

Altersabhängigkeit von Lipidperoxidation,
Proteinoxidation und proteasomalem Abbau oxidierter
Proteine

Inauguraldissertation
zur Erlangung eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Arndt, Jana
aus Königslutter

Gießen 2010

Altersabhängigkeit von Lipidperoxidation,
Proteinoxidation und proteasomalem Abbau oxidierter
Proteine

Inauguraldissertation
zur Erlangung eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Arndt, Jana
aus Königslutter

Gießen 2010

Aus dem Institut für umweltmedizinische Forschung der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf, Abteilung für molekulare Alternsforschung

Leiter/Direktor : Prof. Dr. Lars Oliver Klotz

Gutachter: Prof. Dr. T. Grune

Gutachter: Prof. Dr. M. Niepmann

Tag der Disputation: 05.07.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Alterungsprozesse und demographische Entwicklung	6
1.2 Alternstheorien	10
1.3 Grundlagen von Lipidoxidations-Prozessen und deren Altersabhängigkeit	12
1.4 Proteinoxidation und Alterung	16

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Probengewinnung	
2.1.1 Versuchstiere	19
2.1.2 Anästhesie und Probenentnahme	19
2.1.3 Operationsprotokolle	20
2.1.4 Probenkonservierung und Probenaufbereitung	21
2.2 Proteinbestimmungen	
2.2.1 Prinzip der Methode	21
2.2.2 Benötigte Reagenzien und Geräte	21
2.2.3 Versuchsdurchführung	23
2.3 Bestimmungen von Malondialdehyd	
2.3.1 Prinzip der Methode	23
2.3.2 Benötigte Reagenzien und Geräte	24
2.3.3 Versuchsdurchführung	24
2.3.4 Technische Daten der HPLC-Apparatur	26
2.4 Bestimmungen oxidierter Proteine mittels ELISA	
2.4.1 Prinzip der Methode	27
2.4.2 Benötigte Reagenzien und Geräte	27
2.4.3 Versuchsdurchführung	29
2.5 Herstellung von reduziertem BSA	
2.5.1 Benötigte Reagenzien und Geräte	30
2.5.2 Versuchsdurchführung	31
2.6 Bestimmung der 20S – Proteasomen-Aktivität (Suc-LLVY-MCA-Peptidase-Aktivität) von Zell-Lysaten	
2.6.1 Prinzip der Methode	32
2.6.2 Benötigte Reagenzien und Geräte	32
2.6.3 Versuchsdurchführung	33
2.6.4 Auswertung der Messergebnisse	35

Inhaltsverzeichnis

2.7 Gelelektrophorese	
2.7.1 Prinzip der Methode	35
2.7.2 Benötigte Reagenzien und Geräte	36
2.7.3 Herstellung der Puffer	37
2.7.4 Herstellung der Gele	38
2.7.5 Versuchsdurchführung	39
2.8 Western Blot	
2.8.1 Prinzip der Methode	40
2.8.2 Benötigte Reagenzien	41
2.8.3 Herstellung der Komponenten	41
2.8.4 Versuchsdurchführung	42
2.9 Carbonyl Blot	
2.9.1 Prinzip der Methode	43
2.9.2 Benötigte Reagenzien	43
2.9.3 Herstellung der Komponenten	44
2.9.4 Versuchsdurchführung	45
2.10 Statistische Untersuchungen	45
3. Resultate	
3.1 Ergebnisse der MDA-Bestimmungen	46
3.2 Carbonyl-Bestimmungen	48
3.3 20S-Proteasomen-Aktivitätsbestimmung	50
3.4 Beziehung zwischen individueller Proteinoxidation und individueller Proteasomenaktivität	52
4. Diskussion	
4.1 Lipidperoxidation und Alterung	54
4.2 Altersabhängige Proteincarbonyl-Messungen in Organen und Geweben	56
4.3 Antioxidativer Schutz beim Altern	59
4.4 Schlussfolgerung und Gesamtbetrachtung zu Biomarkern des oxidativen Stresses für das Altern	61
5. Zusammenfassung	69
6. Abkürzungsverzeichnis	71
7. Literaturverzeichnis	74
8. Erklärung über gute und wissenschaftliche Arbeit	86

Inhaltsverzeichnis

9. Anhang

9.1 Tabellarische Darstellung der Einzelwerte 87

9.2 Akzeptierte und im Druck befindliche Publikation, nunmehr erschienen in:

Mechanisms of Ageing and Development 130 (2009) 748–753 96

10. Danksagung

104

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1 Alterungsprozesse und demographische Entwicklung

Jeanne Calment aus Frankreich ist 121 Jahre alt geworden. Als sie 1997 starb, hatte sie ihre Tochter um 63 Jahre überlebt und war seit 50 Jahren Witwe! Die Französin hat das bisher höchste nachweisbare Menschenalter erreicht (*Shimizu T et al. 2008, Jeune B et al. 2000*). Auf der ganzen Welt sind schätzungsweise 135.000 Menschen über 100 Jahre alt. Im Jahr 2050 sollen es nach Berechnungen der Vereinten Nationen weltweit über zwei Millionen sein. Im Jahr 2040 wird es 5,3 Mio. Hochaltrige von über 80 Jahren geben (heute 3,3 Mio.).

Wie zeigt sich die Situation in Deutschland? In den 70er Jahren gab es 250 Hundertjährige in Deutschland, inzwischen sind es mehr als 6.000. Vor 120 Jahren, zur Zeit Bismarcks, lebten deutsche Männer durchschnittlich 36, Frauen 38 Jahre lang. Heute sind es 74 und 80 Jahre. Im Jahr 2010 werden es 75 und 81 sein. In Tabelle 1 werden die Anteile verschiedener Altersgruppen für das Ende der 80er Jahre mit prognostischen Daten für 2030 verglichen.

Die demographische Entwicklung ist entscheidend mit neuen Ansprüchen an die Ökonomie und die Medizin verbunden. Ökonomen sagen: Für jedes gewonnene Jahr muss das Brutto-Sozialprodukt um 1 Prozent wachsen. Aus all diesen Gründen stehen Probleme der Altersforschung im Mittelpunkt des Interesses, auch in der Physiologie und Biochemie sowie Molekularbiologie (*Merker K et al. 2000*).

Tab. 1: Veränderungen in der Altersstruktur in Deutschland (*Birg H, 1998*)

Altersstruktur	% der Altersgruppe 1987/88	% der Altersgruppe 2030
Bis 20 Jahre	22,2	16,4
20 – 59 Jahre	54,0	46,9
60 – und älter	23,8	36,7

Die Alterung geht mit der Reduktion funktioneller Organleistungen einher. Beispiele dafür sind die Verminderung der Lungenfunktion, der Gelenk- und Skelettfunktionen, des Endokriniums, des Nervensystems, der Funktionen der Sinnesorgane und des Immunsystems. In der Tabelle 2 werden zu Veränderungen in den Organsystemen einige Details angegeben.

1. Einleitung

Tab. 2: Altersabhängige Veränderungen in einzelnen Organsystemen (zusammengestellt nach Klinker R und Silbernagel S, 2003 und Löffler G und Petrides PE, 2006)

Organsystem	Altersabhängige Veränderungen
Lunge	<ul style="list-style-type: none">- Verminderung der Vitalkapazität- Verminderung der Anzahl der Alveolen- Zunahme des Alveolendurchmessers
Gelenke	<ul style="list-style-type: none">- Verminderung der Viskosität der Synovialflüssigkeit
Skelett/ Skelettsystem	<ul style="list-style-type: none">- Verringerung der Knochendichte (erhöhtes Risiko für Osteoporose)- Abnahme der Muskelmasse, Verringerung der Muskelkraft- Verringerung des Wassergehaltes- Verringerung der Elastizität
Nieren	<ul style="list-style-type: none">- Verminderung der glomerulären Filtrationsrate- Verringerung der Fähigkeit der Nieren zur Harnkonzentration, damit verringerte Ausscheidungs- und Entgiftungsfunktion der Nieren
Sexualorgane	<ul style="list-style-type: none">- Involution der Sexualorgane (Ovarien, Hoden)
Sinnesorgane	<ul style="list-style-type: none">- Verringerung der Elastizität der Augenlinse (Altersweitsichtigkeit = Presbyopie)- oft zunehmende Trübung der Augenlinse (grauer Star = Katarakt)- Verringerung Hörvermögen (Reduktion von Frequenzbereich und Sensitivität)
Nervensystem	<ul style="list-style-type: none">- Erhöhung der Reaktionszeiten- verlangsamte und inkomplette Verarbeitung neuer Informationen- Verringerung der Gedächtnisleistung- Verringerung des Hirnvolumens
Immunsystem	<ul style="list-style-type: none">- Verringerung immunologischer Leistungen, z.B. der Abwehr von Infektionen- verminderte Bildung von T-Lymphozyten

1. Einleitung

In Abb. 1 wird beispielhaft die altersabhängige Reduktion der Lungenfunktion des Menschen anhand der Veränderung der Vitalkapazität dargestellt.

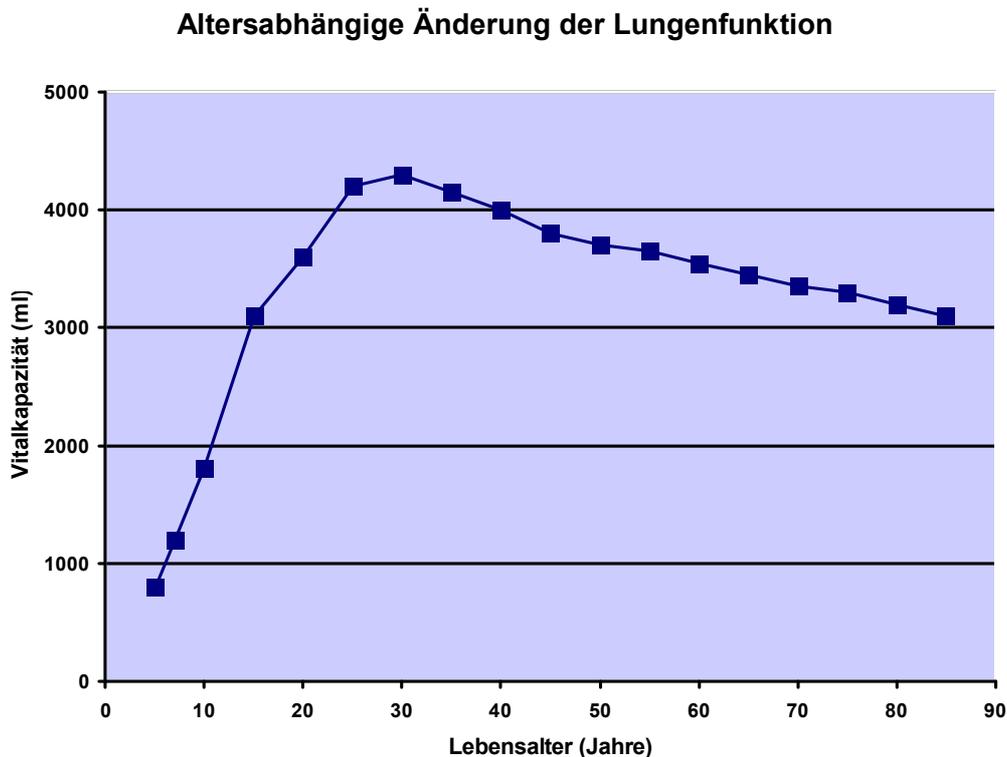


Abb. 1: Altersabhängige Änderung der Lungenfunktion des Menschen (*Aresin L et al. 1988*)

Auf der Grundlage solcher vielfältigen Veränderungen kommt es allmählich zu einer verringerten Anpassungsfähigkeit an exogene Einflüsse. Die strukturellen und funktionellen Reduktionen erlauben mit zunehmendem Alter nur noch eine verringerte Anpassung an die multiplen exogenen Einflüsse. Wenn auch die körperliche und geistige Leistungsfähigkeit im höheren Lebensalter verschieden ist und durchaus noch sehr hoch sein kann, auf einigen Gebieten manchmal sogar höher als in jungen Jahren, so kommt es im Allgemeinen doch zu einem Leistungsrückgang (*Merker K et al. 2000*).

Leistungsrückgänge auf struktureller Basis, z.B. im mentalen Bereich, können mitunter durch immense Erfahrungen in Beruf, Hobbies, Menschenkenntnis etc. ausgeglichen werden. Schließlich kann auch jeder geistig oder körperlich trainieren und sich generell um eine gesunde Lebensweise bemühen, um die Leistungsrückgänge zu verlangsamen und in Grenzen zu halten. Dennoch treten bei älteren Menschen nachlassende Gedächtnisleistung, eine erhöhte Infektionsanfälligkeit und eine verringerte sportliche Leistungsfähigkeit in Erscheinung. Der verminderten Leistungsfähigkeit von Patienten im höheren Lebensalter, beruhend auf strukturellen und funktionellen Veränderungen mehrerer Organsysteme, muss

1. Einleitung

auch die Medizin durch altersadäquate Therapiekonzepte Rechnung tragen (Troen BR et al. 2003, Hughes KA und Reynolds RM 2005).

Ohne Zweifel gibt es eine große Zahl von Erkrankungen, die nur oder bevorzugt im höheren Lebensalter auftreten. Diese Erkrankungen werden als age-related diseases bezeichnet. Der englische Begriff ist sicher nicht einfach mit „Alters-abhängige Erkrankungen“ zu übersetzen, da sie erstens nicht direkt auf die physiologischen Alterungsprozesse kausal zurückzuführen sind und sie zweitens ja auch nicht jeder durchmachen wird. Dennoch sind sie eben im höheren Lebensalter häufiger zu erwarten. Abb. 2 zählt die wichtigsten dieser Erkrankungen auf (Siems W et al. 2008).

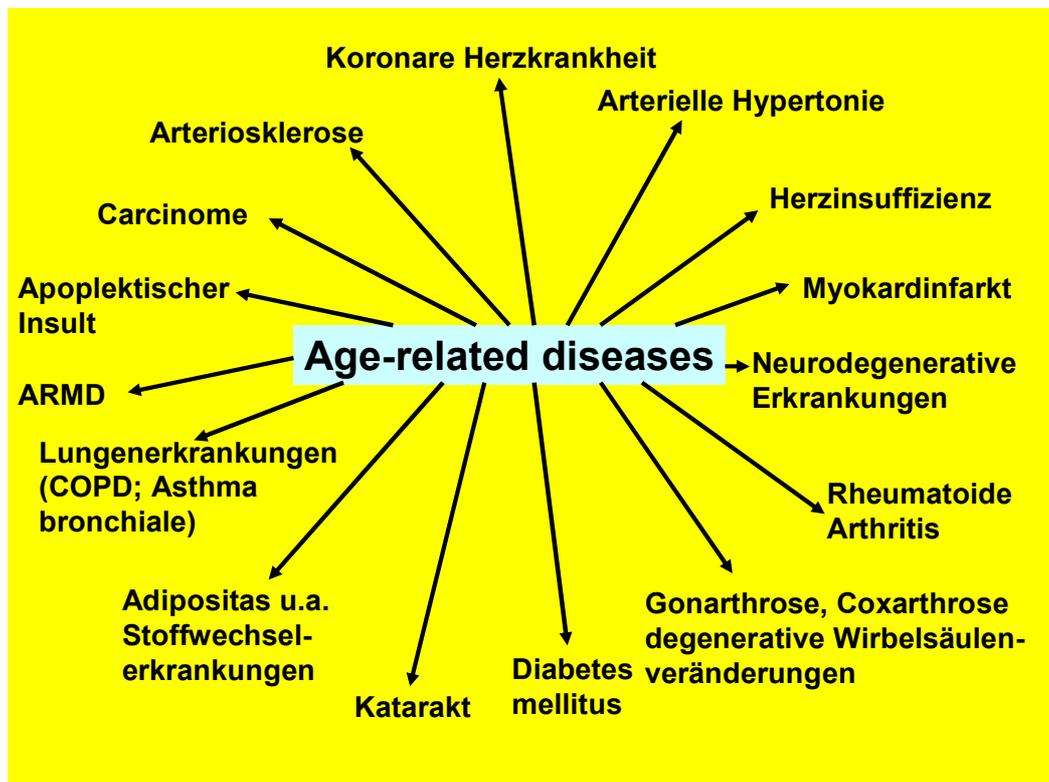


Abb. 2: Age-related diseases: eine Auswahl nach Häufigkeit des Auftretens und ökonomischer Bedeutung im Gesundheitsmarkt (modifiziert nach Siems W, Bremer A, Przyklenk J 2008)

1. Einleitung

1.2 Alternstheorien

Die wichtigsten Theorien des Alterns werden im Folgenden beschrieben (*Merker K et al. 2001*), wobei von Medvedev über 300 verschiedene dieser Erklärungsversuche postuliert wurden (*Medvedev ZA et al. 1990*):

Die „Longevity Determinant Gene Hypothesis“ (*Cutler RG et al. 1975*) sieht das Altern als eine Folge von normalen biologischen Prozessen an, die zwar Voraussetzung für das Leben sind, aber auch Langzeitschäden hervorrufen und die maximale Lebensspanne des Organismus einschränken. Diese Theorie unterscheidet den entwicklungsbedingten und den ständig voranschreitenden Alterungsprozess. Kernaussage ist, dass alle Spezies den gleichen allgemeinen Alterungsgründen und Mechanismen der Altersregulation unterliegen. Dennoch existieren einige Schlüsselprozesse, die sowohl die Alternsrate als auch die Lebensspanne regulieren. Die Gene, die dafür verantwortlich sind, werden als "longevity determinant genes" bezeichnet und gaben der Hypothese ihren Namen.

Im Gegensatz dazu betrachtet die „Somatic Mutation Theory“ (*Sorsa M et al. 1979*) die intrinsischen Faktoren, also die somatischen Mutationen in der DNA, als Schlüsselmechanismen der individuellen Alterung (*Dorman JB et al. 1995*). Auf Grund dieser Mutationen können Proteine und Enzyme entstehen, welche die für die Zelle essentiellen Funktionen nicht mehr ausführen können. Die Akkumulation von Mutationen führt zu strukturellen und funktionellen Einschränkungen und zum Tod der Zelle bzw. des Organismus.

Die „Telomer-Hypothese“ des Alterns besagt, dass die Lebensspanne eines Individuums von der möglichen Anzahl der Zellteilungen abhängig ist und dass die Telomere sich bei jeder Zellteilung verkürzen. Die Zahl der Zellteilungen ist eine Art biologische Uhr, die die Zellteilungen und die Lebensspanne misst.

Für die Zellen existiert ein Hayflick-Limit, das ist die Zahl der möglichen Zellteilungen. Der limitierende Faktor für die Zellteilungen ist die Telomerenlänge.

Einige Körperzellen können sich noch teilen, obwohl der Alterungsprozess des gesamten Organismus nahezu abgeschlossen ist (z.B. Hautfibroblasten). Dies ist offenbar ganz wesentlich bei der Alterung des Immunsystems!

Die Telomere sind die Chromosomenenden. Sie sind für die Stabilität der Chromosomen von grundlegender Bedeutung. Mit jeder Zellteilung werden die Telomere verkürzt. Unterschreitet

1. Einleitung

die Telomerlänge ein kritisches Minimum, kann sich die Zelle nicht mehr teilen. Das Enzym Telomerase, das aus einem RNA-Proteinkomplex mit einer reverse-Transkriptase-Aktivität besteht, kann die Verkürzung der Telomere wieder ausgleichen. Somit können sich Zellen, in denen dieses Enzym aktiv ist, häufiger teilen als andere Körperzellen.

In den meisten normalen Zellen ist die Aktivität der Telomerase nicht nachweisbar. Aktiv ist die Telomerase nur bei einzelligen Organismen sowie in Zellen der Keimbahn und Embryonalzellen bei mehrzelligen Organismen.

Die Telomerase ist außerdem aktiv in Krebszellen und verhilft ihnen dadurch, sich unendlich oft zu teilen und im Körper zu wuchern. Nicht entartete Zellen können sich nur einer bestimmten Anzahl (ca. 30-40 mal, sogenannte Hayflick-Grenze) von Zellteilungen unterziehen, bevor sie sich selbst töten (Apoptose).

Seit (einige) Mediziner das Altern nicht mehr als natürlich, sondern als krankhaft betrachten, arbeiten sie an Therapien gegen den Tod. Einzelne Gentechniker und Projekte setzen somit auf das Enzym Telomerase (*Wright WE et al. 1995*).

Die „Free Radical Theory of Aging“ (*Harman D et al. 1956*) basiert darauf, dass die Entstehung und Wirkung von freien Radikalen die Hauptursache für die Alterungsprozesse ist. Es kommt zur Ansammlung von Schäden, die durch reaktive Oxidantien verursacht wurden: zur Oxidation von Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und Nucleinsäuren.

Die Lipofuszin-Theorie des Alterns beschäftigt sich damit, dass während der Alterung verschiedene Abfallprodukte des Stoffwechsels akkumulieren.

Diese wurden aufgrund früherer Untersuchungen als Lipofuscin bezeichnet: fluoreszierende lipidhaltige Alterspigmente.

Lipofuscin besteht hauptsächlich aus Lipiden (20-50 %), Proteinen (30-50 %) und hydrolyseresistenten Resten (10-30 %). Bei der Lipofuszin-Theorie findet man eine enge Verbindung zur Radikaltheorie des Alterns (*Harman D et al. 1956*) (free radical theory):

Durch freie Radikale werden Lipide und Proteine peroxidiert; es kommt zu Vernetzungen und weiteren chemischen Reaktionen. Außerdem reagieren Kohlenhydrate u.a. Komponenten mit dieser Matrix. Es kommt zur Bildung eines unlöslichen, hochmolekularen und fluoreszierenden Komplexes, der in den Zellen eingelagert wird.

