport." J Lipid Res **38**: 1503-1521.

Flanary, B. and W. Streit (2004). "Progressive telomere shortening occurs in cultured rat microglia, but not astrocytes." Glia **45**: 75-88.

Francis, R., G. McGrath, et al. (2002). "aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation." Dev Cell **3**(1): 85-97.

Frommer, M., L. E. McDonald, et al. (1992). "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1827-31.

Frye, R. A. (1999). "Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity." Biochem Biophys Res Commun **260**: 273-279.

Frye, R. A. (2000). "Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins." Biochem Biophys Res Commun **273**: 793-798.

Fukumoto, H., D. L. Rosene, et al. (2004). "Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain." Am J Pathol **164**(2): 719-25.

- G.G. Glenner, C. W. W. (1984a). "Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein." Biochem. Biophys. Res. Commun. **120**: 1131-1135.
- G.G. Glenner, C. W. W. (1984b). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem. Biophys. Res. Commun. **120**: 885-890.
- Galbete, J. L., T. R. Martin, et al. (2000). "Cholesterol decreases secretion of the secreted form of amyloid precursor protein by interfering with glycosylation in the protein secretory pathway." Biochem J **348 Pt 2**: 307-313.
- Gardiner-Garden, M. and M. Frommer (1987). "CpG islands in vertebrate genomes." J Mol Biol **196**(2): 261-82.
- Gartel, A. L. and S. K. Radhakrishnan (2005). "Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences." Cancer Res **65**(10): 3980-5.
- George, T. and M. D. Capone (2001). "Down Syndrome: Advance in molecular biology and neurosciences." J Dev Behav Pradiatr **22**: 40-59.
- Gibson, U. E., C. A. Heid, et al. (1996). "A novel method for real time quantitative RT-PCR. 10.1101/gr.6.10.995." Genome Res. **6**(10): 995-1001.
- Goate, A., M.-C. Chartier-Harlin, et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." Nature **349**: 704-706.
- Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M. G., Hasegawa, M., Smith, M. J. und Crowther, R. and A. (1996). "Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans." Nature **383**: 550-3.
- Goldstein, S. (1990). "Replicative senescence: The human fibroblast comes of age." Science **249**: 1129-1133.
- Goutte, C. (2002). "Genetics leads the way to the accomplices of presenilins." Dev Cell **3**(1): 6-7.
- Gray, S. G. and T. J. Ekström (2001). "The human histone deacetylase family." Exp. Cell Res. **262**: 75-83.
- Gruenbaum, Y., H. Cedar, et al. (1982). "Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase." Nature **295**(5850): 620-2.
- Grunau, C., S. J. Clark, et al. (2001). "Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters." Nucleic Acids Res **29**(13): E65-5.
- Guarente, L. (2000). "Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging." Genes Dev **14**(9): 1021-6.

- Haass, C. (2004). "Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation." Embo J **23**: 483-488.
- Haass, C. and D. Selkoe (1993). "Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. ." Cell **75**: 1039-1042.
- Haass, C. and H. Steiner (2002). "Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases." Trends Cell Biol **12**(12): 556-62.
- Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**: 353-356.
- Hardy J. , S. D. J. (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**: 353-356.
- Hartmann, T. (1999). "Intracellular biology of Alzheimer's disease amyloid beta peptide." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **249**: 291-298.
- Hayflick, L. (1965). "The limited in vitro life time of human diploid cell strains." Exp Cell Res **37**: 614-636.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.
- Hesse, L., D. Beher, et al. (1994). "The [beta]A4 amyloid precursor protein binding to copper." FEBS Lett **349**: 109-116.
- Higgins, J. J., M. C. Patterson, et al. (1992). "A clinical staging classification for type C Niemann-Pick disease." Neurology **1992**(42).
- Howlett, D. R., D. L. Simmons, et al. (2000). "In search of an enzyme: the beta-secretase of Alzheimer's disease is an aspartic proteinase." Trends Neurosci **23**(11): 565-70.
- Hull, M., S. Strauss, et al. (1996). "Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease." Eur Arch Psych & Clin Neurosci **246**: 124.
- Hung, A. Y. and D. J. Selkoe (1994). "Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein." EMBO J **13**: 534-542.
- Hussain, I., D. Powell, et al. (1999). " Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. ." Mol. Cell Neurosci. **14**: 419-427.
- Iqbal, K., del C. Alonso, A., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C.-X., and S. Khatoon, Li, B., Liu, F. und Rahman, A. (2005). "Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1739**: 198-210.
- Iwatsubo, T., D. M. A. Mann, et al. (1995). "Amyloid β protein ($A\beta$) deposition: β 42(43) precedes $A\beta$ 40 in Down syndrome." Ann Neurol **37**: 294-299.