1. Einleitung

Der Grundansatz der „Mitochondrien-Schädigungs-Theorie“ des Alterns leitet sich ebenfalls von der Radikaltheorie des Alterns ab. Das Hauptproblem für Zellen, die sich nicht in der Teilungsphase befinden, stellt nach der Mitochondrien-Schädigungs-Theorie die Empfindlichkeit von mitochondrialer DNA für Angriffe von reaktiven oxidativen Spezies/O₂-Radikalen dar. Mitochondrien besitzen ihre eigene genetische Information. Wenn das Genom eines Mitochondriums mutiert oder inaktiviert ist, verliert das Mitochondrium seine Fähigkeit, sich zu replizieren. Es produziert dann selbst freie Radikale. Eine verstärkte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in Mitochondrien alter Tiere ist durch verschiedene Autoren für unterschiedliche Gewebe nachgewiesen worden (*Richter, 1995*). Es kommt zur oxidativen Schädigung und zum Untergang des Mitochondriums und nachfolgend zum Zelluntergang.

Es geht also bei dieser Theorie um die besonders hohe Empfindlichkeit mitochondrialer DNA und den Verlust der Fähigkeit der Replikation der Mitochondrien. Die Schädigung der mitochondrialen DNA wurde als der Schrittmacher des Alterungsprozesses betrachtet (*Grune und Davies, 2008*).

Keine der genannten Alterungstheorien wurde generell von der Wissenschaft akzeptiert (*Hughes KA et al*). Vergleicht man jedoch die einzelnen Theorien, so favorisieren die meisten Gruppen, die auch die anderen Hypothesen/Theorien untermauernde Radikaltheorie des Alterns (Free Radical Theory of Aging). Sie wurde 1956 von Denham Harman formuliert. Diese Theorie sieht eben in der Entstehung und Wirkung von freien Radikalen die Ursache für alle Alterungsprozesse. Entsprechend der Radikaltheorie des Alterns ist die Ansammlung der Schäden, die durch reaktive Oxidantien verursacht wurden, limitierend für die verbleibende Lebensspanne (*Troen BR et al. 2003, Harman D 2003, de Souza Pinto NC 2002, Junqueira VBC et al. 2004, Beckman KB et al. 1998*).

1.3 Grundlagen von Lipidoxidations-Prozessen und deren Altersabhängigkeit

Offenkundig spielt im Rahmen der Alterung einer Zellorganelle, einer Zelle, eines Gewebes, Organs oder Gesamtorganismus die Oxidation von Lipiden eine bedeutsame Rolle. Die Grundlagen der Lipidoxidation sollen deshalb kurz erläutert werden. Die Oxidation der Lipide wird durch Oxidantien verursacht. Innerhalb der Vielzahl von Oxidantien spielen die in Tabelle 3 gelisteten eine Hauptrolle.

1. Einleitung

Tab. 3: Besonders wichtige Oxidantien

$O_2^{\cdot-}$	Superoxidradikale
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HO^{\cdot}	Hydroxylradikal
RO^{\cdot}	Alkoxyradikale
ROO^{\cdot}	Peroxyradikale

Außerdem können sich Folgeprodukte bilden, die teilweise extrem toxisch sind, so z. B. Epoxide oder Aldehyde. Einige Gruppen von Folgeprodukten der Lipidperoxidation sind in Tabelle 4 enthalten.

Tab. 4: Produkte der Lipidperoxidation (LPO-Produkte) (*Voss und Siems 2006*)

Lipidhydroxyperoxide
Hydroxilipide
konjugierte Diene
modifizierte Phospholipide
oxidiertes Cholesterol und Cholesterolester
Alkane (Ethane und Pentane)
lösliche Aldehydprodukte
-Alkane (z.B. Ethan, Pentan, Hexan)
-Alkene (z.B. Hexen)
-Hydroxyalkene (z.B. HNE)
-bifunktionale Aldehyde (z.B. MDA)

In der medizinisch-angewandten Forschung und teilweise bereits in der Diagnostik (Biomarker der LPO) haben das Malondialdehyd (MDA) und das 4-Hydroxynonenal (HNE) eine vorrangige Bedeutung. Beide Parameter gehören ohne Zweifel auch quantitativ und qualitativ zu den LPO-Produkten mit der größten biologischen Relevanz. Abbildung 3 zeigt die Strukturformeln von MDA und HNE.

1. Einleitung

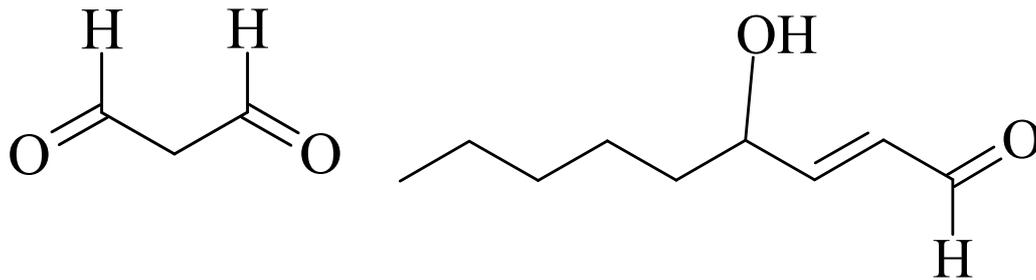


Abb. 3: Strukturformeln von Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (HNE)

Die biologischen Wirkungen von Aldehyden sind wiederum ausgesprochen vielfältig. Sie beruhen im Wesentlichen auf der hohen Reaktionsfähigkeit der Aldehyde mit Proteinen, Kohlenhydraten und Nucleinstoffen. Die Reaktionen der Aldehyde können unter anderem zu Veränderungen der Proteinstruktur, zur Hemmung des aktiven Zentrums von Enzymen und zu Quervernetzungen von Proteinen führen.

Einige biologische Effekte von MDA u.a. Aldehyden werden in Abbildung 4 dargestellt.

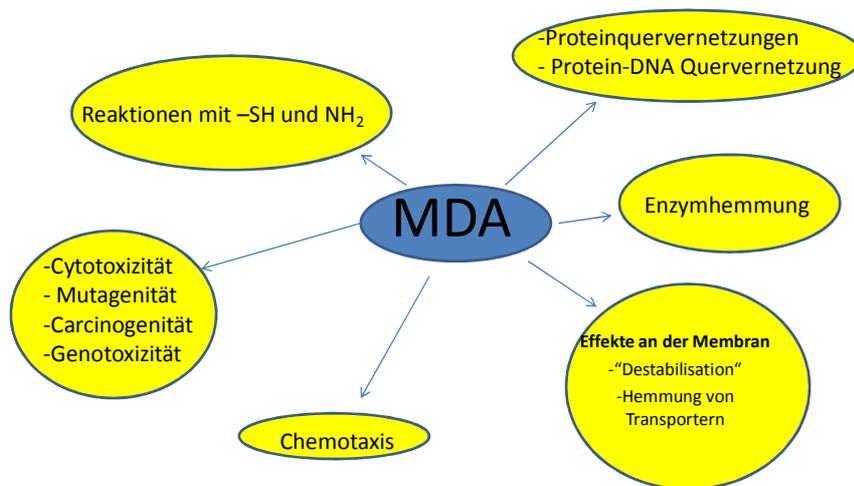


Abb. 4: Biologische Wirkungen von MDA und anderen Aldehyden als sekundäre LPO Produkte (übernommen aus Siems et al. 2008)

Für das menschliche Blutplasma ist bereits eine Altersabhängigkeit von MDA- und HNE-Konzentrationen bekannt. So steigen die MDA-Plasmaspiegel gesunder Menschen im Alter von 5 bis 89 Jahren mit steigendem Lebensalter signifikant an (Abb. 5). Dem geht parallel

1. Einleitung

eine steigende Konzentration an Plasma-HNE (Abb. 6) und ein Abfall des GSH-Spiegels roter Blutzellen (hier nicht abgebildet) einher.

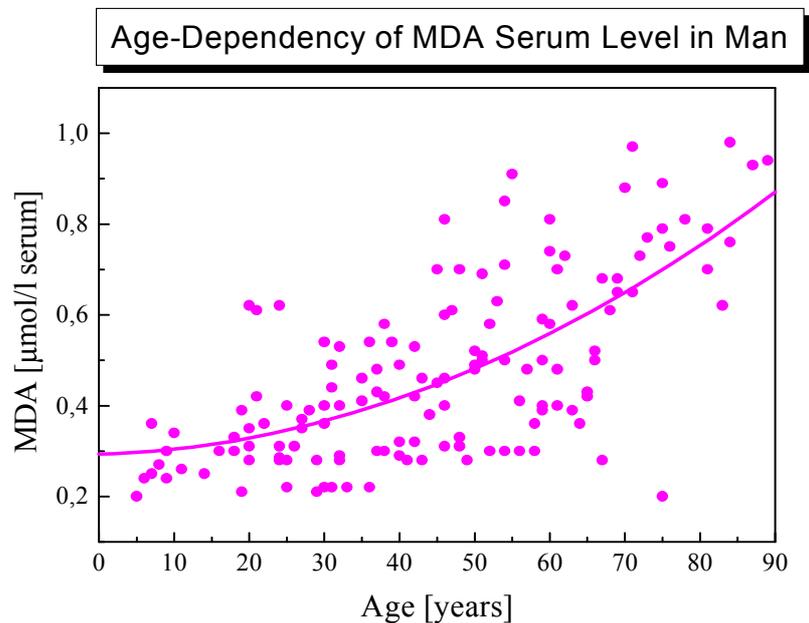


Abb. 5: Altersabhängige Variation der MDA-Konzentration im Blutplasma des Menschen (Siems und Grune; persönliche Mitteilung)

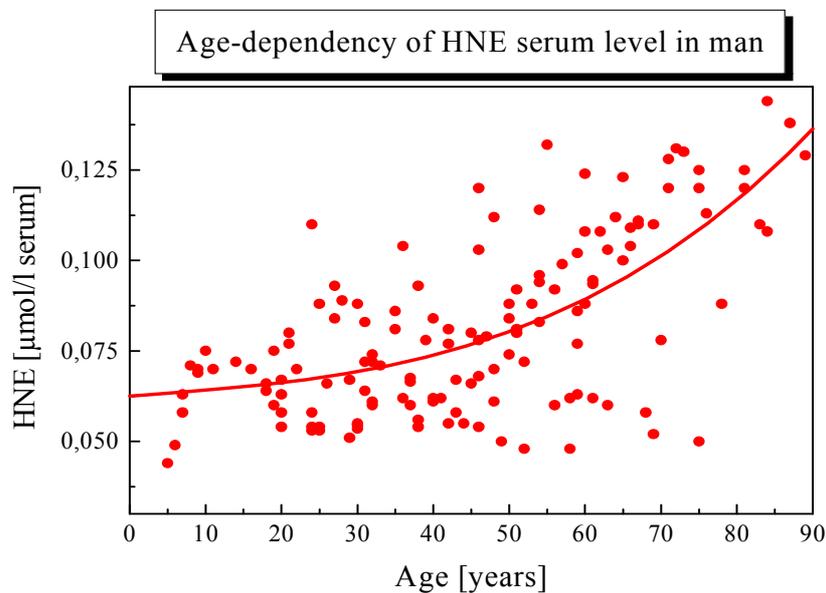


Abb. 6: Altersabhängige Variation der HNE-Konzentration im Blutplasma des Menschen (Siems und Grune; persönliche Mitteilung)

1. Einleitung

1.4 Proteinoxidation und Alterung

Die Reaktionen von Oxidantien einschließlich sekundärer aldehydischer LPO-Produkte führen zur Proteinmodifikation und damit zu strukturellen und funktionellen Veränderungen der betroffenen Proteine. Dabei treten nicht nur zufällige Reaktionen mit gleich häufiger Verteilung der Proteinmodifikation hinsichtlich der verschiedenen Proteinarten und auch der in verschiedenen Zellen oder subzellulären Organellen enthaltenen Proteine auf. Es besteht offenkundig eine unterschiedliche Sensitivität der Proteine gegenüber oxidativer Veränderung. In Abbildung 7 wird gezeigt, dass z.B. stark proliferierende Zellen (siehe Ehrlich-Ascites-Tumorzellen im proliferierenden Stadium des 5. Tages nach Implantation) einen höheren Anteil an Protein-Aldehyd-Addukten bilden als Zellen, die sich langsamer teilen. In allen untersuchten Zellarten und auch in Mitochondrien (verschiedener Zelltypen) war nach Bolus-Belastung mit HNE der Anteil des HNE, der sich an Proteine gebunden hat, nie höher als 10 % des jeweils eingesetzten HNE. Mehr als 90 % des Aldehyds sind jeweils ohne Proteinbindung metabolisiert worden.

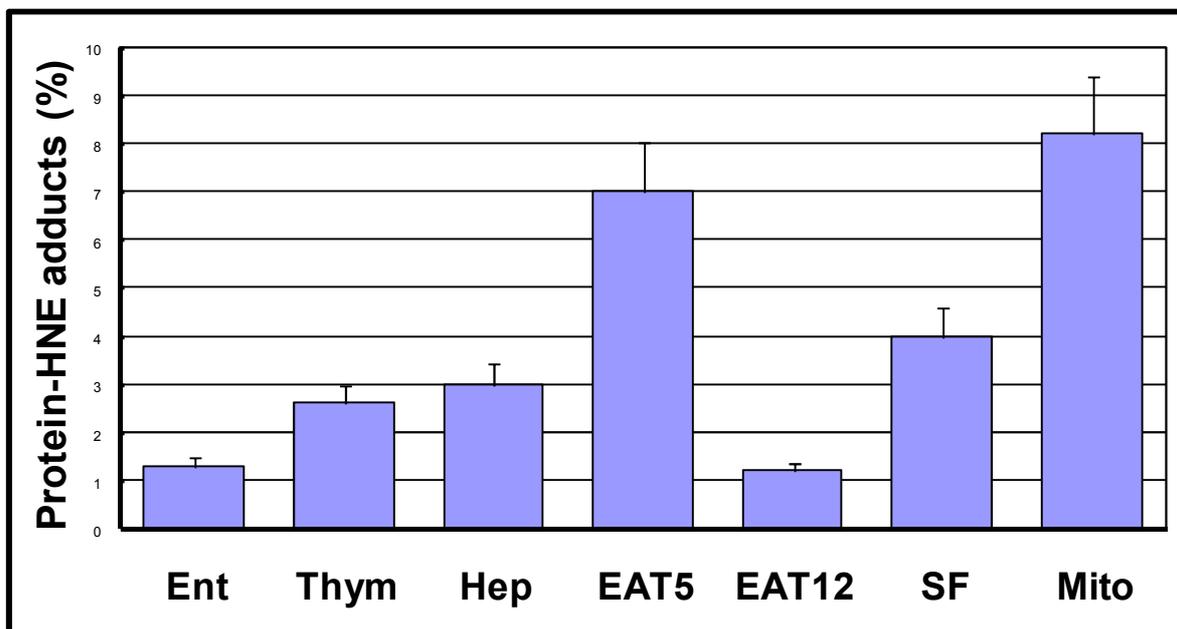


Abb. 7: Anteil der Bindung von HNE an die intrazellulären Proteine verschiedener Zelltypen bzw. von Mitochondrien. Daten aus (Grune et al. 1994, Siems et al. 1997, Ullrich et al. 1996). Eingesetzt wurde jeweils 100 μ M HNE. Gemessen wurde nach 10 min Reaktionszeit.

1. Einleitung

Ent = Enterozyten (Ratte), Thym = Thymozyten (Maus), Hep = Hepatozyten (Ratte), EAT5 = Ehrlich-Ascites-Tumorzellen 5. Tag nach Implantation, EAT12 = Ehrlich-Ascites-Tumorzellen 12. Tag nach Implantation, SF = Synovialfibroblasten (Ratte), Mito = Mitochondrien (Glomerulumzellen der Rattenniere); jeweils Mittelwerte \pm S.E.

Auch die Empfindlichkeit verschiedener Enzyme gegen 4-Hydroxynonenal ist stark variabel. Fast alle Enzyme, die laut Literatur untersucht wurden, können durch HNE gehemmt werden. Die 50 %-Hemmwerte von durch *Siems et al.* untersuchten Enzymen werden in Tabelle 5 angegeben.

Tab. 5: 50 %-Hemmwerte durch HNE für verschiedene ausgewählte Enzyme (*Siems et al. 1997*)

Enzymname (Spezies und Organ)	50 %-Hemmwerte durch HNE
Glucose-6-Phosphatase (Ratte; Leber)	70 μ M
Adenylat-Zyklase (Ratte; Leber)	2,7 μ M
DNA-Polymerase α (Ratte, Leber & Yoshida-Hep.)	370 μ M
DNA-Polymerase β (Ratte, Leber & Yoshida-Hep.)	290 μ M
Adenin-Nucleotid-Translocator. (Ratte; Leber; Mitochondrien)	400 μ M
ADP –Ribosyl-Transferase (Mensch; Synovialfibroblasten)	4.6 μ M
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase (Schwein; Cerebrum; Kortex)	120 μ M
NADPH-Oxidase (Mensch; PMNL (Polymorphonukleäre Leukozyten))	19 μ M

Oxidierter Proteine werden im Allgemeinen abgebaut. Dies erfolgt vorwiegend durch das so genannte 20S-Proteasom. Lediglich im Falle einer massiven Aggregatbildung vernetzter Proteine ist ein proteasomaler Abbau erschwert bzw. sogar unmöglich. Somit gibt es zwei Wegstrecken für das Schicksal oxidativ modifizierter Proteine (siehe Abb. 8).

1. Einleitung

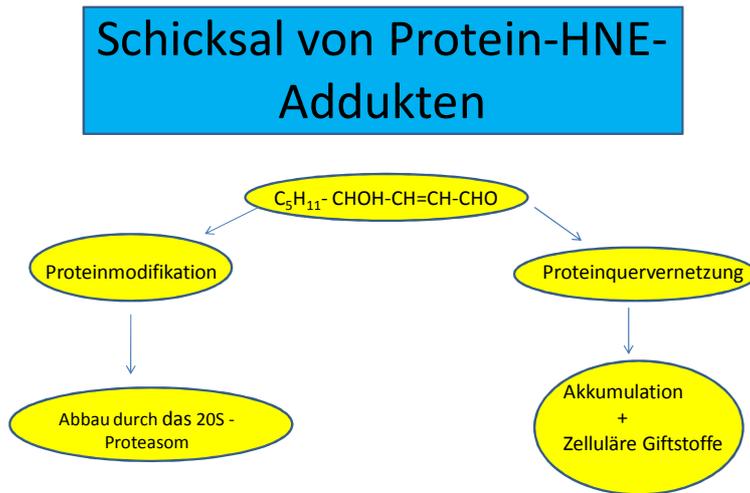


Abb. 8: Schicksal oxidativ modifizierter Proteine (nach Grune; persönliche Mitteilung)

Unseres Wissens existieren keine Studien, die die Proteinoxidation und die proteasomale Aktivität als altersabhängige Faktoren parallel untersucht haben. Demzufolge wurden in der vorliegenden Untersuchung, um die Beziehung zwischen Proteinoxidation und dem Abbau modifizierter Proteine als Alterungsfaktoren zu untersuchen, der Proteincarbonylgehalt und die proteasomale Aktivität in Ratten unterschiedlichen Alters analysiert. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die verschiedenen Gewebe/Organe eines Organismus mit gleicher Geschwindigkeit altern. Dazu dienten Analysen in Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Skelettmuskel sowie im Blutplasma von Ratten für verschiedene Altersgruppen.

2. Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Probengewinnung

2.1.1 Versuchstiere

Die für die Forschungsreihen benötigten Organe wurden aus männlichen Ratten der Rasse Wistar gewonnen.

Die Aufzucht der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei einem 12 Stunden Licht-Dunkel-Zyklus im zentralen Tierlabor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Wasser und Futter standen ad libitum zur Verfügung. Die Ratten gehörten zu vier verschiedenen Altersgruppen:

6 Monate alte Ratten: n = 7,

10 Monate alte Ratten: n = 5,

18 Monate alte Ratten: n = 6 und

26 Monate alte Ratten: n = 5.

Insgesamt wurden also 23 Tiere im Alter zwischen 6 und 26 Monaten untersucht.

2.1.2 Anästhesie und Probenentnahme

Die Betäubung der Ratten wurde mittels einer Äthernarkose durchgeführt. Nach Einsetzen der Relaxation wurde das Bauchfell von unten nach oben aufgeschnitten, das Sternum entfernt und somit die Brust- und Bauchhöhle eröffnet. Die Dauer des Narkoseeintritts nach Verabreichen des Anästhetikums sowie die Dauer der Organentnahme wurden exakt dokumentiert. Organauffälligkeiten bei der Entnahme wurden bis auf eine visuell poröse Oberfläche der Leber bei Tier 20 nicht festgestellt.

Anschließend wurden die Organe in folgender Reihenfolge entnommen: Herz, Blut, Lunge, Milz, Leber, Niere, Muskel (Musculus quadriceps femoris). Somit war eine schnelle Entnahme und Weiterverarbeitung der entnommenen Gewebe gewährleistet. Dabei wurde eine Verbandsschere nach Lister (Größe 14,5 cm), sowie eine Splitterpinzette nach Feilchenfeld (9,0 cm) verwendet, um eine vorzeitige Verletzung der Organe durch die Scherenspitze zu vermeiden.

2. Material und Methoden

Die Blutentnahme erfolgte mit Hilfe von Sarstedt-Monovetten, welche EDTA als Antikoagulans enthielten. Das gewonnene Blut wurde sofort nach Entnahme zentrifugiert (1000 U/min, 7 min), das Serum abpipettiert und auf Eis gestellt.