- Jarrett, J. T., E. P. Berger, et al. (1993). "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." Biochemistry **32**(18): 4693-4697.
- Kaether, C. and C. Haass (2004). "A lipid boundary separates APP and secretases and limits amyloid beta-peptide generation." J Cell Biol **167**(5): 809-812.
- Kalvodova, L., N. Kahya, et al. (2005). "Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro." J Biol Chem **280**(44): 36815-23.
- Kang, J., H.G. Lemaire, A. Unterbeck, et al. (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." Nature **325**(733-736).
- Katzman, R. (1986). "Differential diagnosis of dementing illnesses." Neurol Clin **4**: 329-340.
- Kenyon, C. (2005). "The Plasticity of Aging: Insights from Long-Lived Mutants." cell **120**: 449-460.
- Kern, A., B. Roempp, et al. (2006). "Down-regulation of endogenous amyloid precursor protein processing due to cellular aging." J Biol Chem **281**(5): 2405-13.
- Kitazume, S., Y. Tachida, et al. (2001). "Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resistant sialyltransferase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 13554-13559.
- Klebe, R. J. and F. H. Ruddle (1969). "Neuroblastoma: cell culture analysis of a differentiating stem cell system." Journal of Cell Biology **43**(69a).
- Koike, H., S. Tomioka, et al. (1999). "Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein." Biochem J **343 Pt 2**: 371-5.
- Kojro, E., G. Gimpl, et al. (2001). "Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **98**: 5815-5820.
- Koo, E. H. and S. L. Squazzo (1994). "Evidence that production and release of amyloid β -protein involves the endocytic pathway." J Biol Chem **269**: 17386-17389.
- Kopan, R. and A. Goate (2002). "Aph-2/Nicastrin: an essential component of γ -secretase and regulator of Notch signaling and Presenilin localization." Neuron. **33**: 321-324.
- Krtolica, A. and J. Campisi (2002). "Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma." Int. J. Biochem. Cell Biol. **34**: 1401-1414.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.
- LaFerla, F. (2002). "Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **3**: 862-872.

- Lammich, S., E. Kojro, et al. (1999). "Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3922-7.
- Langley, E., M. Pearson, et al. (2002). "Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence." Embo J **21**: 2383-2396.
- Larsen, F., G. Gundersen, et al. (1992). "Choice of enzymes for mapping based on CpG islands in the human genome." Genet Anal Tech Appl **9**(3): 80-5.
- Lee, E. B., B. Zhang, et al. (2005). "BACE overexpression alters the subcellular processing of APP and inhibits Abeta deposition in vivo." J Cell Biol **168**: 291-302.
- Lee, S. J., U. Liyanage, Bickel, P. E., et al. (1998). "A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo." Nat Med **4**(6): 730-734.
- Levy-Lahad, E., W. Wasco, et al. (1995). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." Science **269**(5226): 973-7.
- Levy-Lahad, E., E. M. Wijsman, et al. (1995). "A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1." Science **269**(5226): 970-3.
- Li, E. (2002). "Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development." Nat Rev Genet **3**(9): 662-673.
- Li, Q. and T. C. Südhof (2004). "Cleavage of amyloid-beta precursor-like protein by BACE1." J Biol Chem **279**: 10542-10550.
- Lichtenthaler, S. F. and C. Haass (2004). "Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model." J Clin Invest **113**(10): 1384-7.
- Lin, S. J., P. A. Defossez, et al. (2000). "Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*." Science **289**: 2126-2128.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Luo, J., A. Y. Nikolaev, et al. (2001). "Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress." Cell **107**(2): 137-48.
- Luo, W. J., H. Wang, et al. (2003). "PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1." J Biol Chem **278**(10): 7850-4.
- Luo, Y., B. Bolon, et al. (2001). "Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation." Nat Neurosci **4**(3): 231-2.
- Maccioni, R. B., J. P. Munoz, et al. (2001). "The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders"
" Arch Med Res

32: 367-381.