2.1.3 Operationsprotokolle

Tab. 6: Darstellung der Operationsprotokolle

Tier	Datum	Gewicht	Alter	Narkosebeginn	OP-Beginn	OP-Ende
1	14.09.2004	500 g	10 Monate	10.26 Uhr	10.30 Uhr	10.45 Uhr
2	14.09.2004	505 g	10 Monate	11.16 Uhr	11.19 Uhr	11.29 Uhr
3	14.09.2004	620 g	10 Monate	11.37 Uhr	11.42 Uhr	11.49 Uhr
4	14.09.2004	540 g	10 Monate	11.59 Uhr	12.02 Uhr	12.09 Uhr
5	14.09.2004	560 g	10 Monate	12.19 Uhr	12.21 Uhr	12.28 Uhr
6	11.02.2005	308 g	6 Monate	9.13 Uhr	9.16 Uhr	9.25 Uhr
7	11.02.2005	312 g	6 Monate	9.44 Uhr	9.47 Uhr	9.53 Uhr
8	11.02.2005	344 g	6 Monate	10.05 Uhr	10.09 Uhr	10.13 Uhr
9	11.02.2005	319 g	6 Monate	10.33 Uhr	10.36 Uhr	10.43 Uhr
10	11.02.2005	300 g	6 Monate	10.52 Uhr	10.54 Uhr	10.59 Uhr
11	11.02.2005	312 g	6 Monate	11.05 Uhr	11.08 Uhr	11.13 Uhr
12	11.02.2005	320 g	6 Monate	11.19 Uhr	11.23 Uhr	11.30 Uhr
13	25.08.2005	648 g	26 Monate	8.31 Uhr	8.36 Uhr	8.45 Uhr
14	25.08.2005	523 g	26 Monate	8.49 Uhr	8.53 Uhr	8.58 Uhr
15	25.08.2005	664 g	26 Monate	9.04 Uhr	9.07 Uhr	9.16 Uhr
16	25.08.2005	657 g	26 Monate	9.18 Uhr	9.20 Uhr	9.26 Uhr
17	25.08.2005	617 g	26 Monate	9.30 Uhr	9.33 Uhr	9.39 Uhr
18	31.08.2005	703 g	18 Monate	8.31 Uhr	8.38 Uhr	8.46 Uhr
19	31.08.2005	630 g	18 Monate	8.48 Uhr	8.52 Uhr	9.00 Uhr
20	31.08.2005	605 g	18 Monate	9.04 Uhr	9.07 Uhr	9.16 Uhr
21	31.08.2005	719 g	18 Monate	9.27 Uhr	9.31 Uhr	9.38 Uhr
22	31.08.2005	646 g	18 Monate	9.41 Uhr	9.44 Uhr	9.51 Uhr
23	31.08.2005	687 g	18 Monate	9.54 Uhr	9.59 Uhr	10.06 Uhr

2. Material und Methoden

2.1.4 Probenkonservierung und Probenaufarbeitung

Die gewonnenen Organe wurden in sechs Teilstücke getrennt, fünf Teilstücke wurden in flüssigem Stickstoff für spätere Untersuchungen konserviert, anschließend im Tiefkühler bei -80 Grad Celsius aufbewahrt. Die maximale Lagerungszeit bis zur jeweiligen Aufarbeitung der Proben für die hier erhobenen Messwerte betrug 48 Stunden.

Eine Organprobe wurde nach der Entnahme sofort mit 500 µl PBS in einem Potter homogenisiert, mit einer Pipette entnommen und auf Eis gestellt, da die Untersuchungen der Proteasomenaktivität noch am selben Tag erfolgen mussten. Die weiteren Organproben für die Analyse der anderen Parameter wurden analog homogenisiert unmittelbar vor den jeweiligen Analysen. Die Blutproben wurden sofort zentrifugiert und das Plasma bei -80 Grad Celsius bis zur Analyse gelagert.

2.2 Proteinbestimmung

2.2.1 Prinzip der Methode

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976), dabei bindet der Farbstoff "Coomassie Brilliant Blue" an Proteine. Im sauren Milieu kommt es dabei zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm. Dabei ist die Absorptionzunahme bei 595 nm ein Maß für die Konzentration der Proteine in der Lösung. Für die Untersuchung wurde das vorgefertigte Reagenz Roti-Quant G250 verwendet, welches den oben genannten Farbstoff, sowie Zusätze von Ethanol und H₃PO₄, gelöst in Wasser enthält. Die Lösung wurde vor Gebrauch in einem Verhältnis von 2:5,5 hergestellt.

Die Proteinkonzentration der Proben konnte dann durch Messung der Absorptionsänderung bei 595 nm und im Vergleich zu einer Standardreihe ermittelt werden.

2.2.2 Benötigte Reagenzien und Geräte

1. BSA-Stammlösung (400 µl/mg) (bovine serum albumin, Fraktion V) (Serva, Heidelberg)
2. Aqua dest.
3. Roti-Quant (Sigma, München)
4. Mikrotiterplatten (Nunc Immuno Plate Maxisorp)

2. Material und Methoden

5. PBS (Sigma, München)
6. Elisa-Reader (SLT, Crailsheim)
7. Eppendorfgefäße (Eppendorf, Hamburg)
8. Falcon-Röhrchen (50 ml) (Falcon, Heidelberg)
9. Eppendorf-Pipetten (Eppendorf, Hamburg)
10. beheiztes Wasserbad
11. Zentrifuge (10000 G) Eppendorf (Eppendorf, Hamburg)
12. Probenschüttler (IKA Labortechnik, Staufen)
13. Magnetrührer (IKA Labortechnik, Staufen)
14. Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY USA)
15. Mikrotiterplatten (96 Wells) (Nunc, Wiesbaden)

Zur weiteren Vorbereitung des eigentlichen Versuches mussten entsprechende Standardverdünnungsreihen erstellt werden. Dazu wurde die BSA-Lösung mit der Konzentration 100 µl/ml aus der Stammlösung (400 µl/ml) hergestellt. Ausgehend davon ließen sich die restlichen Konzentrationen wie in Tabelle 7 angegeben leicht herstellen.

Tab. 7: Pipettierschema der Standardverdünnungsreihe

BSA (µg/ml)	µl aus BSA-Verdünnung	H ₂ O µl
0	-	1000
20	200 µl aus 100 µg/ml	(800)
30	300 µl aus 100 µg/ml	(700)
40	400 µl aus 100 µg/ml	(600)
50	500 µl aus 100 µg/ml	(500)
60	600 µl aus 100 µg/ml	(400)
80	800 µl aus 100 µg/ml	(200)
100	200 µl aus 2000 µg/ml	(3800)

2. Material und Methoden

2.2.3 Versuchsdurchführung

Zuerst wurden die zu vermessenden Proben in 1:200 (2 µl Probe + 398 µl H₂O) sowie in 1:400 Wasser (2 µl Probe + 798 µl H₂O) verdünnt.

Zusätzlich musste ein Ansatz, bestehend aus 2 Anteilen Roti Quant mit 5,5 Anteilen H₂O hergestellt werden.

Anschließend wurden je 50 µl der Standardverdünnungsreihe und der verdünnten Proben in die Wells der Mikrotiterplatten pipettiert sowie 200 µl des Ansatzes, bestehend aus Roti Quant und H₂O. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Mikrotiterplatten wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch vermessen.

Die photometrischen Daten wurden auf die Proteinmenge der jeweiligen Proben bezogen.

2.3 Bestimmung von Malondialdehyd

2.3.1 Prinzip der Methode

Malondialdehyd (MDA) ist ein Abbauendprodukt der O₂-Radikal-induzierten Phospholipidperoxidation in der Zellmembran und kann im Serum bestimmt werden.

Die MDA-Bestimmung erfolgte nach der Methode von *Wong SH et al. 1979*, welche von *Grune und Siems 1992* modifiziert wurde. Im ersten Schritt wird eine Probenvorbereitung mit Derivatisierung durchgeführt, dabei entstehen MDA-TBA-Addukte. In der Derivatisierungsreaktion erfolgt die Umsetzung in ein fluoreszierendes Produkt.

Die Trennung erfolgt mittels HPLC in einem isokratischen Verfahren bei 35 °C auf einer "reversed-phase"-Säule. Die Chromatogramme werden mit einem Fluoreszenzdetektor aufgezeichnet. Die Trennung benötigt ca. 4 Minuten für einen Lauf. Die Quantifizierung erfolgt über den einen Plasma Kalibrator und die Berechnung der Ergebnisse wird über die "externe Standard-Methode" anhand der Peakhöhe durchgeführt. Dadurch wird aus der unspezifischen Methode eine hochspezifische, die den weiteren Verfahren meist deutlich überlegen ist.

2. Material und Methoden

2.3.2 Benötigte Reagenzien und Geräte

1. Phosphorsäure M= 98 g/mol (85 %) , reinst (Merck, Darmstadt)
2. Thiobarbitursäure M= 144,15 g/mol (Merck, Darmstadt)
3. Methanol reinst (Merck, Darmstadt)
4. Natriumhydroxid (1M), (Sigma, München)
5. Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4 : M= 174,18 g/mol), wasserfrei zur Analyse, (Merck, Darmstadt)
6. Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4 : M= 136,09 g/mol), (Merck, Darmstadt)
7. Ethanol absolut reinst (Merck, Darmstadt)
8. Tetraethoxypropan 97 % = Malondialdehyd- bis-(diethylacetal) M= 220,31 g/mol, (Merck, Darmstadt)
9. butyliertes Hydroxytoluol (BHT 1 mM)
10. HPLC-rein, (Merck, Darmstadt)
11. Eppendorfggefäße (Eppendorf, Hamburg)
12. Eppendorf-Pipetten (Eppendorf, Hamburg)
13. beheiztes Wasserbad
14. Zentrifuge (10000 G) Eppendorf (Eppendorf, Hamburg)
15. Probenschüttler (IKA Labortechnik, Staufen)
16. Magnetrührer (IKA Labortechnik, Staufen)
17. Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY USA)

2.3.3 Versuchsdurchführung

Zunächst wurde das zu untersuchende Gewebe mit Hilfe von 150 ml butyliertem Hydroxytoluol homogenisiert und bei 15000 U/min bei 4 Grad Celsius für 5 Minuten zentrifugiert. 50 µl Überstand wurden für die spätere Messung verwendet.

Der nächste Schritt bestand daraus, verschiedene Lösungen für die MDA-Bestimmung herzustellen, da alle Lösungen immer frisch angesetzt werden mussten.

Die Lösung 1 bestand aus 412 µl Phosphorsäure (85 %), aufgefüllt mittels Aqua bidest.

In Lösung 2 wurden 0,3 g TBA mittels Aqua bidest. auf 50 ml aufgefüllt. Die TBA wurde bei 50 Grad Celsius in Lösung gebracht.

In Lösung 3 wurden 4,5 ml Natriumhydroxid (1 M) auf 50 ml Methanol aufgefüllt. Die TBA wurde bei 50 Grad Celsius in Lösung gebracht.

2. Material und Methoden

Die Lösung 4, welche als HPLC-Puffer diente, setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

4,353 g Dikaliumhydrogenphosphat + 3,402 g Kaliumhydrogenphosphat.

Nach Zusammengeben der Komponenten wurde der pH-Wert kontrolliert. Dieser sollte bei pH 6,8 liegen. Gegebenenfalls musste der pH-Wert nachkorrigiert werden. Anschließend wurde die Lösung mittels Aqua bidest. auf 600 ml aufgefüllt und zusätzlich wurden 400 ml Methanol hinzugegeben.

In Lösung 5, welche als Standard diente, wurden 25 µl Malondialdehyd auf 25 ml (1/1000) mittels Ethanol/Aqua bidest. (40/60) aufgefüllt. Aus dieser Lösung wurden wiederum 25 µl entnommen und auf 50 ml Ethanol/Aqua bidest. (40/60) aufgefüllt. Diese Lösung diente dann zur Herstellung der Standards. Weiterhin wurde eine Standardreihe erstellt.

Tab. 8: Pipettierschema der Standardreihe

Probe in µl	H ₂ O in µl
1	499
2,5	497,5
5	495
10	490
25	475
50	450
100	400
200	300

Nach Anfertigen aller oben genannten Lösungen konnte der Ansatz zusammenpipettiert werden:

750 µl Phosphorsäure (Lösung 1) + 50 µl Probe (bzw. Standard = Lsg. 5) + 250 µl TBA (Lsg. 2) + 450 µl Aqua bidest.

Dieser Ansatz musste nun 1 Stunde bei 95-100 Grad Celsius im Wasserbad verbleiben und wurde nach Ablauf der Zeit im Eisbad abgekühlt. Der Ansatz war so für mehrere Stunden haltbar.

Vor Beginn der Analyse wurden die Ansätze mit Methanol-NaOH (Lsg. 3) 1/1 verdünnt, das heißt, es wurden 500 µl Ansatz zu 500 µl Methanol-NaOH hinzugegeben und anschließend bei 15000 U/min bei 4 Grad Celsius für 2 Minuten zentrifugiert.

2. Material und Methoden

Anschließend konnte die MDA-Analyse mittels einer HPLC (High Performance Liquid Chromatography) durchgeführt werden. Hierbei wird nun die Lösung 4 verwendet (HPLC-Puffer).

2.3.4 Technische Daten der HPLC-Apparatur

Säule:	Supelco LC 18; 12,5 x 4,6 mm; 5 µm
Vorsäule:	Supelcoguard LC 18; 2 cm
Pumpe:	Waters 510
Laufmittel:	Phosphatpuffer (Lsg. 4)
Flussrate:	1 ml/min
Probenschleife:	50 µl
Detektor:	Shimadzu (Fluoreszenz) Em = 525 nm; Ex = 550 nm Sensitivity = high Range = 1 response Time = 1,5
Integrator:	Shimadzu C-R6A
Width:	50
Slope:	500
Drift:	2000
Min. Area:	10000 (kleinste Peakgröße, die integriert wird)
T.DBL:	0
Stopp. TM:	6 (Verstärkungsfaktor)
Speed:	5 (Papiervorschub)

2. Material und Methoden

2.4 Bestimmung oxidiertes Proteine/ Carbonyle mittels ELISA

2.4.1 Prinzip der Methode

Immuntechnische Verfahren gehören zu den wirksamsten Methoden in der Biochemie, um Nachweis und Quantifizierungen vieler biologischer Moleküle durchzuführen. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ist mittlerweile ein weit verbreitetes Verfahren, um einzelne Proteine oder Antikörper nachweisen zu können. Ausgenutzt werden dabei Mechanismen des Immunsystems, einen fremden Stoff als solchen zu erkennen und Abwehrstoffe im Sinne von Antikörpern zu produzieren. Diese Antikörper koppeln sich an das fremde Molekül an und markieren dieses, so dass Abwehrzellen des Körpers dieses erkennen und eliminieren können. Diese so genannte Antikörper-Antigen-Reaktion wird für den ELISA-Test genutzt. Wenn ein bestimmtes Protein nachgewiesen werden soll, dann müssen die dazu passenden Antikörper bekannt sein und zuvor mit verschiedenen Verfahren hergestellt worden sein. Wenn das gesuchte Protein in einer Probe vorhanden sein sollte, wird dieses durch die Antigen-Antikörperreaktion, von einem auf dem Trägermedium aufgebracht Antikörper erkannt und gebunden. Dabei wird eine von Enzymen gesteuerte Reaktion ausgelöst, die zu einem sichtbaren Farbniederschlag führt.

Der ELISA wurde nach folgender Literatur durchgeführt: *Buss H et al. 1997 und modifiziert nach Grune T et al. 1999.*

2.4.2 Benötigte Reagenzien und Geräte

1. PBS (Sigma, München)
2. DNP-Puffer (Aufbewahrung bei -20 °C in 5 ml-Aliquots)

6 M Guanidiniumhydrochlorid	(MM: 95,53)	57,32 g (Merck, Darmstadt)
0,5 M K-P-Puffer pH 2,5	(MM: 136,09)	6,8 g auf 100 ml wasserfrei zur Analyse (Merck, Darmstadt)
3. Coating- Puffer (Aufbewahrung bei -20 °C auf pH 7,0 einstellen)

20 mM Na-P-Puffer	Na ₂ HPO ₄	(MM: 141, 96)	0,71 g (Merck, Darmstadt)
	NaH ₂ PO ₄	(MM: 119,98)	0,6 g (Merck, Darmstadt)
140 mM Natriumchlorid		(MM: 58,44)	4,1 g auf 500 ml (Merck, Darmstadt)

2. Material und Methoden

4. Entwicklerlösung (Aufbewahrung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; à 42 ml)

50 mM Dinatriumhydrogenphosphat (MM: 141,96) 0,71 g (Merck, Darmstadt)

24 mM Citronensäure (MM: 210,1) 0,5 g auf 100 ml (Merck,
Darmstadt)

CAVE: Die gebrauchsfertige Lösung muss erst unmittelbar vor Gebrauch durch Zugabe des Substrates o-Phenyldiamin und H_2O_2 hergestellt werden.

5. 2,5 M Schwefelsäure (Merck, Darmstadt)

6. 0,1 % red. BSA (bovine serum albumin) (Aufbewahrung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), Fraktion V (Serva, Heidelberg)

7. Anti-DNP-AK (Kaninchen) (Aufbewahrung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Sigma, München)

1:1000 Verdünnung in 0,1 % red. BSA + 0,1 % Tween 20 (Sigma, Deisenhofen)

CAVE: Unmittelbar vor Gebrauch frisch ansetzen.

8. Anti-Kaninchen-IgG-POD-markierter AK (Aufbewahrung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ als 4 μl -Aliquot) (monoclonaler anti-Rabbit-IgG (γ -chain specific); Sigma, München)

9. 1:10000-Verdünnung in 0,1 % red. BSA + 0,1 % Tween 20

10. Eppendorf-Pipetten (Eppendorf, Hamburg)

11. Falcon-Röhrchen (50 ml) (Falcon, Heidelberg)

12. Eppendorfgefäße (Eppendorf, Hamburg)

13. Probenschüttler (IKA Labortechnik, Staufen)

14. Magnetrührer (IKA Labortechnik, Staufen)

15. Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY USA)

16. ELISA-Platten (96 Wells) (Omnilab, Mettmenstetten)

2. Material und Methoden

2.4.3 Versuchsdurchführung

Die Proteincarbonyle wurden über einen Farbkomplex mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) (Sigma) nachgewiesen. Zuerst musste wiederum eine Standardreihe nach folgendem Pipettierschema angefertigt werden:

Tab. 9: Pipettierschema der Standardreihe

	1	2	3	4
	LW PBS	1 % oxid. BSA	3 % oxid. BSA	5 % oxid. BSA
µl oxid. BSA	0	1	3	5
µl H₂O	100	99	97	95

1. Tag

In einem 1,5 ml Eppendorfgefäß wurden 15 µl Probe bzw. Leerwerte und Standards mit 45 µl einer frisch zubereiteten DNP-Lösung in DNP-Puffer (2 mg/ml) versetzt und durch Vortexen gut gemischt. Für zwei Platten mussten 8 mg Puffer + 4 mg DNP-Lösung gemischt werden. Die Ansätze mussten nun für 45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren. Zwischendurch wurden die Proben nochmals gut durchgemischt.

Nach der Inkubation wurden je 5 µl der oben genannten Inkubationsansätze in 1 ml Coating Puffer in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und gut durchgemischt. Aus diesen Coating-Puffer Proben bzw. Leerwert oder Standardgemischproben wurden 3 x 200 µl Aliquots in die Wells der Mikrotiterplatte überführt. Die befüllten Mikrotiterplatten wurden abgedeckt und über Nacht bei 4 Grad Celsius inkubiert, um die Proteinadsorption am Kunststoff zu gewährleisten

2. Tag

Der Coating-Puffer konnte nun abgegossen werden und die Mikrotiterplatten vorsichtig auf Zellstoff ausgeschlagen werden. Anschließend wurde in jedes Well der Mikrotiterplatte mit einer 8-Kanal Eppendorf-Pipette 250 µl 0,1 % reduziertes BSA eingefüllt (Herstellung reduziertes BSA siehe 2.5). Die Mikrotiterplatten mussten nun nochmals 95 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur geblockt werden. Danach wurde die Blocklösung wie oben beschrieben abgegossen und ausgeschlagen. In jedes Well wurden nun 200 µl DNP-Antikörper mit einer 8-Kanal Eppendorf-Pipette gegeben. Die Mikrotiterplatten mussten nun

2. Material und Methoden

wiederum 60 Minuten bei 37 Grad Celsius im Brutschrank inkubieren. Darauf folgend wurden die Mikrotiterplatten dreimal mit PBS ausgewaschen und ausgeklopft. Pro Platte und Waschgang wurden ca. 30 ml PBS benötigt. Anschließend wurde in jedes Well 200 µl anti IgG-POD markierten Antikörper-Lösung mit einer 8-Kanal Eppendorf-Pipette pipettiert und der Ansatz für 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten wiederum drei Waschgänge mit PBS. Nun wurde in jedes Well 200 µl Entwicklerlösung gegeben und die Exstinktion bei einer Wellenlänge von 492 nm im Plattenreader gemessen, die Wellenlänge des Referenzfilters lag bei 750 nm. Die Entwicklerlösung setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 2 Tabletten o-Phenyldiamin = 20 mg in 10 ml Entwickler aufgelöst, daraus wurden 6 ml entnommen und zu 34 ml Entwicklerlösung, sowie 16 µl H₂O₂ hinzugefügt.

2.5 Herstellung von reduziertem BSA

2.5.1 Benötigte Reagenzien und Geräte

1. Albumin (Sigma, München)
2. PBS (Sigma, München)
3. BSA (bovine serum albumin, Fraktion V) (Serva, Heidelberg)
4. NaBH₄ (Sigma, München)
5. Dialyseschläuche (Ausschlussgröße 6.000 - 8.000 Da) (Spectra/Por Rancho Dominguez, USA)
6. Aqua dest.
7. HCl (Merck, Darmstadt)
8. NaOH (Merck, Darmstadt)
9. BioRad (Bio-Rad, München)
10. Falcon-Röhrchen (50 ml) (Falcon, Heidelberg)
11. Magnetrührer (IKA Labortechnik, Staufen)
12. Bechergläser
13. Phenyldiamin (Merck, Darmstadt)
14. Probenschüttler KS 250 basic (IKA Labortechnik, Staufen)

2. Material und Methoden

2.5.2 Versuchsdurchführung

1. Tag

Zuerst wurden 2,5 mg Albumin in 150 ml PBS in einem hohen und breiten (mindestens 2 Liter) Becherglas gelöst und in einen 10 Liter-Eimer auf Eis und Rührer gestellt, dabei sollte eine Schaumbildung unbedingt vermieden werden. Als die BSA-Lösung auf 0-4 Grad Celsius herunter temperiert war, ist portionsweise NaBH_4 (unter der Abzugshaube), welches unmittelbar vor der Zugabe gelöst wurde, mit einer Pasteurpipette direkt in die leicht gerührte Lösung gegeben worden. Nach Zugabe der letzten Portion NaBH_4 musste der Ansatz noch 60 Minuten auf Eis, leicht rührend, stehen gelassen werden.