Maruyama, K., F. Kematani, et al. (1991). "Secretase. Alzheimer amyloid protein precursor secreting enzyme is not sequence-specific." Biochem. Biophys. Res. Commun. **179**: 1670-1676.

Mattson, M. P., W. Duan, et al. (2003). "Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms." J Neurochem **84**: 417-431.

Maurer, K., R. Ihl, et al. (1993). "Alzheimer. Grundlagen, Diagnostik, Therapie." Springer Verlag, Berlin, heidelberg, New York.

Maynard, C. J., R. Cappai, et al. (2002). "Overexpression of Alzheimer's Disease Amyloid-beta Opposes the Age-dependent Elevations of Brain Copper and Iron." J Biol Chem **277**: 44670-44676.

McGeer, E. G. and P. L. McGeer (2003). "Inflammatory processes in Alzheimer's disease." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **27**(5): 741-9.

McGeer, P. L. and E. G. McGeer (1995). "The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases." Brain. Res. Brain Res. Rev **21**: 195-218.

Milward, E. A., R. Papadopoulos, et al. (1992). "The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth." Neuron **9**: 129-137.

Naureckiene, S., D. E. Sleat, et al. (2000). "Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease." Science **290**: 2298-2301.

Nee, L. E., R. J. Polinsky, et al. (1983). "A family with histologically confirmed Alzheimer's disease." Arch Neurol **40**(4): 203-208.

Nichols, W. W. (1977). "Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90 " Science **196**(4285): 60-63.

Nishimoto, I., T. Okamoto, et al. (1993). "Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o)." Nature **362**: 75-79.

Nixon, R. A. (2004). "Niemann-Pick Type C Disease and Alzheimer's Disease: The APP-Endosome connection fattens up." Am J Pathol **164**(3): 975-985.

North, B. J. and E. Verdin (2004). "Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases." Genome Biol **5**: 224.

Ott, A., M. M. Breteler, et al. (1995). "Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study." BMJ. **310**(6985): 970-973.

Park, W. Y., J. S. Park, et al. (2000). "Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells." J Biol Chem **275**(27): 20847-52.

Parvathy, S., I. Hussain, et al. (1999). "Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a-secretase occurs at the surface of neuronal cells." Biochemistry **38**: 9728-9734.

Parvathy, S., E. H. Karran, et al. (1998). "The secretases that cleave angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein are distinct from tumour necrosis factor-alpha convertase." FEBS Lett **431**(1): 63-5.

Pastorino, L., A. F. Ikin, et al. (2004). "BACE (beta-secretase) modulates the processing of APLP2 in vivo." mol Cell Neurosci **25**: 642-649.

Pastorino, L., A. Sun, et al. (2006). "The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and Amyloid-beta production." Nature **440**: 528-534.

Patel, N. V., M. N. Gordon, et al. (2005). "Calorie restriction attenuates Abeta-deposition in alzheimer transgenic models." Neurobiol Aging **26**: 995-1000.

Patterson, M. C., M. T. Vanier, et al. (2001). "Niemann-Pick disease type C: A lipid Trafficking disorder." The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease **8th Edition**(3): 3611-3633.

Pedrini, S., T. L. Carter, et al. (2005). "Modulation of statin-activated shedding of Alzheimer APP ectodomain by ROCK." PLoS Med. **2**: e18.

Peterson, C., R. R. Ratan, et al. (1986). "Cytosolic Free Calcium and Cell Spreading Decrease in Fibroblasts from Aged and Alzheimer Donors." PNAS **83**(20): 7999-8001.

Pietrzik, C. and C. Behl (2005). "Concepts for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanisms and clinical application." Int. J. Exp. Path. **86**: 173-185.

Postina, R., A. Schroeder, et al. (2004). "A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model." J. Clin. Invest. **113**: 1456-1464.

Qin, W., M. Chachich, et al. (2006 a). "Calorie restriction attenuates Alzheimer's disease type brain amyloidosis in Squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*)." J Alzheimers Dis **10**(4): 417-22.

Qin, W., T. Yang, et al. (2006 b). "Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction." J Biol Chem **281**(31): 21745-54.

Racchi, M., R. Baetta, et al. (1997). "Secretory processing of amyloid precursor protein is inhibited by increase in cellular cholesterol content." Biochem. J. **322**: 893-898.