Währenddessen wurden 2-3 Dialyseschläuche (Ausschlussgrenze 10000) auf je 35 cm zurechtgeschnitten und anschließend für 20 Minuten in Aqua dest. quellen gelassen.

Nach der Inkubation wurde der BSA-Ansatz mit HCl neutralisiert. Die eingeweichten Dialyseschläuche mussten nun auf einer Seite abgeklemmt werden, damit die BSA-Lösung in die Schläuche eingefüllt werden konnte. Anschließend wurden die Schläuche gut verschlossen, in PBS-Dialysepuffer liegend, bei 4 Grad Celsius auf dem Magnetrührer über Nacht inkubiert. Nach ca. 1,5-2 Stunden musste der Dialysepuffer das erste Mal und vor der Nacht noch ein 2. Mal gewechselt werden.

2. Tag

Am Morgen wurde der pH-Wert der dialysierten reduzierten BSA-Lösung bestimmt und musste gegebenenfalls nochmals auf pH 7,4 (Toleranz +/- 0,05 pH-Einheiten) mittels HCl bzw. NaOH nachgestellt werden.

Anschließend wurde der Proteingehalt mittels BioRad-Reagenz bestimmt und BSA-Lösung wie folgt mit PBS eingestellt:

Blocklösung: 0,1 % = 1 g/Liter

Die fertige Lösung wurde nun auf 50 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert und bei -80 Grad Celsius aufbewahrt, um Oxidationsprozesse zu vermeiden.

2. Material und Methoden

2.6 Bestimmung der 20S-Proteasomen-Aktivität (Suc-LLVY-MCA-Peptidase-Aktivität) von Zell-Lysaten:

2.6.1 Prinzip der Methode

Das Prinzip der angewandten Methode beruht auf der Eigenschaft bestimmter Substrate des Proteasoms, nach Abbau durch das Proteasom zu fluoreszieren.

Gibt man die so genannten fluorogenen Substrate im Überschuss zu isolierten Proteasomen bzw. Zelllysaten, so ist die messbare Fluoreszenz proportional zur Aktivität des Proteasoms.

Das verwendete Substrat bei dieser Aktivitätsbestimmung war Suc-LLVY-MCA Fluoropeptidsubstrat 2 mM (Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-4 Methyl-7-Coumarylamid) von Bachem.

2.6.2 Benötigte Reagenzien und Geräte

1. 450 mM Tris (Trizma base Reagent Grade; minimum 99,9 % titration, Sigma, München)
2. 90 mM KCl (Potassium chloride, Sigma ultra, Minimum 99,0 %, Sigma, München)
3. 15 mM Mg-Acetat x 4 H₂O (Riedel de Haine)
4. 15 mM MgCl₂ x 6 H₂O (Fluka)
5. 0,5 M DTT-Stammlösung (Sigma, München)
6. Hexokinase (zum ATP-Verbrauch) 1 mg/ml (Sigma, München)
7. Suc-LLVY-MCA Fluoropeptidsubstrat 2 mM (Succinyl- Leucin- Leucin- Valin- Tyrosin-4-Methyl-7-Coumarylamid (Bachem, Weil am Rhein)
8. Probenschüttler (IKA Labortechnik, Staufen)
9. Magnetrührer (IKA Labortechnik, Staufen)
10. Eppendorfgefäße 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)
11. Falconröhrchen (50 ml) (Falcon, Heidelberg)
12. Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY USA)
13. Mikrowaage

2. Material und Methoden

2.6.3 Versuchsdurchführung

Die gewonnenen und gepotterten Proben wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben, zentrifugiert und der Überstand mittels einer Eppendorf-Pipette abgenommen.

Danach wurden die Stammixe und der 3 x 26S Puffer hergestellt:

3 x 26S Inkubationspuffer

	100 ml Ansatz	250 ml Ansatz
450 mM Tris	5,451 g	13,628 g
90 mM KCl	0,671 g	1,678 g
15 mM Mg- Acetat x 4 H ₂ O	0,322 g	0,804 g
15 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,305 g	0,762 g

Alle Stoffe wurden in entsprechender Menge zusammengegeben, auf 200 ml Aqua dest. aufgefüllt, der pH-Wert auf 8,2 eingestellt und anschließend auf 250 ml aufgefüllt.

Anschließend wurde der Puffer in 2 ml Eppendorfgefäße a 1,5 ml Puffer aliquotiert und bei -20 Grad Celsius eingefroren.

pH = 8,2 einstellen (entspricht pH = 7,8 bei 37° C)

3 mM DTT immer frisch dazu geben

Stammix: jeweils 3 Werte pro Probe (120 µl pro Well) + 2 Reserve

2. Material und Methoden

Tab. 10: Pipettierschema: *Angaben in μl*

ATP-depletiertes System	2 Proben	3 Proben	4 Proben	5 Proben	6 Proben	8 Proben	10 Proben	20 Proben
3 x 26S Puffer	266,4	366,3	466,2	566,1	666	865,8	1065,6	2064,6
DTT (0,5 mM)	1,6	2,2	2,8	3,4	4	5,2	6,4	12,4
H ₂ O	532	731,5	931	1130,5	1130	1729	2128	4123
Stammix	100 μl Vol pro Well							

Tab. 11: Reaktionsansatz: jeweils **3fach-Werte** mit je 120 μl

	ATP (pro Well)
Zell-Lysat	10 μl
3 x 26S-Puffer	33,3 μl
DTT (0,5 M Stammlsg.)	0,2 μl
H ₂ O	66,5 μl
2- Deoxyglucose (200 mM stock)	-
Hexokinase	-
Reaktionszeit	10 min stehen lassen
ATP (100 mM Stammlsg.)	-
Suc-LLVY-MCA (2 mM Stammlsg.) Fluoropeptidsubstrat	10 μl
Gesamtvolumen	120 μl

Für diesen Versuch durften nur frische Proben verwendet werden. Der Versuch musste also am Tag der Organentnahme erfolgen, des Weiteren musste immer auf Eis gearbeitet werden. Auch hier musste vor Beginn der Versuchsreihe eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittels der Bradfordmethode (2.2) erfolgen. In der Regel wird mit der Konzentration 1 mg / 120 μl gearbeitet, man kann jedoch auch mit weniger messen (0,2 mg / 120 μl).

Zuerst wurden die Stammixe hergestellt, anschließend konnten die Reaktionsansätze in die Wells der Mikrotiterplatten pipettiert werden (siehe o.g. Pipettierschema). Wichtig war, dass

2. Material und Methoden

man drei Mikrotiterplatten verwendete, also für +ATP, -ATP und für das depletierte System jeweils eine und diese gut markierte. Es wurden jeweils Dreifach-Messungen durchgeführt.

Es wurde 10 µl Probe in jedes Well gegeben, anschließend wurden der vorher angefertigte 3 x 26S Puffer, die 0,5 M DTT-Stammlösung, H₂O, die 2-Desoxyglucose und die Hexokinase hinzugegeben. Die Mikrotiterplatten mussten nun kurz auf den Plattenschüttler und danach 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

Danach wurde ATP in die Mikrotiterplatte für den Nachweis des 26S-Proteasoms in die +ATP Platte gegeben und darauf folgend wieder in alle Platten 10 µl Peptid [Suc-LLVY-MCA (2 mM Stammlsg.)]. Jetzt wurden die Platten vorsichtig in Aluminiumfolie eingeschlagen und für 60 Minuten bei 37 Grad Celsius im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubationszeit erfolgte die Messung am Plattenreader Fluorometer mit einem Wellenlängenpaar von 390/460 nm.

2.6.4 Auswertung der Messergebnisse

- Aufstellung der MCA-Fluoreszenz-Eichkurve gegen MCA
- Ermittlung der Steigung der Geraden durch den Nullpunkt (Fluoreszenz pro µM MCA)

Formel zur Berechnung der Proteasomenaktivität:

$$\frac{\text{Aktivität in } \mu\text{mol gemessener Fluoreszenzwert} \times \text{Volumen}}{\text{mg} \times \text{min Rk-Zeit (min)} \times \text{Proteingehalt im Ansatz } (\mu\text{g}) \times \frac{\text{Fluores}}{\mu\text{M MCA}}}$$

2.7 Gelelektrophorese

2.7.1 Prinzip der Methode

Beim Beladen der Proteine wurden die Proteine mit SDS gemischt und danach aufgeköcht (U. K. Laemmli 1970). Die Gelelektrophorese wurde nach dem Prinzip von Laemmli durchgeführt, mit einer Modifikation der SDS-Konzentration im Sammelgelpuffer. Das Natriumdodecylsulfat (SDS) überlagert die Eigenladung und bindet proportional zum Molekulargewicht an die Proteine. Dabei verleiht es den Proteinen eine negative Außenladung. Die negativ geladenen Proteine wandern nun durch das Polyacrylamidplattengel in Richtung der Anode. Kleine Proteine wandern dabei schneller

2. Material und Methoden

durch die Poren des Gels als größere, das heißt die Proteine werden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, dementsprechend befinden sich kleinere Proteine nach Abschluss der Elektrophorese näher an der Anode als vom Molekulargewicht her größere. Zunächst müssen die für die Gelelektrophorese benötigten Träger- und Sammelgele hergestellt werden.

2.7.2 Benötigte Reagenzien und Geräte

1. Aqua bidest.
2. PAA-Stammlösung (Roth, Karlsruhe)
3. SDS-Trenngelpuffer aus:
 - 1,5 M Tris, pH 8,8 (mit HCl) (Sigma, München),
 - 0,6 % SDS (Merck, Darmstadt)
4. SDS-Sammelgelpuffer aus:
 - 0,5 M Tris, pH 6,8 (mit HCl) (Sigma, München),
 - 0,6 % SDS (Merck, Darmstadt)
5. APS 10 % (Ammoniumpersulfat) (Biomol, Hamburg)
6. N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED (Sigma, München)
7. Bromphenolblau (Bio-Rad, München)
8. Beta-Mercaptoethanol (5 %) (Merck, Darmstadt)
9. Glycin (Biomol, Hamburg)
10. Tris Base (Merck, Darmstadt)
11. SDS (Merck, Darmstadt)
12. Glycerol (Sigma, Deisenhofen)
13. Probenschüttler (IKA Labortechnik, Staufen)
14. Eppendorfggefäße 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)
15. BioRad Kammer (BioRad Laboratories, Richmond, USA)
16. Magnetrührer (IKA Labortechnik, Staufen)
17. Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY USA)

2. Material und Methoden

2.7.3 Herstellung der Puffer

Tab. 12: Herstellung des SDS-Laufpuffers

Glycin	144 g
Tris Base	30,3 g
SDS	10 g ad 1000 ml Aqua dest.

Tab. 13: Herstellung des Laufpuffers für die Gelelektrophorese

SDS Laufpuffer	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Tab. 14: Herstellung des Probenpuffers

0,5 Tris Base (pH 6,8)	1,25 ml
SDS (10 %)	5 ml
NaEDTA (50 mM)	85 μ l
Bromphenolblau (0,2 %)	250 μ l
Glycerol	5 ml

Tab. 15: Herstellung des SDS-Trenngelpuffers (pH 8,8)

Tris (1,5 M)	9,09 g
SDS (0,4 %)	0,2 g

Das Ganze auf 30 ml mit Aqua bidest. auffüllen und mit HCl (1 M) den pH-Wert auf 8,8 titrieren, und dann auf 50 ml auffüllen.

2. Material und Methoden

Tab. 16: Herstellung des Sammelgelpuffers (pH 6,8)

Tris (0,5 M)	3,03 g
SDS (0,8 %)	0,4 g

Auf 30 ml mit Aqua bidest. auffüllen mit HCl (1 M) den pH Wert auf 6,8 titrieren, und dann auf 50 ml auffüllen.

2.7.4 Herstellung der Gele

Tab. 17: Pipettierschema Sammelgel (pH 6,8)

Zusatz	4 %	5 %	7 %
<i>Aqua bidest.</i>	3,80 ml	3,65 ml	3,275 ml
PAA-Stammlösung (40 %)	600 µl	750 µl	1,05 ml
SDS-Trenngelpuffer (4 x)	1,50 ml	1,50 ml	1,50 ml
APS 10 %	30 µl	30 µl	30 µl
TEMED 10 %	70 µl	70 µl	70 µl
Gesamtvolumen	6 ml	6 ml	6 ml

Geldicke: 0,75 mm

Tab. 18: Pipettierschema Trenngel (pH 8,8)

Zusatz	7,5 %	10 %	12 %	15 %	20 %
<i>Aqua bidest.</i>	5,565 ml	4,94 ml	4,44 ml	3,69 ml	2,44 ml
PAA-Stammlösung (40 %)	1,875 ml	2,50 ml	3,00 ml	3,75 ml	5,00 ml
SDS-Trenngelpuffer (4 x)	2,50 ml	2,50 ml	2,50 ml	2,50 ml	2,50 ml
APS 10 %	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED 10 %	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Gesamtvolumen	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

Geldicke: 0,75 mm

2. Material und Methoden

2.7.5 Versuchsdurchführung

Zuerst wurde das Trenngel zwischen die beiden Glasplatten der Kammer aufgetragen, vorsichtig Aqua bidest. darüber geschichtet und anschließend wurde 20 Minuten gewartet werden, bis das Trenngel polymerisiert war, das Aqua bidest. wurde entfernt und das Sammelgel aufgetragen. Wiederum musste 20 Minuten gewartet werden bis das Sammelgel polymerisiert war. Darauf folgend begann die Probenvorbereitung. Zu dem Probenpuffer wurde Beta-Mercaptoethanol hinzugegeben, um Disulfidbrücken zu spalten, so dass die über Disulfidbrücken stabilisierte Konformation zerstört wurde, beziehungsweise über Disulfidbrücken verbundene Proteinkomplexe in Einzelbestandteile zerfallen. Anschließend wurden 20 µg Probe und 5 µg Probenpuffer in ein Eppendorfgefäß gegeben. Anschließend wurden die Probe 10 Minuten und der Marker Bromphenolblau (welcher schon im Probenpuffer enthalten war) 5 Minuten bei 95 Grad Celsius auf dem Schüttler gekocht.

In der Zwischenzeit wurde die Gelapparatur laut Angaben des Herstellers (BioRad Laboratories, Richmond, USA) zusammengebaut und mit dem vorher hergestellten Laufpuffer einmal gefüllt. Nun konnte der Kamm vorsichtig entfernt und die Geltaschen vorsichtig mit Laufpuffer gespült werden, dabei musste darauf geachtet werden, dass alle Gelreste aus den Taschen entfernt wurden. Nun konnten die gekochten Proben mit Hilfe einer Auftragshilfe und einer Hamiltonpipette in die Taschen eingefüllt werden.

Anschließend konnte die elektrophoretische Auftrennung beginnen, wobei das Gel zuerst für 20 Minuten bei 50 V lief, bis die Proben vollständig vom Sammelgel ins Trenngel gelaufen waren, erst danach wurde die Voltzahl auf 150 V erhöht und das Gel für 90 Minuten laufen gelassen. Dabei war darauf zu achten, dass die Laufzeit des Gels von seinem Acrylamidgehalt abhängig ist. Je höher die Konzentration des Acrylamids war, desto länger musste die Laufzeit sein.

2. Material und Methoden

2.8 Western Blot

2.8.1 Prinzip der Methode

Als Western Blot bezeichnet man den elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran. Er dient dem Nachweis von bestimmten Proteinen und Proteinveränderungen. Das Verfahren ist auf Edwin Southern zurückzuführen. Dieser hat 1975 die Methode für die Auftrennung von DNA-Fragmenten und nachfolgender Hybridisierung als Southern Blot eingeführt. In Anlehnung an den Namen Edwin Southern wurde das Bloten von Proteinen als Western Blot bezeichnet.

Bevor der eigentliche Blotvorgang beginnen kann, müssen die Proteine mittels einer Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe und Ladung aufgetrennt werden. Nachdem die Proteine aufgetrennt wurden, wurden diese von der Gelmatrix mittels Elektrophorese auf eine Trägermembran übertragen und erst dann konnte das eigentliche Blotting beginnen. Dabei werden die freien Bindungsstellen auf der Membran, welche nicht von Proteinen besetzt wurden, mittels Milchpulver, BSA, Gelatine oder anderen Proteinen besetzt. Würden diese freien Bindungsstellen nicht besetzt werden, so könnten sich Antikörper darauf setzen und der spezifische Nachweis von Antigenen wäre unmöglich. Anschließend wird die Membran mit einer verdünnten Antikörperlösung I behandelt. Die Antikörper dieser Lösung sind spezifisch auf das Protein der Membran gerichtet. Darauf folgend wird die Membran gewaschen, um schwach anhaftende, unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Erst danach wird eine weitere Antikörperlösung II auf die Membran gegeben. Diesmal sind die Antikörper der Lösung II spezifisch auf die Antikörper der Lösung I. Wiederum erfolgt anschließend ein Waschvorgang, worauf anschließend die Visualisierung stattfindet. Bei Enzym-Antikörper-Konjugaten wird durch das Enzym eine Farb- oder Chemilumineszenzreaktion katalysiert, sehr häufig wird dabei die Meerrettich-Peroxidase verwendet. Dieses Enzym koppelt an den sekundären Antikörper und katalysiert so die Umsetzung von Luminol. Weiterhin werden auch alkalische Phosphatasen, welche mittels einer Farbreaktion nachgewiesen werden, sowie radioaktiv markierte sekundäre Antikörper angewendet. Diese werden durch Audiographie auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht bzw. sekundäre Antikörper mit Fluoreszenzkonjugaten mit Scannern gelesen und quantifiziert.

2. Material und Methoden

2.8.2 Benötigte Reagenzien

1. Glycin (Merck, Darmstadt)
2. Tris Base (Merck, Darmstadt)
3. Aqua bidest.
4. Transferpuffer (siehe 2.7.2)
5. Methanol (20 %) (Merck, Darmstadt)
6. Magermilchpulver (Merck, Darmstadt)
7. PBST (PBS (Sigma, München))
8. Tween (0,1 % (Aldrich))
9. FCS (Seromed Biochrom KG, Berlin)
10. Blot-Papier (Schleicher & Schuell, Düren)
11. Filterpapier (Whatman, Maidstone, UK)
12. Glasschale
13. BioRad-Kammer (BioRad Laboratories, Richmond, USA)
14. Probenschüttler (IKA Labortechnik, Staufen)
15. Magnetrührer (IKA Labortechnik, Staufen)
16. Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)

2.8.3 Herstellung der Komponenten

Tab. 19: Herstellung des Fertigpuffers für den Blot

Transferpuffer aus: 114 g Glycin, 30,3 g Tris Base, aufgefüllt mit Aqua bidest. auf 1000 ml	50 ml
Methanol	100 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Tab. 20: Herstellung des Blockers: Magermilchpulver 5 %

Magermilchpulver	2,5 g
PBST	ad 50 ml

2. Material und Methoden

Tab. 21: Herstellung des FCS 5 %

FCS	2,5 g
PBST	ad 50 ml

2.8.4 Versuchsdurchführung

Die Membran mit den mittels der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinen wurde mit Methanol angefeuchtet und für 15 Minuten auf dem Schüttler mit Aqua bidest. gewaschen. Danach konnte die Herstellung des Sandwichs für die Blotapparatur beginnen. Vorher allerdings mussten die vier Lagen Filterpapier sowie die Membran mit dem Transferpuffer angefeuchtet werden. Bei der Zusammenstellung des Blotsandwiches musste darauf geachtet werden, dass zwischen den einzelnen Lagen die Luftblasen entfernt wurden.

Tab. 22: Darstellung Sandwich

Filterpapier 2 x
Membran
Gel (Achtung Richtung)
Filterpapier 2 x

Das fertige Sandwich musste nun nochmals mit etwas Transferpuffer übergossen werden, dann konnte die Kammer geschlossen werden und der Blot für 25 Minuten bei 15 Volt laufen gelassen werden. Dabei fand ein elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf die Trägermembran statt. Danach wurde das Sandwich vorsichtig auseinander genommen und die Membran für die Weiterverarbeitung in eine Glasschale gelegt.

Als nächster Schritt stand das Blocken der Membran an. Darunter versteht man das Besetzen von freien Bindungsstellen auf der Membran. Das Blocken der Membran fand mittels Magermilchpulver statt. Anschließend wurde der primäre Antikörper, welcher für 1 Stunde, bei Raumtemperatur auf dem Schüttler, auf die Membran gegeben. Danach stand ein Waschvorgang mit PBST an und anschließend wurde der sekundäre Antikörper für 1 Stunde ebenfalls bei Raumtemperatur auf dem Schüttler, auf die Membran gegeben. Auch hier mussten 2-3 Waschgänge mittels PBST folgen.

2. Material und Methoden

Als letzter Schritt erfolgte die Entwicklung mittels ECL (enhanced chemilumineszenz). Diese ECL-Reaktion ermöglicht eine sensitive Detektion von Proteinen.

2.9 Carbonyl Blot

2.9.1 Prinzip der Methode

Der Carbonyl Blot beruht ebenso wie der Western Blot und andere Blotting-Verfahren auf einer elektrophoretischen Auftrennung der Proteine vor dem eigentlichen Blotting-Verfahren (Nähere Erläuterungen siehe Western Blot).

2.9.2 Benötigte Reagenzien

1. DNPH (20 mM) (Merck, Darmstadt)
2. Trifluoressigsäure (10 %) (Merck, Darmstadt)
3. SDS (Sigma, München)
4. Tris Base (2,5 mM) (Merck, Darmstadt)
5. Glycerol (25 %) (Merck, Darmstadt)
6. Beta-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
7. Glycin (19,2 mM) (Merck, Darmstadt)
8. Aqua dest.
9. Eppendorfgefäße 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)
10. Tischmixer Vortex- Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)
11. Eppendorf-Pipetten (Eppendorf, Hamburg)
12. Eppendorf-Zentrifuge 10000 x g (Eppendorf, Hamburg)
13. Bromphenolblau (0,1 %) (Merck, Darmstadt)
14. Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)
15. Blot-Papier (Schleicher& Schuell, Düren)
16. Filterpapier (Whatman, Maidstone, UK)

2. Material und Methoden

2.9.3 Herstellung der Komponenten:

Tab. 23: Herstellung der DNPH-Lösung:

(20 mM DNPH in 10 % Trifluoressigsäure)

DNPH	39,6 mg
Trifluoressigsäure	1 ml
Aqua dest.	9 ml

Tab. 24: Herstellung der SDS-Lösung:

(24 % SDS in Aqua dest.)

SDS	24 g
Aqua dest.	100 ml

Tab. 25: Herstellung der Tris-Lösung:

(2 M Tris Base in 30 % Glycerol und 19 % Beta-Mercaptoethanol)

Tris Base	2,42 g
Glycerol	3 ml
Beta-Mercaptoethanol	1,9 ml
Aqua dest.	ad 10 ml

Tab. 26: Herstellung des SDS-Laufpuffers:

Glycin	144 g
Tris Base	30,3 g
SDS	10 g ad 1000 ml Aqua dest.

Tab. 27: Herstellung des Laufpuffers für die Gelelektrophorese:

SDS Laufpuffer	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

2. Material und Methoden

2.9.4 Versuchsdurchführung

Die zu untersuchenden Proben mussten jeweils mindestens eine Konzentration von 0,5 mg/ml haben (Konzentrationsmessung siehe Bradford-Methode 2.2). Um die Proben zu derivatisieren, wurden die folgenden - bereits vorher hergestellten - Komponenten in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß zusammengegeben; 50 µl Probe + 50 µl SDS-Lösung + 100 µl DNPH-Lösung. Die Lösung musste nun gründlich gemischt und anschließend für 5 Minuten zentrifugiert werden. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten, im Dunkeln und bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde die Lösung mit der angefertigten Tris-Lösung neutralisiert, wobei die Tris-Lösung (ca. 50-100 µl) tropfenweise hinzu gegeben wurde, bis sich eine Orangefärbung der Lösung zeigte.

Nachdem die Lösung den richtigen pH Wert besaß, konnte die SDS-Gelelektrophorese beginnen.

Dabei wurden 12,5 % Trenngel und 7,5 % Sammelgel zusammengegossen und der Marker für 5 Minuten bei 95 Grad Celsius auf dem Schüttler gemischt. Die Proben und der Marker wurden anschließend auf das Gel gegeben und dieses wurde dann für 20 Minuten bei einer Spannung von 70 Volt laufen gelassen. Darauffolgend musste das Gel für 60 Minuten bei 150 Volt laufen, bis die Lauffront gerade herausgelaufen war. Dann wurde der Lauf gestoppt und der eigentliche Blotvorgang konnte beginnen.

2.10 Statistische Untersuchungen

Die normale Verteilung der Daten wurde unter Verwendung des One-sample Kolmogorov-Smirnov-Tests bewertet. Der doppelseitige t student-Test für unabhängige Beispiele wurde ausgewählt, um die Signifikanz der erhaltenen Resultate zu bestimmen. Zusätzliche statistische Tests durch ANOVA, unter Verwendung von post hoc-Statistiken (Bonferroni/Dunnet T3) ergaben vergleichbare Resultate. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS (firmware 15.0) durchgeführt.

3. Resultate

3. Resultate

3.1 Ergebnisse der MDA-Bestimmungen

Die Abbildungen 8-14 zeigen den altersabhängigen Verlauf der MDA-Werte in Herz, Blut, Lunge, Milz, Niere, Muskel und Leber. Die gemessenen Einzelwerte werden im Anhang dokumentiert (die n-Zahlen der Altersgruppen sind: Gruppe 1: 6 Monate alte Ratten mit n=7, Gruppe 2: 10 Monate alte Ratten mit n=5, Gruppe 3: 18 Monate alte Ratten mit n=6 und Gruppe 4: 26 Monate alte Ratten mit n=5; somit n gesamt = 23 Tiere). Mittelwerte (jeweils blaue Säule) und SEM (jeweils rote Säule) der 4 Altersgruppen in nmol/mg Protein.

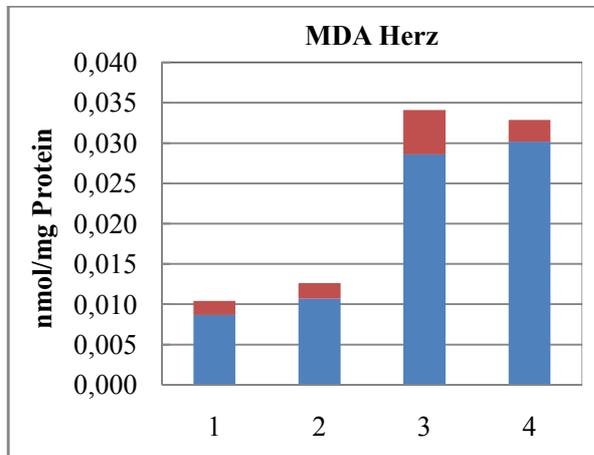


Abb. 8: MDA im Herzen

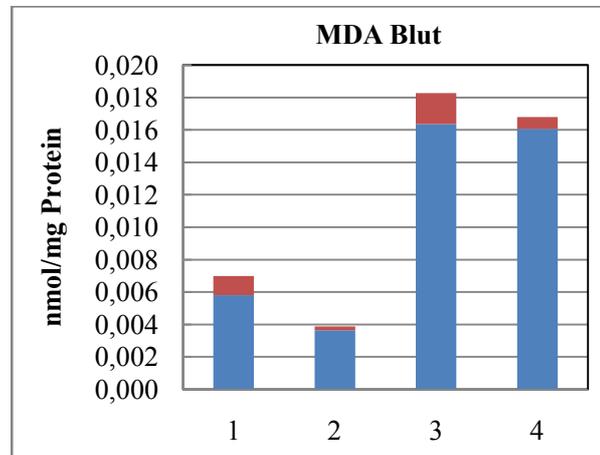


Abb. 9: MDA im Blut

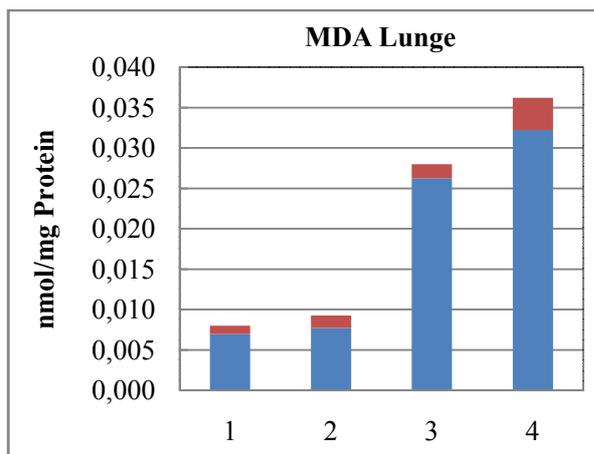


Abb. 10: MDA in der Lunge

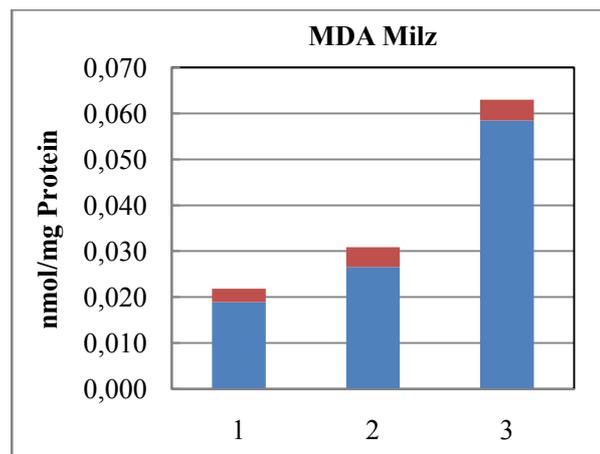


Abb. 11: MDA in der Milz

3. Resultate

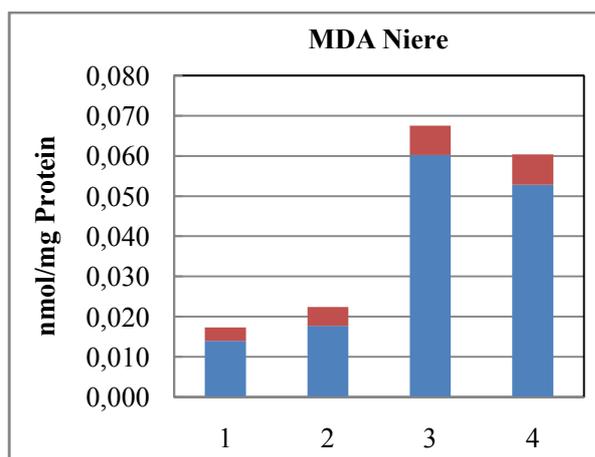


Abb. 12: MDA in der Niere

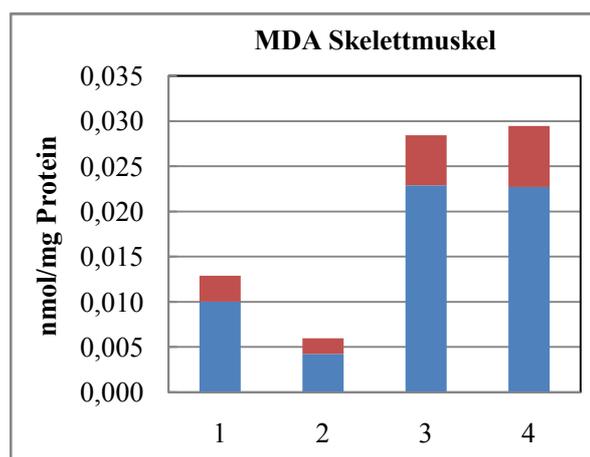


Abb. 13: MDA im Skelettmuskel

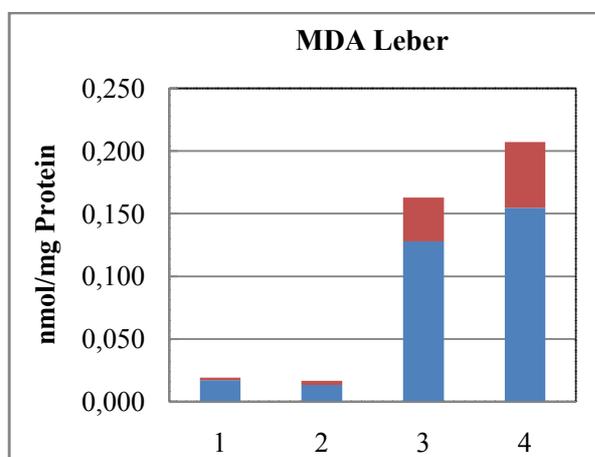


Abb. 14: MDA in der Leber

Die MDA-Konzentrationen steigen von Altersgruppe zu Altersgruppe an, wobei im Herzen (Abb. 8), in der Lunge (Abb. 10) und in der Leber (Abb. 14) im 26. Monat die höchsten Mittelwerte erreicht werden. In der Niere (Abb. 12) und im Skelettmuskel (Abb. 13) sowie im Blut (Abb. 9) werden die höchsten Mittelwerte im 18. Monat erreicht.

Im Muskel (Abb. 13) und im Blut (Abb. 9) sind auch im 6. Monat höhere MDA-Werte als im 10. Monat vorhanden. In der Leber (Abb. 14) sind die Werte des 6. und 10. Monats etwa gleich groß, steigen dann aber altersabhängig wie in den anderen Geweben an. In der statistischen Bearbeitung zeigt sich eine deutliche Signifikanz hinsichtlich der Werte des 18. Monats im Vergleich zu den Werten des 10. Lebensmonats. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten betragen für die Organe Lunge, Milz, Niere und Blut $p < 0,005$ bzw. $p < 0,05$ für die Organe Leber, Muskel und Herz. Der Vergleich des 18. Monats mit dem 6. Lebensmonat zeigt folgende Irrtumswahrscheinlichkeiten: Lunge, Milz, Niere und Blut $p < 0,005$, sowie $p < 0,05$ in dem Herzen und der Leber. Weiterhin zeigen sich deutliche Signifikanzen des 26. Monats im Vergleich zum 6. Lebensmonat. Dabei beträgt die Irrtumswahrscheinlichkeit in den

3. Resultate

Organen Niere und Blut $p < 0,005$ sowie $p < 0,05$ in Herz und Lunge. Keinerlei Signifikanzen zeigen sich im Vergleich zum 18. Lebensmonat. *Auflistungen der statistischen Ergebnisse zusätzlich im Anhang*

3.2 Carbonyl-Bestimmungen

Um den Zusammenhang von Alterung und Proteinoxidation zu untersuchen, wurde der Proteincarbonylgehalt im Plasma und den unterschiedlichen Geweben in Ratten der verschiedenen Altersgruppen (6, 10, 18, 26 Monate) gemessen. Die Abbildungen 15-19 zeigen den altersabhängigen Verlauf der Carbonyl-Werte in Herz, Lunge, Leber, Niere und Skelettmuskel. Die gemessenen Einzelwerte werden im Anhang dokumentiert. Die n-Zahlen der Altersgruppen sind:

Gruppe 1: 6 Monate alte Ratten mit $n=7$,

Gruppe 2: 10 Monate alte Ratten mit $n=5$,

Gruppe 3: 18 Monate alte Ratten mit $n=6$ und

Gruppe 4: 26 Monate alte Ratten mit $n=5$;

somit n gesamt = 23 Tiere. Angegeben werden die Mittelwerte und die S.D. der 4 Altersgruppen in nmol/mg Protein.

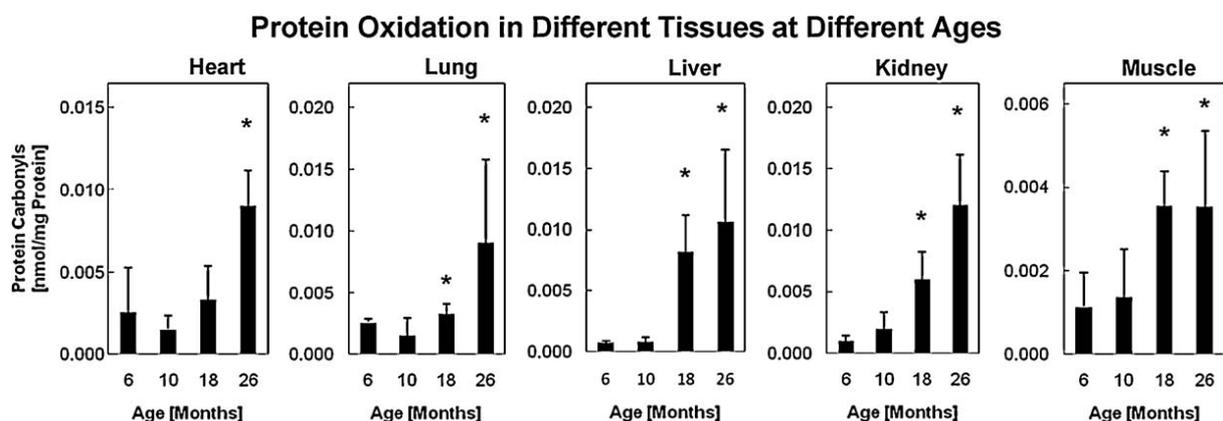


Abb. 15-19: Protein Oxidation in Different Tissues at different Ages (*Abb. übernommen aus Breusing et al. 2009*)

Man beobachtet einen altersabhängigen Anstieg der Proteinoxidation, gemessen über die Konzentration der Carbonyle. Dieser Anstieg erfolgt kontinuierlich in den Organen Lunge (Abb. 16) und Niere (Abb. 18). In der Leber (Abb. 17) sind die Werte der Carbonylkonzentrationen in den 6 und 10 Monate alten Ratten identisch. Für das Herz (Abb.

3. Resultate

15) wird ein leichter Mittelwertabfall vom 6. zum 10. Monat gemessen. Der Mittelwert der Carbonyle ist dann im 18. Monat wieder deutlich höher als im 10. Monat.

Im Herzen werden im 26. Monat wieder die Höchstwerte erreicht, im Skelettmuskel schon im 18. Lebensmonat. Obgleich die Proteincarbonylgehalte zwischen den 6 und 10 Monate alten Ratten in allen Geweben nur gering variierten, erhöhten sie sich signifikant in der Leber, Lunge, Niere und Skelettmuskel bei den 18 Monate alten Tieren ($p < 0,05$; vs. 6 Monate alte Tiere). Die Proteincarbonylkonzentrationen der 26 Monate alten Tiere waren in jedem Organ und auch im Plasma signifikant höher als bei den 6 Monate alten Ratten ($p < 0,05$).

Der Vergleich des 18. Monats mit dem 10. Lebensmonat zeigte in der Leber und dem Muskel Werte von $p < 0,005$ sowie $p < 0,05$ in der Niere.

Auflistungen der statistischen Ergebnisse zusätzlich im Anhang

Die Resultate zeigen insgesamt einen altersabhängigen Anstieg der Proteinoxidation in den verschiedenen Organen der Ratten. Die relativen Veränderungen des Proteincarbonylgehaltes in den untersuchten Geweben werden in Abb. 20 Teil A gezeigt. Die Raten der Proteinoxidation waren am höchsten in Leber und Niere (13-15 fach), während Herz und Skelettmuskel einen kleineren Anstieg zeigten (ca. 3 fach). Um zu untersuchen, ob der Anstieg im Carbonylgehalt der verschiedenen Gewebe auf die Carbonylierung eines einzelnen Proteins oder einiger weniger Proteine zurückzuführen ist, untersuchten wir zusätzlich die Proteincarbonyle mit Hilfe von Immunoblotanalysen in den besonders jungen (6 Monate) und den besonders alten (26 Monate) Ratten. Die Abb. 20 Teil B zeigt die gewebsspezifischen Immunoblots mit Proteinbanden zwischen 25 und 75 kDa. Wie erwartet, stiegen die Carbonylspiegel in allen untersuchten Geweben, diese waren nicht zurückzuführen auf die Carbonylierung eines einzelnen Proteins.

3. Resultate

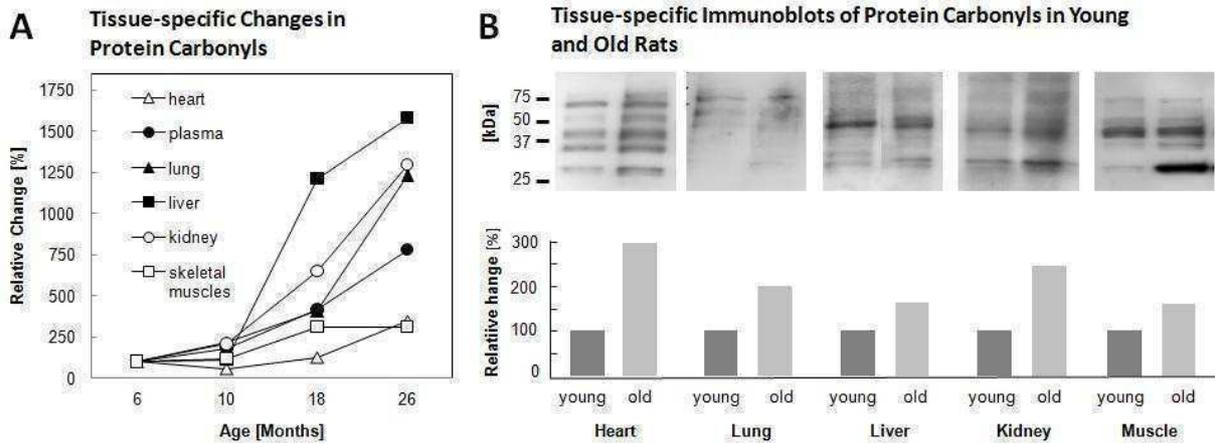


Abb. 20: Gewebespezifische Veränderungen des Proteincarbonylgehaltes (Teil A) und gewebespezifische Immunoblots der Proteincarbonyle (Teil B) in jungen und alten Ratten (Abb. übernommen aus Breusing et al. 2009)

3.3 20S-Proteasom-Aktivitätsbestimmung

Um den Effekt der Gewebsalterung auf die Geschwindigkeit des Proteinabbaus zu messen, wurde die chymotrypsinähnliche Proteasomenaktivität in allen Geweben jeder Altersgruppe bestimmt. Die Resultate der Messungen werden in den Abbildungen 21-25 gezeigt:

Herz (Abb. 21), Lunge (Abb. 22), Leber (Abb. 23), Niere (Abb. 24) und Skelettmuskel (Abb. 25)

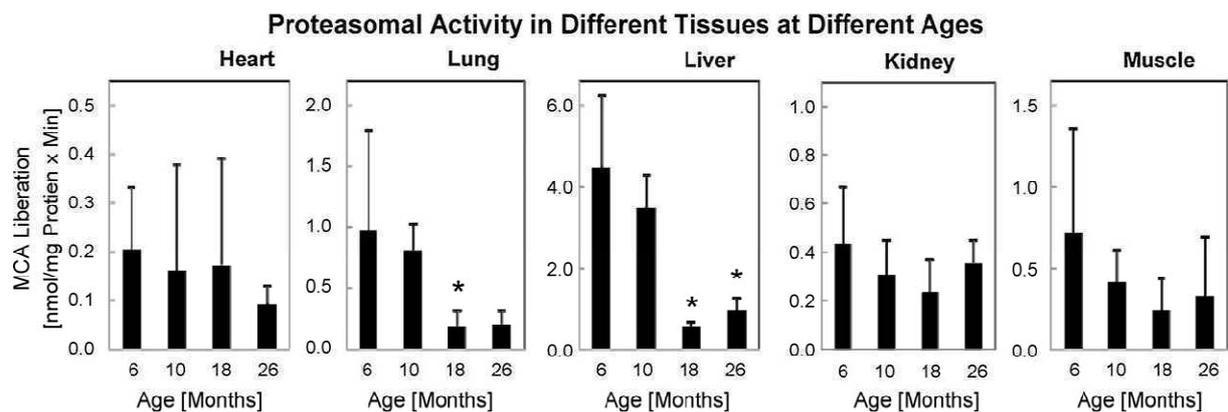


Abb. 21-25: Proteasomal Activity in Different Tissues at Different Ages (Abb. übernommen aus Breusing et al. 2009) Die Einzelwertdokumentation erfolgt wiederum im Anhang.