Reik, W. and W. Dean (2001). "DNA methylation and mammalian epigenetics." Electrophoresis **22**(14): 2838-43.

Reinhard, C., S. S. Hebert, et al. (2005). "The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function." T Embo J **24**: 3996-4006.

- Rheinwald, J. G. and H. Green (1975). "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells." Cell **6**: 331-343.
- Riedel-Heller, S. G., A. Busse, et al. (2001). "Prevalence of dementia according to DSM-III-R and ICD-10: results of the Leipzig Longitudinal Study of the Aged (LEILA75+) Part 1." Br J Psychiatry **179**: 250-254.
- Roberds, S. L., J. Anderson, et al. (2001). "BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics." Hum Mol Genet **10**(12): 1317-24.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." New York: Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandbrink, R., C. L. Masters, et al. (1994). "Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4-amyloid protein precursor-like proteins." J Biol Chem **269**: 14227-14234.
- Sauve, A. A., C. Wolberger, et al. (2006). "The biochemistry of sirtuins." Annu Rev Biochem **75**: 435-465.
- Sawamura, N., M. Ko, et al. (2004). "Modulation of amyloid precursor protein cleavage by cellular sphingolipids." J Biol Chem **279**(12): 11984-11991.
- Schmidtke, K. (2005). "Demenzen." Neurologie. Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis (Urban & Fischer bei Elsevier): 662-681.
- Schubert, D., L. W. Jin, et al. (1989). "The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion." Neuron **3**: 689-694.
- Selkoe, D. J. (1994). "Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease." Annu Rev Cell Biol **10**: 373-403.
- Selkoe, D. J. (1996). "Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease." J Biol Chem **271**: 18295-18298.
- Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy." Physiol. Rev. **81**(2): 741-766.
- Selkoe, D. J. (2004). "Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies." Ann. Intern Med. **140**: 627-638.
- Selkoe, D. J., M. B. Podlisny, et al. (1988). "Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **85**: 7341-7345.
- Sherrington, R., E. I. Rogaev, et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." Nature **375**(6534): 754-60.
- Simons, M., P. Keller, et al. (1998). "Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6460-6464.

Simons, M., P. Keller, et al. (2001). "Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link?" Neurology **57**(6): 1089-1093.

Sinha, S. and I. Lieberburg (1999). "Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11049-11053.

Sisodia, S. S. and P. H. St George-Hyslop (2002). "gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? ." Nat Rev Neurosci. **3**: 281-290.

Sitte, N., K. Merker, et al. (2000). "Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II- aging of nondividing cells." Faseb J **14**: 2503-2510.

Smart, E. J., Y. Ying, et al. (1996). "A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane." J Biol Chem **271**(46): 29427-35.

Smith, J. S., C. B. Brachmann, et al. (2000). A phylogenetically conserved NAD⁺- dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. Proc Natl Acad Sci U S A. **97**: 6658-6663.

Smith, P. K., R. I. Krohn, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal. Biochem. **150**: 76-85.

St. George-Hyslop, P. H. (2000). "Molecular genetics of Alzheimer's disease." Biol Psychiatry **47**: 183-199.

Stan, R. V. (2005). "Structure of caveolae." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1746**: 334-348.

Suzuki, N., T. T. Cheung , et al. (1994). "An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants." Science **264**(1336-1340).

Tamboli, I. Y., K. Prager, et al. (2005). "Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis reduces secretion of the beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide." J Biol Chem **280**: 28110-28117.

Tan, J., T. Town, et al. (1999). "Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation." Science **286**: 2352-2355.

Taylor, S. M. and P. A. Jones (1979). "Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine." Cell **17**(4): 771-9.

Terry, R., E. Masliah, et al. (1999). "The Neuropathology of Alzheimer Disease and the Structural Basis of Its Cognitive Alterations " In: Alzheimer Disease (Terry RD, Katzman R, Bick KL, Sisodia S, eds), Lippincott Williams & Wilkins: 187-206.

Tissenbaum, H. A. and L. Guarente (2001). "Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." Nature **410**: 227-230.