Beim 20S-Proteasom findet man insgesamt einen starken altersabhängigen Abfall. Dieser ist auf jeden Fall bis zum 18. Monat vorhanden. Eine Ausnahme bildet lediglich das Herz (Abb. 21), in dem im 18. Monat ein höherer Mittelwert im Vergleich zum 10. Monat vorliegt.

3. Resultate

Außerdem sind die Aktivitäten des Proteasoms in allen Organen – außer im Herzen – im 26. Monat höher als im 18. Monat. Dies betrifft Mittelwertunterschiede, aber keine statistischen Signifikanzen. Der deutlichste altersabhängige Abfall in der proteasomalen Aktivität ist in den Proben von Leber und Lunge beobachtet worden. Dabei zeigte sich ein signifikanter Abfall zwischen dem 6. und 18. Monat (Leber und Lunge mit $p < 0,05$) und zwischen dem 6. und 26. Monat (Leber mit $p < 0,05$). Die Unterschiede der proteasomalen Aktivitäten von Herz, Niere und Skelettmuskel betreffen lediglich Mittelwertunterschiede, sind aber nicht signifikant zwischen den verschiedenen Altersgruppen. Interessant ist, dass die Leber- und Lungenproben der jungen Ratten eine höhere basale Proteasomenaktivität im Vergleich zu den anderen Geweben zeigen (5 und 1 $\mu\text{mol}/\text{mg} \times \text{min}$). In Abb. 26 werden die relativen Verringerungen der Proteasomenaktivität in den untersuchten Geweben dargestellt. In Leber und Lunge zeigt sich deutlich der stärkste Abfall, nämlich auf ungefähr 1/5. Demgegenüber waren die Veränderungen kleiner und weniger stabil in Niere, Skelettmuskel und Herz.

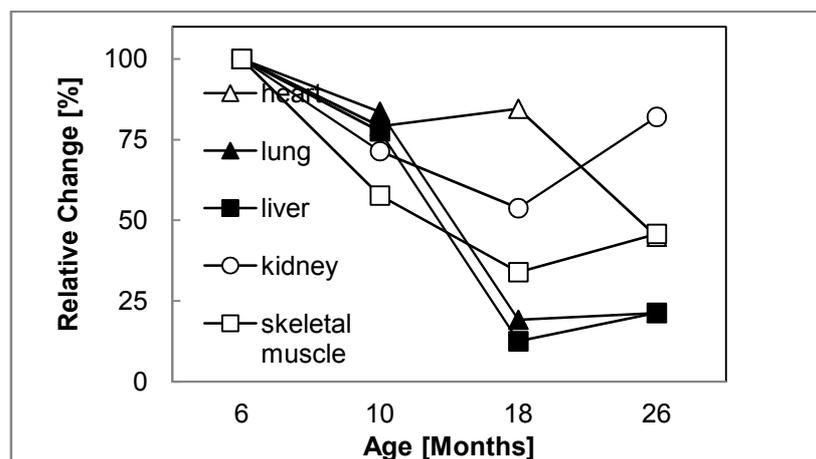


Abb. 26: Organspezifische Veränderungen der Proteasomenaktivität (Abb. übernommen aus Breusing et al. 2009)

Bei den weiteren statistischen Untersuchungen zeigen sich in der Leber und der Lunge im 18. Lebensmonat Werte von $p < 0,005$ im Vergleich zum 10. Monat. In der Leber finden sich zusätzlich Auffälligkeiten des 18. Monats verglichen zum 6. Monat, dieser Wert beträgt $p < 0,005$. Auch im 26. Lebensmonat finden sich lediglich in den drei Organen Leber, Lunge und Milz Signifikanzen. Diese stellen sich folgendermaßen dar: In der Leber ergab sich der Wert $p < 0,005$ im Vergleich zum 6. Lebensmonat, in den Organen Lunge und Milz $p < 0,05$. Weiterhin findet sich in der Leber eine Auffälligkeit des 26. Monats vergleichsweise zum 18. Monat, hierbei beträgt der statistische Wert $p < 0,05$. In allen anderen Organen bzw. Geweben fanden sich keinerlei statistische Signifikanzen.

Auflistungen der statistischen Ergebnisse zusätzlich im Anhang

3. Resultate

3.4 Beziehung zwischen individueller Proteinoxidation und individueller Proteasomeaktivität

Eine strenge inverse Korrelation wurde zwischen der Proteincarbonylbildung und der Proteasomenaktivität gefunden.

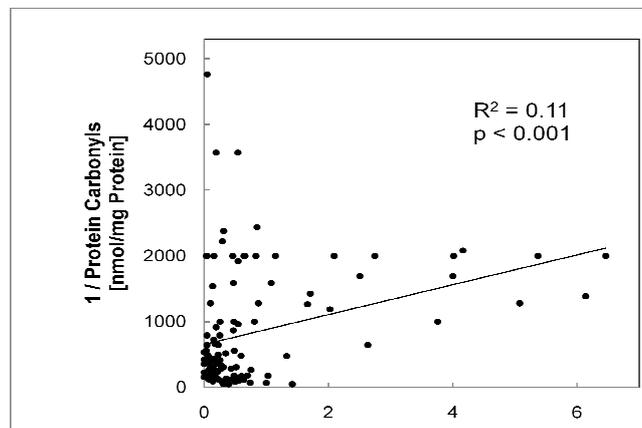


Abb. 27: Inverse Korrelation zwischen Proteinoxidation und Proteasomenaktivität in 6-, 10-, 18- und 26- Monate alten Ratten in allen Geweben. Für die Korrelationsanalyse wurden die Pearson's-Korrelationskoeffizienten berechnet. (Abb. übernommen aus Breusing et al. 2009)

Wenn man die Daten nach den verschiedenen Geweben/Organen sortiert zeigt sich, dass der signifikante Effekt vorrangig auf die strengen Korrelationen in der Leber und Lunge zurückzuführen ist, während sich in den anderen Geweben (Daten nicht abgebildet) nur schwächere Korrelationen zeigen.

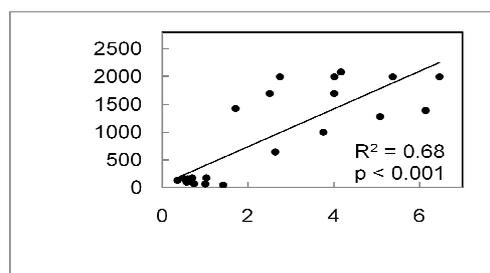


Abb. 28: Inverse Korrelation zwischen Proteinoxidation und Proteasomenaktivität der Leber in 6-, 10-, 18- und 26-Monate alten Ratten (Abb. übernommen aus Breusing et al. 2009)

3. Resultate

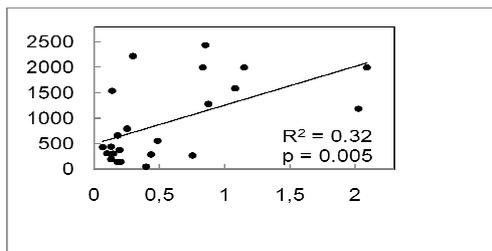


Abb. 29: Inverse Korrelation zwischen Proteinoxidation und Proteasomenaktivität der Lunge in 6-, 10-, 18- und 26-Monate alten Ratten (Abb. übernommen aus Breusing et al. 2009)

Die letzten Analysen zielten darauf zu untersuchen, ob die Organe mit gleicher oder unterschiedlicher Geschwindigkeit altern. Die gewebsspezifische Proteasomenaktivität und die Proteincarbonylbildung korrelierten in den Tieren aller Altersgruppen. Im Hinblick auf die vorherigen Resultate (Abb. 27-29) wurden die Analysen eingeschränkt auf die Leber- und Lungenproben. Wie man aus der Abb. 30 ersehen kann, gibt es eine strenge Korrelation in der organspezifischen Proteincarbonylbildung zwischen den Leber- und den Lungenproben. Ähnliche Resultate wurden für die Korrelation zwischen den organspezifischen Proteasomenaktivitäten dieser beiden Organe beobachtet (Abb. 31).

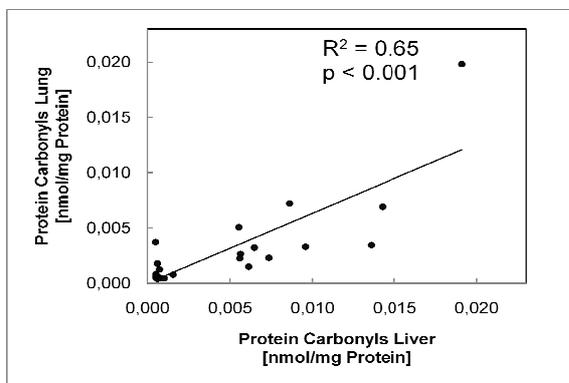


Abb. 30: Proteincarbonyle in Leber und Lunge (Abb. übernommen aus Breusing et al. 2009)

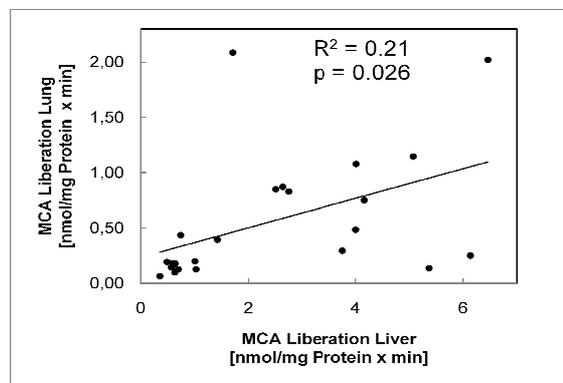


Abb. 31: Proteasomenaktivität in Leber und Lunge (Abb. übernommen aus Breusing et al. 2009)

4. Diskussion

4. Diskussion

4.1 Lipidperoxidation und Alterung

Seit längerem ist bekannt, dass mit der Alterung von Zellen, Geweben und Organismen eine verstärkte Radikalbildung und Lipidperoxidation einhergeht. Die entscheidende Theorie dazu stammt von Denham Harman. Er publizierte 1956 die Radikalthypothese des Alterns (*Harman D 1956*). Mittlerweile haben sich Harmans Ideen als tragfähiger erwiesen als die insgesamt mehr als 300 Theorien, die zu erklären versuchen, welche Ursachen zum Altern führen. In der Tabelle 28 werden besonders wichtige Befunde über eine verstärkte Radikalbildung und LPO bei der Alterung des Menschen zusammengestellt. Die Zahl der Befunde über Radikale, LPO und Alterung bei Tieren oder tierischen Zellen ist natürlich weitaus größer.

Tab. 28: Lipidperoxidation und Alterung – Befunde an Geweben und Organen des Menschen

gemessene Parameter	Gewebe	Haupterkennnis	Autoren	Zitat
SOD _{tot} , MnSOD, GPx, CAT, GSH, GSSG, LPO, PCO	menschl. Skelettmuskel Probanden: 17-100 Jahre	LPO, PCO, GSSG steigen mit zunehmendem Alter in der Skelettmuskulatur an; die Enzymaktivitäten sind annähernd unverändert	Pansarasa O et al.	Pansarasa O, Bertorelli L, Vecchiet J, Feizani G, Marzatico F: Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. <i>Free Radic Biol Med</i> 1999;27:617-622.
TBA-RS, LPO, Vit. E/C, GSH, GSSG	menschl. Plasma Probanden: 50-100 Jahre	Der Grad an oxidativem Stress ist bei gesunden Hundertjährigen geringer als bei durchschnittlich alten Menschen; wer extrem alt wird, hat höhere Konzentrationen an GSH u.a. Antioxidanzien	Paolisso G et al.	Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo Mr, Manzella D, Gambardella A, Varricchio M: Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians <i>1998;46:833-838</i>
GPx, SOD, TAS	menschl. Plasma	Der Alterungsprozess wird begleitet durch einen Abfall von TAS im Plasma, woraus auf einen gestörten antioxidativen Status geschlossen wird	Chehab O et al.	Chehab O, Ouertani M, Souiden Y, Chaieb K, Mahdouani K: Plasma antioxidants and human aging: A study on healthy elderly Tunisian population. <i>Mol Biotechnol</i> 2008;40(1):27-37

4. Diskussion

MnSOD, CuZnSOD, GPx, CAT, LPO, PCO, GSH, GSSG	M. vastus lateralis und M. rectus abdominis des Menschen	18-48J. vs. 66-90J.: LPO steigt altersabhängig, auch der GSH/GSSG-Quotient fällt ab, die SOD steigt parallel; PCO ändert sich nicht signifikant	Marzani B et al.	Marzani B, Felzani G, Bellomo RG, Vecchiet J, Marzatico F: Human muscle aging: ROS-mediated alterations in rectus abdominis and vastus lateralis muscles. <i>Exp Gerontol</i> 2005;40:959-965
MDA	menschl. Blutserum von Schichtarbeitern	Erhöhte Werte von GAG und MDA im Blutserum sind signifikante Kriterien, welche die adaptive Spannung und die frühzeitige Alterung von Schichtarbeitern widerspiegeln.	Kulikov VY et al.	Kulikov VY, Fridman YM, Fomin AN: Role of oxidative stress in mechanisms of premature aging in shift labor workers. <i>Alaska Med</i> 2007; 49:81-84
LPO, TAS SOD, GPx	→ im menschl. Plasma → in Erythrozyten 25- 70 Jahre	In der Altersgruppe ab 60 Jahren vermehrt oxydativer Stress (LPO↑, TAS↓, GPx↓). <60J.: keine signifikanten altersabhängigen Veränderungen der Marker	Mendoza-Núñez VM et al.	Mendoza-Núñez VM, Ruiz-Ramos M, Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Muñoz-Sánchez JL: Aging-related oxidative stress in healthy humans. <i>Tohoku J Exp Med</i> 2007;213:261-268
HNE	Makula und periphere Regionen des menschl. Auges AMD = age-related macular degeneration	beständige Werte von HNE-modifizierten Proteinen deuten an, dass HNE kein sensitiver Biomarker für AMD ist	Ethen CM et al.	Ethen CM, Reilly C, Feng X, Olsen TW, Ferrington DA: Age-related macular degeneration and retinal protein modification by 4-hydroxy-2-nonenal. <i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i> 2007; 48: 3469-3479
MDA, PCO, HNE, GSH, GSSG, UA	Menschliches Plasma und Erythrozyten; 194 gesunde Probanden (Männer + Frauen im Alter von 18-84 Jahren)	Die Ergebnisse zeigen, dass es zu einem Anstieg von Oxidationsprodukten im Verlauf der Alterung kommt (MDA↑, HNE↑, GSSG↑, GSH↓).	Gil L et. al	Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, Grune T: Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. <i>Free radical res</i> 2006;40: 495-505

Dass sich Produkte primärer und sekundärer radikalischer Reaktionen – entweder im Blutplasma oder verschiedenen Geweben – anhäufen, kann das Resultat einer verstärkten Bildung oder eines verringerten Abbaus solcher Verbindung oder beider Komponenten zugleich sein. Für die Lipidperoxidation ist bekannt, dass mit der Alterung z.B. die Kapazität des Aldehyd-abbauenden Systems (MDA-Metabolismus, HNE-Metabolismus etc.) eingeschränkt wird. Hierzu gibt es Experimente mit Hautfibroblasten des Menschen in verschiedenem Lebensalter (*Siems, Voss, Bresgen, Eckl und Grune 2009*).

4. Diskussion

Insofern ist für die detaillierte Beurteilung der Mechanismen schon bedeutsam, die einzelnen Teile der Bilanz zu untersuchen, um evtl. auf normale oder gestörte Alterungsprozesse einwirken zu können.

4.2 Altersabhängige Proteincarbonyl-Messungen in Organen und Geweben

In Bezug auf die Proteinoxidation bestehen wesentlich weniger Erkenntnisse sowohl über die Bildung oxidierter Proteine in Relation zum Altern als auch über den Abbau solcher Produkte. Das heißt, hier besteht eine enorme Lücke in der Erkenntnis schon der prinzipiellen Zusammenhänge zwischen Proteinoxidation und Altern und natürlich umso mehr der Feinmechanismen und einzelnen Komponenten. Diese Lücke zu schließen ist das Hauptanliegen der Arbeit gewesen.

Erkannt wurde im Rahmen dieser Arbeit, dass sich die Proteincarbonyle, die sowohl Produkte der LPO als auch der Proteinoxidation sind, in allen Organen der Ratte während der Alterung eindeutig anhäufen. Es wurden in der Literatur keine Artikel gefunden, welche Proteincarbonyl-Messungen in verschiedenen Organen umfassen. Daher gibt es keine Erkenntnisse, die unsere Untersuchungen und Erkenntnisse eindeutig unterstützen, lediglich einzelne Organe wurden von verschiedenen Gruppen untersucht. Deren Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 29: Bisherige Befunde über altersabhängige Proteincarbonylmessungen in jeweils einem Organ oder Gewebe aus Experimenten mit Tieren bzw. alternden tierischen Zellen

Tiere:	Parameter	Spezies/Gewebe	Haupterkennntnis	Autor	Zitat
Ratten	PCO, AOPP, P-SH, LHP, NT	Skelettmuskel junge und alte Wistar Ratten	Der Anstieg der PCO-Levels von jungen Ratten im Vergleich zu alten Ratten ist signifikanter als der PCO-Anstieg von alten zu sehr alten Ratten. Dies lässt vermuten, dass die PCO Formation ein früher sehr spezifischer Marker für Alterungsprozesse im Skelettmuskel ist. Zusätzlich zeigen ansteigende Werte von NT im Skelettmuskel der alten Ratten, dass NT ein neuer Marker von Zerstörung durch Proteinoxidation im alternden Muskel sein könnte.	Cakatay U et. al	Cakatay U, Telci A, Kayali R, Tekeli F, Akçay T, Sivas A: Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. Clin. Biochem 2003: 36: 51-55

4. Diskussion

Ratten	H ₂ O ₂ , HNE, MDA, PCO, MnSOD, GPx;CAT	SSM und IFM bei 6 + 24 Monate alten männlichen Fischer- 344 Ratten	Ein signifikanter Anstieg von HNE, PCO, MDA in den IFM war zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu wurden in den SSM nur erhöhte PCO-Werte im Laufe der Alterung gefunden. Im Kontrast dazu steht, dass nur die PCO im Alter in den SSM erhöht waren. Signifikante altersabhängige Anstiege der MnSOD, GPx und CAT wurden in den IFM gefunden, während in den SSM MnSOD, und GPx im Alter anstiegen und CAT abnahm. Die Akkumulation von durch Oxidation induzierten Schäden der IFM scheint ein Hauptfaktor für die altersabhängigen mycardialen Veränderungen zu sein.	Judge S et. al	Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T, Leeuwenburgh C: Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. <i>Faseb J</i> 2005;19: 419-421
Ratten, Mäuse, Rhesus-Affen	Carbonyl Modifikationen (Albumin, Transferrin, Alpha-1-Makroglobulin)	Plasma-Proteine in Mäusen, Ratten und Rhesus Affen	Der totale Plasma-Protein Gehalt sinkt signifikant bei Mäusen, jedoch nicht bei Ratten, im Alter ab. Weiterhin zeigte sich, dass Albumin das einzige Protein war, welches Carbonylierung, bei allen drei Spezies zeigte. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass der altersbedingte Anstieg der Protein -Carbonyle ein selektives und kein zufälliges Phänomen ist.	Jana CK et. al	Jana CK, Das N, Sohal RS: Specificity of age-related carbonylation of plasma proteins in the mouse and rat. <i>2002;397:433-439</i>
	ONOO ⁻ , HNE	Serumproteine von jungen und alten Fischer 344 Ratten	Sechzehn der durch ONOO ⁻ und HNE modifizierten Serumproteine, sind beteiligt an der Blutkoagulation, dem Lipidtransport, der Blutdruck- Regulation, sowie an der Protease-Inhibition. Weiterhin wurden ansteigende Werte der Nitrations- und HNE Addukte mit zunehmendem Alter gefunden, dies bestätigt die auf oxydativem Stress basierende Alterungshypothese.	Kim CH et. al	Kim CH, Zou Y, Kim DH, Kim ND, Yu BP, Chung HY: Proteomic analysis of nitrated and 4-hydroxy-2-nonenal-modified serum proteins during aging. <i>J Gerontol A Biol Sci Med Sci</i> 2006;61:332-338

Wenn bisher auch Einzeldaten über eine altersabhängige vermehrte Proteinoxidation vorgelegt wurden, hat keine Gruppe Daten über einen altersabhängigen Vergleich der Kapazität zur Beseitigung der oxidierten Proteine publiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikanter Abfall der proteasomalen Aktivität mit zunehmendem Alter in verschiedenen Organen von Ratten gemessen. Mit dieser Erkenntnis wurde nachgewiesen, dass der Anstieg der Konzentration oxidativ modifizierter Proteine während des Alterns wahrscheinlich die Konsequenz einer sich verringern proteasomalen Aktivität ist. Ob die Anhäufung oxidativ modifizierter Proteine nur auf dem Absinken der Aktivität des Proteasoms beruht, kann nicht eindeutig belegt werden. Hier müssten tracerkinetische oder andere Fluxratenmessungen vorgenommen werden, um direkt zu messen, ob die unmittelbare Bildung solcher Proteine ansteigt, unverändert bleibt oder sogar

4. Diskussion

absinkt. Eine Tabellierung des Anstiegs der PCO-Konzentrationen und des parallelen Abfalls der proteasomalen Aktivitäten zeigt, dass die PCO mehrfach stärker ansteigen als die Proteasom-Aktivität abfällt (siehe Tab. 30a und 30b). In Tab. 30b ist der direkte Vergleich der Faktoren Organ/Gewebe, Anstieg der PCO sowie Abfall Proteasom-Aktivität enthalten.