- Tomita, S., Y. Kirino, et al. (1998). "Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism." J Biol Chem **273**: 6277-6284.
- Trougakos, I. P., A. Saridaki, et al. (2006). "Identification of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibroblasts." Mech Ageing Dev **127**(1): 88-92.
- Van Damme, J., G. Opdenakker, et al. (1985). "Stimulation of fibroblast interferon production by a 22K protein from human leukocytes." J. gen. Virol. **66**: 693-700.
- Vassar, R. (2001). "The beta-secretase, bace: a prime drug target for alzheimer's disease." J. Mol. Neurosci. **17**(2): 175-170.
- Vassar, R., B. D. Bennett, et al. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." Science **286**(5440): 735-41.
- Vassar, R. and M. Citron (2000). "Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research " Neuron **27**: 419-422.
- Vaziri, H., S. K. Dessain, et al. (2001). "hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase." Cell **107**(2): 149-59.
- Vaziri, H., S. K. Dessain, et al. (2001). "hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase." Cell **107**: 149-159.
- Vetrivel, K. S., H. Cheng, et al. (2005). "Spatial segregation of gamma-secretase and substrates in distinct membrane domains." J Biol Chem **280**: 25892-25900.
- Vetrivel, K. S., H. Cheng, et al. (2004). "Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes." J Biol Chem **279**(43): 44945-54.
- von Arnim, C. A., A. Kinoshita, et al. (2005). "The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate." J Biol Chem **280**: 17777-17785.
- Wächtler, C. (1997). "Demenzen." Thieme Verlag, Stuttgart.
- Wada, S., M. Morishima-Kawashima, et al. (2003). "Gamma-secretase activity is present in rafts but is not cholesterol-dependent." Biochemistry **42**(47): 13977-86.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, et al. (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." Nature **416**: 35-539.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, et al. (2002). "Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition." Biochem. Soc. Trans. **30**: 552-557.
- Walsh, D. M. and D. J. Selkoe (2004). "Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease44, 181–193." Neuron **44**: 181-193.
- Walter, J., R. Fluhrer, et al. (2001). "Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase." J Biol Chem **276**(18): 14634-41.

Wang, J., L. Ho, et al. (2005). "Caloric restriction attenuates beta-amyloid neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease." Faseb J **19**(6): 659-61.

Weidemann, A., G. König, et al. (1989). "Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein." Cell **57**: 115-126.

Wertkin, A. M., R. S. Turner, et al. (1993). "Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 9513-9517.

Wisniewski, K. E., A. J. Dalton, et al. (1985). "Alzheimer's disease in Down syndrome." neurology **35**: 957-961.

Yan, R., M. J. Bienkowski, et al. (1999). "Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity." Nature **402**(6761): 533-7.

Yankner, B., L. Duffy, et al. (1990). "Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides." Science **250**: 279-282.

Zschocke, J., D. Manthey, et al. (2002). "Estrogen Receptor alpha -mediated Silencing of Caveolin Gene Expression in Neuronal Cells." J. Biol. Chem. **277**(41): 38772-38780.