Tab. 30a: Carbonyle und Proteasom

Organ	6 Monate Carb. (nmol/mg)	26 Monate Carb. (nmol/mg)	Faktor des Anstiegs	6 Monate Prot. (nmol/mg)	26 Monate Prot. (nmol/mg)	Faktor des Abfalls
Herz	0,00257	0,00902	3,5 x	0,2039	0,13126	1,6 x
Plasma	0,00079	0,00620	7,8 x			
Lunge	0,00067	0,00826	12,3 x	0,96719	0,20608	4,7 x
Leber	0,00067	0,01061	15,8 x	4,46196	0,95462	4,7 x
Milz	0,00065	0,00922	14,2 x	0,28683	0,14124	2,0 x
Niere	0,001	0,01203	12 x	0,43189	0,35441	1,2 x
Skelettmuskel	0,00114	0,00353	3,1 x	0,61187	0,32445	1,9 x

Tab. 30b: Darstellung der altersbedingten Faktoren des Anstiegs bzw. Abfalls

Gewebe	Anstieg der PCO (Faktor 1-4)	Abfall Proteasom-Akt. (Faktor 1-4)
Herz	3,5	1,6
Plasma	7,8	n.g.
Lunge	12,3	4,7
Leber	15,8	4,7
Milz	14,2	2,0
Niere	12,0	1,2
Skelettmuskel	3,1	1,9

So sind z.B. die Carbonyle in der Lunge von Altersgruppe 1 bis Altersgruppe 4 12,3-fach angestiegen, die Proteasomaktivität ist aber lediglich auf das 4,7-fache abgefallen. In jedem Organ/Gewebe ist der Faktor des PCO-Anstiegs deutlich höher als der Faktor des Proteasomen-Aktivitäts-Abfalls. Selbstverständlich sind solche Vergleiche keine direkten Messungen und somit nur zu Abschätzungen geeignet. Dennoch zeigt der Wertevergleich, dass der Abfall der proteasomalen Aktivität allein in keinem Organ/Gewebe die Zunahme der PCO erklären kann. Schlussfolgerung ist: Sowohl der altersabhängige Abfall der

4. Diskussion

Proteasomen-Aktivität, der in dieser Arbeit direkt gemessen wurde, als auch eine altersabhängige Zunahme der Carbonyl-Bildungsrate sind für den Anstieg der PCO-Konzentrationen in den Organen/Geweben verantwortlich. Dies trifft prinzipiell auf alle untersuchten Organe zu. In Abb. 32 wird der Anstieg der Proteincarbonylkonzentration im menschlichen Serum als Resultat der Wechselwirkungen der verschiedenen Organe des gesamten menschlichen Organismus gezeigt.

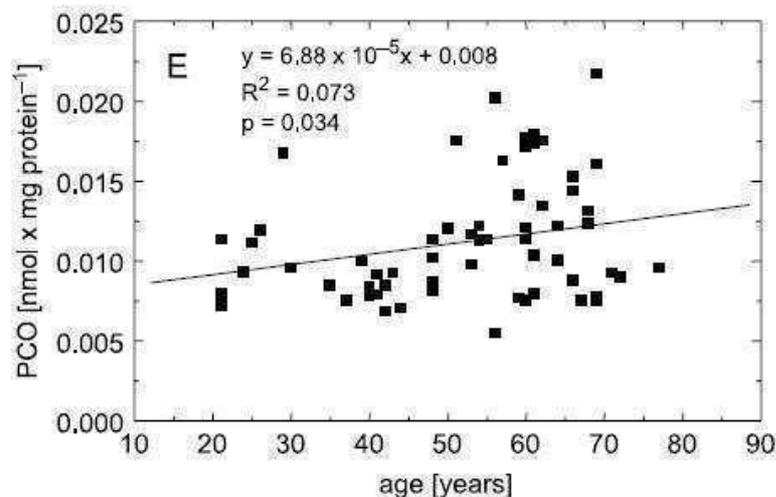


Abb. 32: Anstieg der Konzentration von Proteincarbonylen im menschlichen Serum (*Gil et al. 2006*)

Die Zunahme der Proteincarbonyle, die am höchsten in Leber-, Lunge- und Nierenproben beobachtet wurde, ist nicht auf die Carbonylierung eines einzelnen oder mehrerer einzelner Proteine zurückzuführen. Es handelt sich um eine generalisierte Carbonylierung.

4.3 Antioxidativer Schutz beim Altern

Die Bestandteile des primären und des sekundären antioxidativen Schutzes werden in Abbildung. 33 gezeigt. Zu den primären antioxidativen Schutzsystemen gehören die Katalase, die Superoxiddismutase, Enzyme des Glutathionsystems (Glutathionreduktase, Glutathiontransferase), weitere antioxidativ wirksame Enzyme (Glutathionperoxidase) und niedermolekulare Substanzen, wie z.B. Harnsäure und Vitamine. Wenn der primäre antioxidative Schutz durchbrochen wird, kann im Interesse des Gesamtorganismus noch die Möglichkeit des sekundären antioxidativen Schutzes genutzt werden. Wichtige

4. Diskussion

Repräsentanten des sekundären antioxidativen Schutzes sind der Metabolismus aldehydischer LPO-Produkte und der Abbau oxidativ modifizierter Proteine.

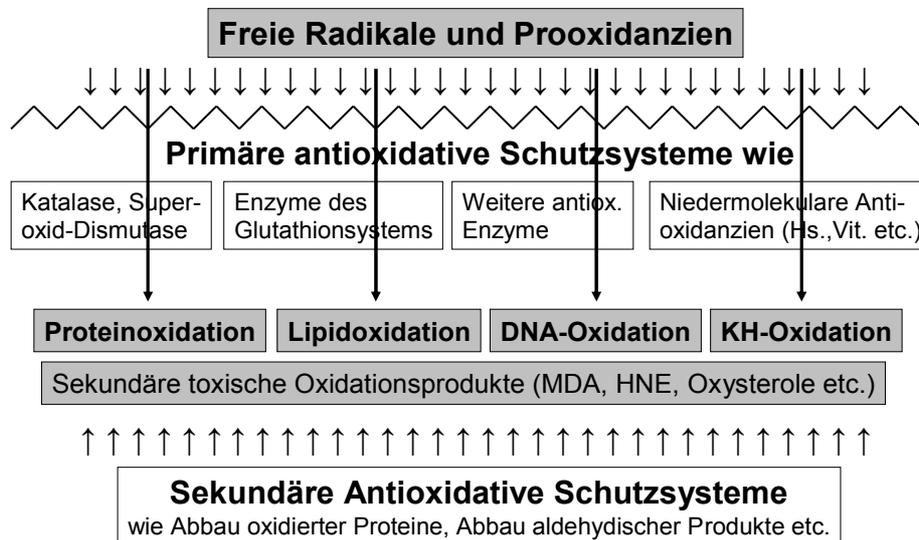


Abb. 33: Primärer und sekundärer antioxidativer Schutz (Siems et al. 2008)

Ob solche protektiven Prozesse altersabhängig variieren, war bisher völlig unbekannt. In den vorliegenden Untersuchungen wurde gefunden, dass mit zunehmendem Alter von Ratten die Proteasomaktivität abfällt, wobei dieser Abfall signifikant für die Lunge und die Leber ist. Aus anderen Studien war schon bekannt, dass die Rate des Proteinabbaus verringert ist, wenn ein Organismus altert (Chondrogianni N. et al, 2005). Eine verringerte Proteinabbaurate wurde als kausale Komponente einer größeren Zahl von Erkrankungen mit Akkumulation von Proteinaggregaten diskutiert. Der Abbau des größten Teils der oxidativ modifizierten Proteine wird in erster Linie durch das 20S-Proteasom realisiert (Breusing und Grune, 2008). Es gibt Hinweise aus in vitro-Studien, dass oxidierte Proteine, wenn sie crosslinks bilden, in der Lage sind, das Proteasom zu hemmen (Friguet und Szweda, 1997). Die hier untersuchte Beziehung zwischen Proteinoxidation und proteasomaler Abbaurate zeigte eine streng negative altersabhängige Korrelation in Leber und Lunge. Wir nehmen an, dass die Beziehung zwischen Proteinkonzentration und Proteasomaktivität in Ratten unterschiedlichen Altersgewebs- bzw. organspezifisch ist. Wir haben die Beziehung in sechs Organen und Blutplasma untersucht. Für andere Gewebe können wir keine experimentell begründete Aussage treffen.

4. Diskussion

Unsere Untersuchungen erlauben auch keine Aussage hinsichtlich der Differenzierung zwischen intra- und extrazelluläre Akkumulation der oxidierten Proteine.

Die Tatsache, dass die Leber und Lunge die strengsten Korrelationen zeigen, kann darauf zurückzuführen sein, dass beide Organe besonders hohe Proteasomaktivitäten aufweisen, darüber hinaus auch Organe mit dem höchsten oxidativen Stress (Umwelteinflüsse: gasförmige Substanzen, Chemikalien etc.) sind. Eine solche Betrachtung bleibt aber weitgehend spekulativ.

4.4 Schlussfolgerung und Gesamtbetrachtung zu Biomarkern des oxidativen Stresses für das Altern

Altern ist eine komplexe voranschreitende physiologische Veränderung des Organismus, welche zwangsläufig zum Tod führt. Während des gesamten Lebens wird der menschliche Organismus mit oxidativem Stress konfrontiert. Um zu messen, welche Veränderungen durch oxydativen Stress während des Alterns hervorgerufen werden und zu welchen Veränderungen es im zellulären Metabolismus führt, wurden bisher mehrere Substanzen als Biomarker vorgeschlagen einschließlich Produkte der Lipidperoxidation (z.B. MDA und HNE), Produkte der Proteinoxidation (Proteincarbonyle), antioxidative Enzyme (z.B. Superoxiddismutase [SOD], Katalase [CAT], Glutathionperoxidase [Gpx]), Mineralien (z.B. Zink, Selen, Mangan und Kupfer), Vitamine (z.B. A, C, E), Glutathion, Flavonoide, Bilirubin und Harnsäure. Aber keiner dieser Parameter konnte bislang zu dem führenden Biomarker erklärt werden, welcher generell akzeptiert werden kann, um die Lebenserwartung einer einzelnen Person, seines biologischen Alters oder seines altersbedingten Gesundheitsstatus zu determinieren (*Inal et al. 2001, Bonnefont-Rousselot et al. 2001, Stadman 1988, Jones et al. 2002, Ward et al. 2005*). Es gibt so viele verschiedene Einflüsse, welche die Konzentration oder die Aktivität einzelner Substanzen oder Enzyme beeinflussen, dass es nicht möglich ist, nur einen klinischen Marker zu messen um zu bestimmen, wie gesund eine individuelle Person ist bzw. welche Lebenserwartung sie hat. Deshalb sollte immer ein Pattern von klinischen Biomarkern verwendet werden. Dieses Pattern sollte jeweils einen Marker für die Lipidperoxidation, die Proteinoxidation, den totalen antioxidativen Status und idealerweise einen für DNA-Schäden enthalten. Ein solches Pattern ist dann Bestandteil der Befundung im Rahmen einer personalized medicine.

4. Diskussion

Tab. 31: Übersicht über die klinisch relevanten Biomarker des oxidativen Stresses für das Altern (nach Voss und Siems 2006)

Biomarker	Abkürzung	Alterung
F ₂ -Isoprostane	PGF ₂	↑
Malondialdehyd	MDA	↑↓
4-Hydroxy-2-Trans-Nonenal	HNE	↓↑
Protein gebundene Carbonyle	PCO	↑↓
γ-Glutamin-Semialdehyd	GGS	↑
Amino adipic-Semialdehyd	AAS	↑
Lipofuszin		↑
Telomerlänge		↓
8-Hydroxy-2-Desoxyguanosin	8OHdG	↑↓
Reduziertes Glutathion	GSH	↓
Oxidiertes Glutathion	GSSG	↑
Glutathion-Quotient	GSSG/ (GSH+2GSSG)	↑
Harnsäure	UA	↑↓
Vitamin A, C, E		↑↓
Superoxiddismutase	SOD	↑↓
Glutathionperoxidase	GPx	↑↓
Glutathion-Reduktase	GSSG-R	↓
Glutathion-S-Transferase	GSH-S-T	↓
Katalase	CAT	↑=

Die Familie der Prostaglandin F₂-Isomere, welche auch als F₂-Isoprostane bezeichnet werden, sind das Ergebnis einer radikalen Peroxidation der Arachidonsäure. Sie kann im Urin mittels GC-MS, LC-MS oder LC-MS-MS gemessen werden. Wenn die Messmethode hochpräzise und akkurat ist, kann sie sowohl in epidemiologischen Studien als auch im klinischen Alltag Verwendung finden. Der Nachteil dieser Methode ist die sehr teure Ausrüstung und das Auftreten von Isomeren, welche vor der Messung extrahiert werden müssen. Im Laufe des Alterungsprozesses steigt die F₂-Isoprostankonzentration im Harn an. Sie steigt ebenfalls im Verlauf von Erkrankungen wie z.B. bei einem Herzinfarkt, im Verlauf eines Diabetes, einer Leberzirrhose sowie bei Herzfehlbildungen an.

4. Diskussion

Es wurde in der Literatur auch berichtet, dass der F2-Isoprostanspiegel im Serum sowohl von jungen als auch älteren Männern nach intensivem Training ansteigt (*Sachek et al. 2003*). F2-Isoprostane wurden als sensitive und akkurate Biomarker der Lipidperoxidation vorgeschlagen, auch um die altersabhängigen Veränderungen von Membranen durch oxidative Zerstörung zu messen.

Einer der am häufigsten verwendeten Biomarker, um oxidative Schäden an Lipiden zu untersuchen, ist die fluorometrische Messung von Substanzen, die mit Thiobarbitursäure reagieren (TBARS). Als Hauptkomponente gehört dazu das Malondialdehyd (MDA).

Die Messung dieses Biomarkers ist nach Berichten von *Wong et al. 1987* sehr leicht durchzuführen und preiswert. Dennoch ist die Spezifität von Untersuchungen der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen sehr gering. Für die Bestimmung von MDA ist das Plasma die am häufigsten verwendete biologische Flüssigkeit. Plasmaproben werden für die Untersuchungen mit Thiobarbitursäure gekocht, mittels der HPLC (high performance liquid chromatography) aufgetrennt und fluorimetrisch vermessen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass es einen signifikanten altersabhängigen Anstieg der MDA Konzentration im Plasma gibt (*Junqueira et al. 2004, Inal et al. 2001, Gil et al. 2006, Rondanelli et al. 1997, Traverso et al. 2003, Mutlu-Türkoğlu et al. 2003, Kasapoglu et al. 2001, Ozbay und Dülger 2002, Hernanz et al. 2000, Di Massimo et al. 2006*).

Ein weiterer Faktor zur Bestimmung der Lipidperoxidation ist HNE (4-Hydroxy-2-Trans-Nonenal).

HNE kann entweder direkt photometrisch bei einer Wellenlänge von 223 nm oder nach Modifikation (DNPH-Derivatisierung etc.) mittels HPLC bzw. GC-MS gemessen werden.

Gelagerte Proben benötigen vor der Messung eine Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH), eine Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie (TLC), eine Extraktion und nachfolgende Trennung sowie Quantifizierung mittels HPLC (*Strohmaier et al. 1995, Esterbauer et al. 1982, Grune et al. 1992*).

Diese komplexe Isolationsmethode ist begleitet von einer relativ geringen aber, reproduzierbaren Wiederfindung. Obwohl die HNE-Messmethode personal-, material- und zeitaufwendig ist, wird sie aufgrund der hohen Spezifität von HNE als Biomarker für die Lipidperoxidation durchgeführt.

Während *Diamond et al. 2002* eine leichte Abnahme der HNE-Konzentration im Alter in den Zellen des Musculus thyroarythenoideus beschrieben, zeigten die Untersuchungen von *Voss und Siems 2006*, dass es eine signifikante Korrelation zwischen der HNE-Konzentration im Plasma und dem Alter der Patienten gibt.

4. Diskussion

Die HNE Werte korrelierten positiv mit den MDA-Werten und negativ mit dem antioxidativen Status des Glutathionsystems der jeweiligen Testperson.

Die Messung der Proteinoxidation als klinischer Faktor ist sehr wichtig für die Vorhersage des Alterungsprozesses. Die proteingebundenen Carbonyle (PCO) werden mittels DNPH derivatisiert und das korrespondierende Hydrazone wird mittels ELISA (*Buss et al. 1997, Sitte et al. 1998*) oder immunhistochemisch (*Mehlhase et al. 2005, Chevion et al. 2000*) gemessen. Ein altersabhängiger Anstieg der PCO-Konzentration wurde vor allem für den Herzmuskel, das Gehirn (*Floyd und Hensley 2002, Grune et al. 1993, Stadtman 2004, Grune et al. 1995, Gianni et al. 2004*) und vor allem auch im Plasma von gesunden Menschen beschrieben (*Gil et al. 2006, Mutlu-Türkoğlu et al. 2003, Kasapoglu et al. 2001, Stadtman 2002*).

Traverso et al. 2003 haben geringere Messwerte von PCO im Organismus von über 90-jährigen im Vergleich zu jüngeren Personen gemessen. Diese kontroverse Aussage beruht vermutlich auf dem Fakt, dass nur sehr gesunde Menschen mit einem generell sehr geringen oxidativen Status dieses Lebensalter erreichen und für diese Studien zur Verfügung stehen.

Die Messung von PCO ist eine preiswerte, schnelle und verlässliche Methode, um oxidativen Stress zu messen. Die zwei Hauptkomponenten, welche die Gruppe der PCO repräsentieren, sind γ -Glutamin Semialdehyd (GGs) und Amino adipin-Semialdehyd (AAS). Sie sind die Hauptoxidationsprodukte der Proteine nach metallkatalysierter Oxidation und können Werte von 55-100 % des gesamten Carbonylgehaltes erreichen (*Requena et al. 2003*).

Daneshvar et al. 1997 entwickelten eine HPLC-Methode, mit der diese beiden Komponenten gemessen werden können.

Der Hauptprozess des Abbaus oxidativ modifizierter Proteine ist der Abbau durch Proteasomen. Wenn der Schaden größer ist als die Proteolyse rate oxidierter Proteine, so kommt es zu einer Akkumulation derselben in der Zelle.

Abhängig von ihrer Lokalisation und Zusammensetzung werden die Aggregate als inclusion bodies, Plaques, Lipofuscin, Cereoid, Lewy body oder Alterspigment bezeichnet. Abfallmaterial, welches in den Lysosomen gespeichert wird, bezeichnet man als Lipofuscin.

Da Lipofuscin autofluoreszierende Bestandteile einschließt, kann die Quantifikation sehr einfach durch die Autofluoreszenzmessung durchgeführt werden (*Brunk und Terman 2002*).

Wenn die proteasomalen und lysosomalen Systeme unfähig sind, diese Aggregate abzubauen, ist die Akkumulation ein voranschreitender und unaufhaltsamer Prozess. Zusätzlich dazu hemmen hochmolekulare Aggregate die proteasomalen Proteasen.

4. Diskussion

Die ständig ansteigende Akkumulation von Lipofuscin in postmitotischen Zellen ist ein bekannter, unvermeidlicher Feingehaltstempel des Alterns. Auch einige neurodegenerative Erkrankungen sind an erhöhte Werte von Proteinaggregation gekoppelt.

Da die Messung durch autofluoreszierende Methoden schnell und einfach ist, gilt das Lipofuscin als ein guter Biomarker für die altersbedingten Beeinträchtigungen des Proteinumsatzes des proteasomalen und lysosomalen Systems.

Neben Proteinen und Lipiden ist auch die DNA anfällig gegenüber oxidativem Stress. Ist die Reparaturkapazität der DNA geringer als die Schädigung, resultieren sich akkumulierende Mutationen während des normalen Alterungsprozesses (*Floyd und Hensley 2002*). Wenn die mutierten Gene transkribiert und translatiert werden, resultieren mehr und mehr fehlfunktionierende Proteine.

Der Hauptfaktor der reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), welche zu DNA-Schädigungen führen ist 8OHdG, eine oxidative Läsion an Guanosin, welche zu einer Punktmutation infolge einer Fehlpaarung führt (*Terman und Brunk 2002*). Bis zu 200 oxidative Modifikationen von Guanosin pro Zelle und Tag treten auf (*Loft et al. 1993*).

8OHdG wird sehr oft als Biomarker für oxidative Schäden an der DNA verwendet, da es sehr leicht durch verschiedene Methoden (GC-MS, HPLC, LC-MS, immunhistochemische Untersuchungen und spektroskopisch) zu messen ist.

8OHdG ist nur eine von ungefähr 20 beschriebenen, durch Oxidation entstandene DNA-Modifikationen. Für einige von ihnen existiert kein effizientes Reparatursystem, so dass dadurch entstandene Modifikationen in der Zelle im Laufe der Alterung akkumulieren (*Loft et al. 1993, Barja 2004*).

Einige Studien verbinden den kumulativen oxidativen Stress mit der Länge der Telomere. Referenzwerte genauso wie die Auswirkungen von anderen Faktoren, welche die Länge der Telomere beeinflussen, fehlen allerdings noch (*Saretzki und von Zglinicki 2002, Bekaert et al. 2005, Lahnert 2005*).

Aus diesem Grund ist die Rolle der Telomerverkürzung während der Alterung noch nicht klar präsentiert. Verschiedene Studien verbinden die Telomerverkürzung mit dem Alterungsprozess (*Bekaert et al. 2005*).