8 Anhang

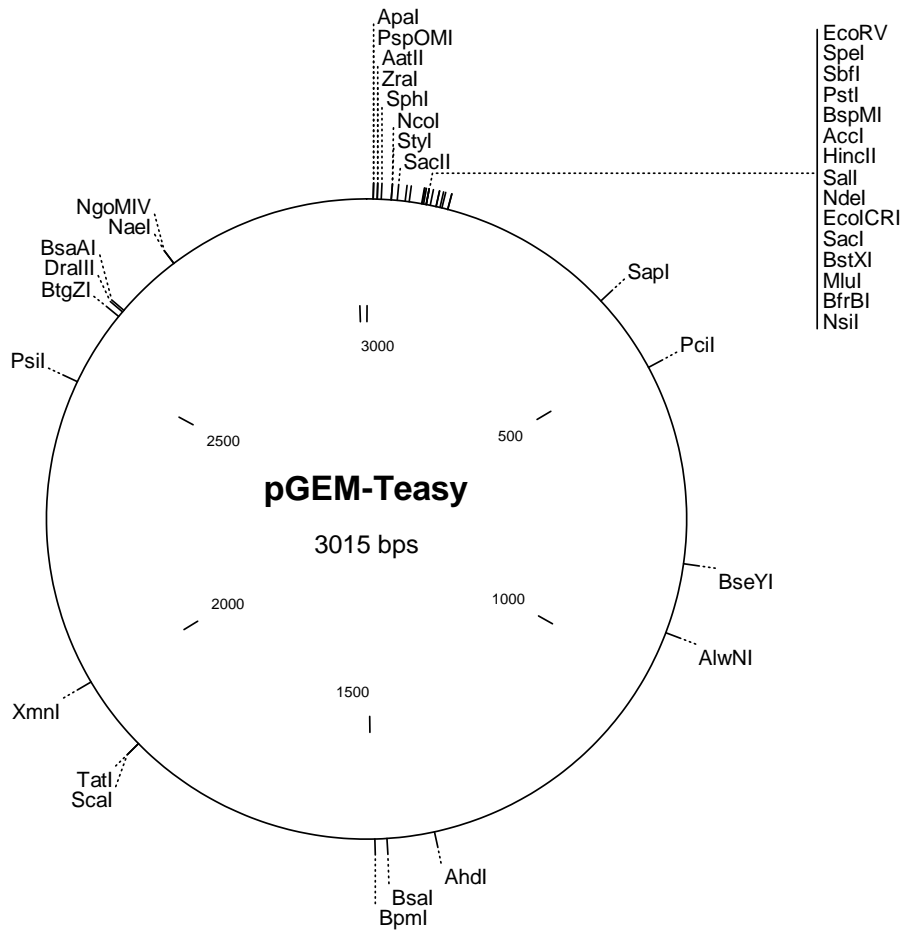
8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aβ₄₀ bzw. 42	Amyloid- β -Peptid bestehend aus 40 bzw. 42 Aminosäuren
AD	Alzheimer Demenz
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
AICD	APP intrazelluläre Domäne
Aph-1	Anterior pharynx defective protein-1
APLP	APP-like protein
APP	Amyloid Precursor Protein, Amyloid-Vorläufer-Protein
sAPPα	soluble alpha APP ectodomain, lösliche APP alpha Ektodomäne
sAPPβ	soluble beta APP ectodomain, lösliche APP beta Ektodomäne
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
Bzw.	beziehungsweise
CR	Kalorienrestriktion
CTF	C-terminales Fragment
CNS	zentrales Nervensystem
dH₂O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagles's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DS	Down Syndrom bzw. Trisomie 21
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FAD	Familiäre Alzheimer-Demenz
FBS	Fetal bovine serum, fötales Rinderserum
g	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
h	hour(s), Stunde(n)

hAPP	humanes APP
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) piperazin-1-ethansulfonsäure
IL6	Interleukin 6
IFNα	Interferon α
IFNγ	Interferon γ
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
min	Minute(n)
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
mRNA	messenger RNA, Boten RNA
NAD⁺	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid
NEXT	Notch extrazelluläre Domäne (<i>Notch extracellular domain</i>)
NICD	Notch intrazelluläre Domäne (<i>Notch intracellular domain</i>)
nM	Nanomolar
NPC	Niemann Pick Typ C Krankheit
NTF	N-terminales Fragment
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDL	Populationsverdopplungsniveau (<i>Population doubling level</i>)
PEN-2	Presenilin enhancer protein
PFA	Paraformaldehyd
PS1,2	Präsenilin1, 2
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)
sec	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
sog.	so genannt(e)
TBS	<i>Tris buffered saline</i>

TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

8.2 Vektordiagramm von pGEM-Teasy



8.3 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.1: Verschiedene Demezformen und ihre Häufigkeit	1
Abbildung 1.2: Histopathologische Charakteristika der AD.....	2
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Amyloid-Vorläuferproteins APP.....	4
Abbildung 1.4: APP-Prozessierung.....	5
Abbildung 2.1: Spaltung von X-Gal durch β -Galaktosidase	22
Abbildung 2.2: Prinzip der reversen Transkription	33
Abbildung 2.3: Bisulfitmodifikation von Cytosinresten.....	38
Abbildung 3.1: Immunfluoreszenzfärbung zur Untersuchung morphologischer Veränderungen in IMR 90-Fibroblasten.....	40
Abbildung 3.2: Maximale in vitro erreichte Lebensspanne der untersuchten Zelllinien.....	41
Abbildung 3.3: SA- β -Galaktosidase-Aktivität	43
Abbildung 3.4: Altersabhängige Erhöhung der Caveolin1 Expression.....	44
Abbildung 3.5: Expression von Caveolin1.	45
Abbildung 3.6: Untersuchung des p21 ^{Waf1/Cip1} -Proteinspiegels.....	46
Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der untersuchten Promotorregion.....	48
Abbildung 3.8: Ausschnitt aus dem Sequenzdiagramm von IMR 90 PDL 23 und PDL 45	49
Abbildung 3.9: Untersuchung der Cholesterinspiegel	50
Abbildung 3.10: Altersassoziierte Disintegration der Lipid Rafts am Beispiel der NHF AG05659.....	51
Abbildung 3.11: Analyse der APP-Spiegel und der APP-Spaltfragmente.....	53
Abbildung 3.12: Abnahme der extrazellulären APP-Spaltfragmente	55
Abbildung 3.13: ADAM10 Expression in der Kontrollzelllinie GM01652	56
Abbildung 3.14: Untersuchung der α -Sekretase-Aktivität	57
Abbildung 3.15: BACE1-Expression in Niemann-Pick Typ C Zellen (GM03123).....	58
Abbildung 3.16: β -Sekretase-Aktivität aller untersuchten Zelllinien.....	58
Abbildung 3.17: β -Sekretase-Aktivität in Lipid Rafts von Trisomie 21-Fibroblasten (AG05397).....	59
Abbildung 3.18: Untersuchung der Lokalisation von BACE1 in AG00364-Fibroblasten	60
Abbildung 3.19: Expression der γ -Sekretase-Komponenten Presenilin-1 und Nicastrin in AG06840- Fibroblasten.....	61
Abbildung 3.20: γ -Sekretase-Aktivität aller untersuchten Zelllinien	62
Abbildung 3.21: Lokalisation der γ -Sekretase-Aktivität in Lipid Rafts.....	62
Abbildung 3.22: Expression von SIRT1 in IMR90-Fibroblasten	64
Abbildung 3.23: α -Sekretase-Aktivität nach Inhibition mit Sirtinol	65
Abbildung 3.24: Western Blot Analyse der APP-Prozessierung nach Sirtinol-Inhibition	66
Abbildung 3.25: Analyse der extrazellulären Spaltfragmente nach Sirtinol-Inhibition	67
Abbildung 3.26: α -Sekretase-Aktivität nach ROCK1-Inhibition	68
Abbildung 3.27: Analyse der APP-Prozessierung nach Rock1-Inhibition	68
Abbildung 3.28: β -Sekretase-Aktivität von IMR90-Fibroblasten	69
Abbildung 3.29: Untersuchung der BACE1 mRNA-Spiegel	70

Abbildung 3.30: APP-Prozessierung in mit konditionierten Medium behandelten jungen NHF.....	70
Abbildung 3.31: β -Sekretase-Aktivität in N2a-Zellen nach Behandlung mit konditioniertem Medium seneszenten Fibroblasten.....	72
Abbildung 3.32: Behandlung von Fibroblasten mit dem Zellzyklus-Inhibitor Aphidicolin	72
Abbildung 3.33: Proteinexpression von BACE1 nach Aphidicolin-Behandlung	73
Abbildung 3.34: Einfluss von Aphidicolin auf die β -Sekretase-Aktivität und BACE1 Expression	74
Abbildung 3.35: β -Sekretase-Aktivität in Zytokin-behandelten Fibroblasten.....	75
Abbildung 4.1: Altersabhängige Veränderungen bei der APP-Prozessierung.....	81

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Reaktionssysteme	15
Tabelle 2.2: Verwendete Restriktions-Endonukleasen	16
Tabelle 2.3: Verwendete Primärantikörper.....	16
Tabelle 2.4: Verwendete Sekundärantikörper.....	17
Tabelle 2.5: Übersicht aller verwendeten Primer	17
Tabelle 2.6: Verwendete Computerprogramme	18
Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten Zelllinien	20
Tabelle 2.8: Pipettierschema für Polyacrylamid (PAA)-Gele.....	25
Tabelle 2.9: PCR-Cycler Programm.....	35
Tabelle 3.1: Populationsverdopplungszahlen der verwendeten Zelllinien	42

8.5 Danksagung

8.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die dem Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Johannes Gutenberg-Universität Mainz eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Der Einfluss der Zellalterung auf die pathobiochemischen Prozesse von Morbus Alzheimer und weiteren neurodegenerativen Erkrankungen“

am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Christian Behl ohne sonstige Hilfe durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe bisher weder an einer in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Mainz, Januar 2008

Birgit Römpf