Um den normalen Metabolismus von Zellen und Geweben aufrecht zu erhalten, hat die Evolution den menschlichen Organismus mit verschiedenen antioxidativen Systemen ausgestattet, welche den ansteigenden oxidativen Stress puffern können. Daher können die Konzentrationen dieser Substanzen als Anzeige des Alterungsprozesses dienen.

4. Diskussion

Das wichtigste Verteidigungssystem gegen oxidativen Stress ist das Glutathionsystem. Für die Synthese von Glutathion wird Cystein benötigt. Unter oxidativen Bedingungen wird reduziertes Glutathion (GSH) reversibel zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert.

Glutathion in seiner reduzierten Form sowie als Glutathiondisulfid kann mittels zahlreicher Verfahren untersucht werden, inklusive der hoch spezialisierten easy-to-do assays (*Camera und Picardo 2002*).

Von den Konzentrationen von GSH und GSSG kann das Halbzellen -Potential (E_{hc}) nach den Methoden von *Schafer und Buettner 2001* errechnet werden.

Während des Alterungsprozesses geht die Plasmathiolkonzentration zurück, während der Betrag an oxidiertem Cystein steigt. Dies führt zu einem altersabhängigen Abfall der intrazellulären Glutathionkonzentration. Die Abnahme der Gesamtplasmathiol -Konzentration wird ferner für einen altersabhängigen Abfall der Gesamtalbuminkonzentration im Plasma und einen Anstieg der oxidierten Form von Albumin berechnet (*Dröge 2003*). In einigen Studien werden auch Unterschiede zwischen den Geschlechtern beschrieben. Der unterschiedliche Östrogengehalt bei Männern und Frauen während des Alterungsprozesses sollte eine höhere antioxidative Kapazität bei älteren Frauen ergeben. Obwohl bekannt ist, dass Östrogenverbindungen zu der Hochregulation von Genen - welche mit dem antioxidativen System assoziiert sind - beitragen, ist der Einfluss der Östrogene auf das Glutathionsystem nicht endgültig klar. (*Erden-Inal et al. 2002, Ozbay und Dülger 2002*).

Harnsäure ist als der Haupt-Hydroxylradikalfänger sowohl im Intra- als auch im Extrazellularraum in hohen Konzentrationen vorhanden. Die Harnsäure kann mittels enzymatischer Tests unter Verwendung eines Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 293 nm bestimmt werden. Einige Autoren berichteten über einen Anstieg des Harnsäurelevels im menschlichen Plasma mit zunehmendem Alter, während andere dagegen keine signifikanten Erhöhungen oder sogar niedrigere Harnsäurelevel finden.

Andererseits ist gut bekannt, dass Harnsäurekonzentrationen stark durch die Nahrung beeinflusst werden.

Eine andere Gruppe von Substanzen, welche ebenfalls die Zellen vor Schäden durch oxidativen Stress schützen, sind die Vitamine. Speziell die Vitamine A, C und E haben antioxidative Anteile (*Merker et al. 2001*). Vitamin A, auch bekannt als Retinol, ist wichtig für die Aufrechterhaltung des Sehvermögens. Es kann aus seinen Vorläufern innerhalb der Carotinoide synthetisiert werden. Die Hauptaufgabe des Vitamins C, welches auch als Ascorbinsäure bezeichnet wird, ist die Abwehr von Infektionen und die Kollagensynthese.

4. Diskussion

Vitamin E, auch Tocopherol genannt, ist notwendig für die Erneuerung von Zellen, zur Inhibition von inflammatorischen Läsionen und es hat positive Effekte auf das Immunsystem. Die Konzentrationen von Vitamin A, C, und E sind stark von der Ernährung abhängig und deshalb keine guten Biomarker für oxidativen Stress.

Weiterhin gibt es Enzyme mit antioxidativen Eigenschaften. Manche Enzyme werden durch den Oxidationsstatus der Zelle beeinflusst. Einige von ihnen werden spezifisch für die Einhaltung des Redox-Gleichgewichts nach oxidativem Stress verwendet. Deshalb können Veränderungen der Menge oder der Aktivität dieser Enzyme als Biomarker dienen. Manchmal können auch Minerale wie Selen, Mangan, Kupfer und Zink als Antioxidantien gesehen werden, aber die wesentliche antioxidative Aufgabe dieser Minerale ist die Synthese von antioxidativ agierenden Enzymen wie der SOD (Superoxiddismutase) (*Irshad und Chaudhuri 2002*). Die Quantifizierung dieser Enzyme kann entweder durch die enzymatische Aktivität mittels immunhistochemischer Erkennung der Proteine oder durch die Analyse von Expressionsprofilen der korrespondierenden RNAs ermittelt werden. Wenn diese Untersuchungen durch Mikrochips erfolgen können, so ist es möglich, mehrere Enzyme zur selben Zeit zu messen. Somit kann eine Vielzahl von klinischen Proben gleichzeitig gemessen werden. Einige Forscher fanden eine Abnahme der SOD (*Inal et al. 2001, Kasapogul und Ozben 2001, Tokunaga et al. 1998, Ceballos-Picot et al. 1992*), andere konnten keinen altersabhängigen Unterschied finden (*Barnett und King 1995*) oder sie zeigten einen Anstieg während des Alterns (*Ozbay und Dülger 2002, Saraymen et al. 2003*). Die Glutathionperoxidase oxidiert Glutathion und erniedrigt somit das antioxidative Potential des Glutathionsystems. In der Vergangenheit wurde kontrovers berichtet, dass Altern zu einem Anstieg der Glutathionperoxidase-Aktivität (*Inal et al. 2001, Erden-Inal et al. 2002, Ceballos-Picot et al. 1992*) oder zu einer Abnahme der Aktivität führt (*Rondanelli et al. 1997, Kasapogul und Ozben 2001, Tokunaga et al. 1998*) oder das Altern keinen Einfluss auf die Aktivität der Glutathionperoxidase hat (*Barnett und King, 1995*).

Für die Glutathionreduktase (GSSG-R) und für die Glutathion-S-Transferase (GSH-S-T) wurden nur negative Korrelationen mit dem Alter beschrieben (*Erden-Inal et al. 2002, Ceballos-Picot et al. 1992*). Die Katalase (CAT) baut Hydrogenperoxide um und schützt den Organismus dadurch vor oxidativer Zerstörung. Vorangegangene Untersuchungen fanden entweder keine signifikanten Veränderungen (*Kasapogul und Ozben 2001, Tokunaga et al. 1998, Barnett und King 1995*) oder ansteigende Werte der CAT-Aktivität mit zunehmendem Alter (*Inal et al. 2001, Gianni et al. 2004*).

4. Diskussion

Schlussfolgernd kann man sagen, dass in der Vergangenheit eine Vielzahl von Molekülen als Biomarker für oxidativen Stress während des Alterns bekannt wurden, allerdings sind die Daten für einige sehr widersprüchlich. Ein Grund dafür ist, dass verschiedene Forschungsgruppen unterschiedliche Methoden für die Quantifizierung angewendet haben, und nicht alle bekannten Marker als klinisch relevante Biomarker dienen.

Ein anderer Grund für die Variationen der Daten in der Literatur ist, dass eine Vielzahl Einflüsse auf die einzelnen Biomarker wirkt. Deshalb muss immer ein Pattern an klinischen Biomarkern untersucht werden, um den Oxidationsstatus einer Person im Sinne von personalized medicine zu bestimmen. Seitdem entdeckt wurde, dass das Proteasom für den Abbau von oxidierten Proteinen verantwortlich ist und während des Alterns gehemmt wird, gilt es auch als guter Biomarker für die Alterung (*Voss und Siems 2006*).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal experimentell die über längere Zeiten bereits postulierte altersabhängige inverse Korrelation zwischen Proteinoxidation und proteasomaler Aktivität in vivo gezeigt. Selbstverständlich ist dies eine korrelative Beobachtung, die kausale Zusammenhänge nicht zwingend begründet.

5. Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

- Gibt es bei der Alterung verschiedener Organe eine verstärkte LPO und PO?
- Wie ändert sich die Aktivität des proteasomalen Systems der Beseitigung oxidativ modifizierter Proteine altersabhängig in den untersuchten Organen?
- Korreliert die altersabhängige Veränderung der Aktivität des Proteasoms als Bestandteil der sekundären antioxidativen Schutzsysteme mit der altersabhängigen Anhäufung oxidativ modifizierter Proteine – generell oder in einzelnen Organen?

Für die Bewertung der LPO wurde MDA als Parameter gewählt und mittels HPLC analysiert. Des Weiteren wurden für die PO in den untersuchten Organen die Protein-Carbonyle mittels ELISA gemessen und zusätzlich die Kapazität des 20S-Proteasoms mittels Fluorometrie. Alle Untersuchungen wurden an Wistar-Ratten folgenden Alters vorgenommen: 6, 10, 18 und 26 Monate (je Gruppe n von 5 bis 7). Die normale Verteilung der Daten wurde mit dem One sample Kolmogorov-Smirnov-Test bewertet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS (15.0) durchgeführt.

Die MDA- und die Protein-Carbonyl-Konzentrationen stiegen in allen Organen spätestens ab dem 18. Monat im Vergleich zum 6. und auch zum 10. Monat an. Weitere Veränderungen in der 4. Altersgruppe waren nicht signifikant. Die Aktivität des Proteasoms fiel insgesamt ab. Signifikante Verringerungen zeigten sich in Lunge und Leber. Die Proteasomenaktivität in diesen beiden Organen verringerte sich um den Faktor fünf. Strenge Korrelationen zwischen Proteasomenaktivität und Proteinoxidation wurden ebenfalls in Leber und Lunge gefunden, während in den anderen Organen nur ein solcher Trend sichtbar wurde. Die Resultate zeigen, dass der Anstieg der Proteinoxidation und der Abfall der Proteasomenaktivität korrelieren. Der Abfall des proteasomalen Abbaus allein kann die gemessene Akkumulationsrate der Protein-Carbonyle nicht erklären. Somit sind sowohl der altersabhängige Abfall der proteasomalen Aktivität als auch die erhöhte Bildungsrate oxidativ veränderter Proteine am Anstieg der Protein-Carbonyle beteiligt.

Sowohl LPO als auch Proteinoxidation tragen maßgeblich zur Alterung bei und zwar durch vermehrte direkte Bildung der LPO- und PO-Produkte als auch durch deren verminderte Beseitigung. Maßnahmen zur Erhaltung der Aktivität des Proteasoms im höheren Lebensalter könnten die Alterungsprozesse verzögern.

5. Zusammenfassung

Summary

The following questions should be answered in this dissertation:

- Is there an increased LPO and PO relative to aging of different organs?
- How is the activity of the proteasomal elimination of oxidatively modified proteins, in relation to the age, within the examined organs changing?
- Is the age related change of the proteasomal activity as a part of the second antioxidative protection system correlating with age-related accumulation of oxidatively modified proteins in generally or in single organs?

For the evaluation of the LPO, the MDA was chosen as the parameter and was analysed by HPLC. Furthermore the protein carbonyles were measured for the PO of all organs via ELISA. Additionally fluorimetry was used to record the capacity of the 20S-proteasome. All investigations were done on Wistar-rats of the following ages: 6, 10, 18 and 26 months (each group with n=5–7). The average assignment of the data was evaluated with the one sample Kolmogorov-Smirnov test. The statistical analysis was carried by means of SPSS (15.0) software.

The MDA- and protein-carbonyl concentrations increased in all organs from the 18th month at the latest (compared to the 6th and the 10th month).

Further values in the 4th age group did not show any significant changes. There was an overall decrease of the proteasomal activity. Significant decreases appeared in lung and liver. The activity of the proteasom showed a decrease to 20 % in these organs. A strong correlation between proteasomal activity and protein-oxidation in liver and lung were found as well, as there appeared only a trend in other organs. The results show that there is a relation between an increase of protein-oxidation and a decrease of the proteasomal activity.

The reduction of the proteasomale degradation alone cannot explain the measured accumulation of the protein-carbonyls.

Therefore the age-related reduction of the proteasomale activity, as well as the higher creation rate of oxidatively changed proteins, is contributing to the accumulation of protein carbonyls. Ageing processes might be delayed by methods, which are able to maintain a high activity of the proteasom until higher age.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Aminoadipin-Semialdehyd
AKT	Aktivität
AMD	age-related macular degeneration (Alters-abhängige Makuladegeneration)
AOPP	advanced oxidation protein products
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	bovines Serum Albumin (Rinder-Serum Albumin)
CAT	Catalase
CB	Carbonyl
CuZnSOD	Kupfer-Zinkabhängige Superoxiddismutase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNPH	Dinitrophenylhydrazin
E_{hc}	Halbzellenpotential
EAT5	Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (5. Tag= schnelles Wachstum)
EAT12	Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (12. Tag= langsames Wachstum)
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENT	Enterozyten
GAG	Glycosaminoglykan(e)
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GGs	γ -Glutamin Semialdehyd

6. Abkürzungsverzeichnis

Gpx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSH-S-T	Glutathion-S-Transferase
GSSG	Glutathiondisulfid
GSSR	Glutathionreduktase
HCl	Salzsäure
Hep	Hepatom
HNE	Hydroxnonenal
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (high performance liquid chromatography)
IFM	interfibrilläre Mitochondrien
LC-MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
LHP	Lipidhydroperoxid
LPO	Lipidperoxidation
M.	Musculus
MCA	Methyl-Cumarinamid
MDA	Malondialdehyd
Mito	Mitochondrien
MnSOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase
NT	Nitrotyrosin
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCO	Proteincarbonyle

6. Abkürzungsverzeichnis

pH	potentia Hydrogenii
PO	Proteinoxidation
P-SH	Protein-Thiol
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
SF	Synovialfibroblasten
SOD	Superoxiddismutase
SSM	subsarcolemmale Mitochondrien
StA	Standardabweichung
TAS	totaler antioxidativer Status
TBA-RS	Thiobarbitursäure reaktive-Substanzen
TEMED	Tetraethylendiamin
Thym	Thymozyten
TLC	thin layer chromatography (Dünnschichtchromatographie)
UA	Harnsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
z.B.	zum Beispiel
8-OHdG	8-Hydroxy-2-deoxy- Guanosin

7. Literaturverzeichnis

7. Literaturverzeichnis

1. Aresin L. [Problems in adolescent contraception]. *Z Gesamte Hyg.* 1981; 27(7):560-1.
2. Barja G. Free radicals and aging. *Trends Neurosci.* 2004; 27(10):595-600.
3. Barnett YA, King CM. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat Res.* 1995; 338(1-6):115-28.
4. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998; 78(2):547-81.
5. Bekaert S, Van Pottelbergh I, De Meyer T, u.a. Telomere length versus hormonal and bone mineral status in healthy elderly men. *Mech Ageing Dev.* 2005; 126(10):1115-22.
6. Bekaert S, De Meyer T, Van Oostveldt P. Telomere attrition as ageing biomarker. *Anticancer Res.* 25(4):3011-21.
7. Birg G. Clinical documentation specialist staffing requirements. *Healthc Financ Manage.* 2008; 62(8):101-2.
8. Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Beaudoux JL, u.a. [Aging and oxidative stress. Which potential markers?]. *Ann Biol Clin (Paris).* 59(4):453-9.
9. Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 33(5):611-619.
10. Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23(3):361-6.
11. Cakatay U, Telci A, Kayali R, u.a. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clin Biochem.* 2003;36(1):51-5.

7. Literaturverzeichnis

12. Camera E, Picardo M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002; 781(1-2):181-206.
13. Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A, Sinet PM, Thevenin M. Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem.* 1992; 38(1):66-70.
14. Chehab O, Ouertani M, Souiden Y, Chaieb K, Mahdouani K. Plasma Antioxidants and Human Aging: A Study on Healthy Elderly Tunisian Population. *Mol Biotechnol.* 2008.
15. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res.* 2000; 33 Suppl:S99-108.
16. Chondrogianni N, Gonos ES. Proteasome activation as a novel antiaging strategy. *IUBMB Life.* 2008; 60(10):651-655.
17. Cutler RG. Genetic stability and oxidative stress: common mechanisms in aging and cancer. *EXS.* 1992; 62:31-46.
18. Daneshvar B, Frandsen H, Dragsted LO, Knudsen LE, Autrup H. Analysis of native human plasma proteins and haemoglobin for the presence of bityrosine by high-performance liquid chromatography. *Pharmacol. Toxicol.* 1997; 81(5):205-208.
19. de Souza-Pinto NC, Bohr VA. The mitochondrial theory of aging: involvement of mitochondrial DNA damage and repair. *Int Rev Neurobiol.* 2002; 53:519-34.
20. Di Massimo C, Scarpelli P, Di Lorenzo N, u.a. Impaired plasma nitric oxide availability and extracellular superoxide dismutase activity in healthy humans with advancing age. *Life Sci.* 2006; 78(11):1163-7.
21. Diamond J, Skaggs J, Manaligod JM. Free-radical damage: a possible mechanism of laryngeal aging. *Ear Nose Throat J.* 2002; 81(8):531-3.

7. Literaturverzeichnis

22. Dorman JB, Albinder B, Shroyer T, Kenyon C. The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1995; 141(4):1399-406.
23. Dröge W. Oxidative stress and aging. *Adv Exp Med Biol*. 2003; 543:191-200.
24. Erden-Inal M, Sunal E, Kanbak G. Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochem Funct*. 2002; 20(1):61-6.
25. Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem J*. 1982; 208(1):129-40.
26. Ethen CM, Reilly C, Feng X, Olsen TW, Ferrington DA. Age-related macular degeneration and retinal protein modification by 4-hydroxy-2-nonenal. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48(8):3469-79.
27. Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*. 23(5):795-807.
28. Gianni P, Jan KJ, Douglas MJ, Stuart PM, Tarnopolsky MA. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp Gerontol*. 2004; 39(9):1391-400.
29. Gil L, Siems W, Mazurek B, u.a. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic Res*. 2006; 40(5):495-505.
30. Grune T. Oxidants and antioxidative defense. *Hum Exp Toxicol*. 2002; 21(2):61-2.
31. Grune T, Siems W, Kowalewski J, Zollner H, Esterbauer H. Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by enterocytes of rat small intestine. *Biochem Int*. 1991; 25(5):963-71.

7. Literaturverzeichnis

32. Grune T, Siems WG, Schönheit K, Blasig IE. Release of 4-hydroxynonenal, an aldehydic mediator of inflammation, during postischaemic reperfusion of the myocardium. *Int J Tissue React.* 1993; 15(4):145-50.
33. Grune T, Siems WG, Zollner H, Esterbauer H. Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic lipid peroxidation product, in Ehrlich mouse ascites cells at different proliferation stages. *Cancer Res.* 1994;54(19):5231-5.
34. Grune T, Reinheckel T, Joshi M, Davies KJ. Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J Biol Chem.* 1995; 270(5):2344-51.
35. Grune T, Shringarpure R, Sitte N, Davies K. Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001; 56(11):B459-67.
36. Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJA. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305(3):709-18.
37. Hagen TM. Oxidative stress, redox imbalance, and the aging process. *Antioxid. Redox Signal.* 2003; 5(5):503-506.
38. Harman D. Free radicals in aging. *Mol Cell Biochem.* 1988; 84(2):155-61.
39. Harman D. Free radical theory of aging: history. *EXS.* 1992; 62:1-10.
40. Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal.* 2003; 5(5):557-61.
41. Harman D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1067:10-21.
42. Hernanz A, Fernández-Vivancos E, Montiel C, Vazquez JJ, Arnalich F. Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. *Life Sci.* 2000; 67(11):1317-24.

7. Literaturverzeichnis

43. Hughes KA, Reynolds RM. Evolutionary and mechanistic theories of aging. *Annu Rev Entomol.* 2005; 50:421-45.
44. Inal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta.* 2001; 305(1-2):75-80.
45. Irshad M, Chaudhuri PS. Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. *Indian J Exp Biol.* 2002; 40(11):1233-9.
46. Jana CK, Das N, Sohal RS. Specificity of age-related carbonylation of plasma proteins in the mouse and rat. *Arch Biochem Biophys.* 2002; 397(2):433-9.
47. Jeune B. Living longer--but better? *Aging Clin Exp Res.* 2002; 14(2):72-93.
48. Jones DP, Mody VC, Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg P. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33(9):1290-300.
49. Judge S, Judge A, Grune T, Leeuwenburgh C. Short-term CR decreases cardiac mitochondrial oxidant production but increases carbonyl content. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 286(2):R254-9.
50. Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T, Leeuwenburgh C. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB J.* 2005; 19(3):419-21.
51. Jung T, Höhn A, Catalgol B, Grune T. Age-related differences in oxidative protein-damage in young and senescent fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 2009; 483(1):127-135.
52. Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, u.a. Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 25(1-2):5-16.
53. Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, u.a. Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 25(1-2):5-16.

7. Literaturverzeichnis

54. Kasapoglu M, Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol.* 2001; 36(2):209-20.
55. Kim CH, Zou Y, Kim DH, u.a. Proteomic analysis of nitrated and 4-hydroxy-2-nonenal-modified serum proteins during aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2006; 61(4):332-8.
56. Klinke R, Silbernagl S. *Lehrbuch der Physiologie.* 4. Aufl. Thieme, Stuttgart; 2003:842.
57. Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007; 292(1):R18-36.
58. Kulikov VY, Fridman YM, Fomin AN. Role of oxidative stress in mechanisms of premature aging in shift labor workers. *Alaska Med.* 2007; 49(2 Suppl):81-4.
59. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-685.
60. Lahnert P. An improved method for determining telomere length and its use in assessing age in blood and saliva. *Gerontology.* 51(5):352-6.
61. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie und Pathobiochemie.* 8. Aufl. Springer, Berlin; 2006:1266.
62. Loft S, Fischer-Nielsen A, Jeding IB, Vistisen K, Poulsen HE. 8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage. *J Toxicol Environ Health.* 40(2-3):391-404.
63. Mary J, Vouquier S, Picot CR, u.a. Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized proteins. *Exp. Gerontol.* 2004; 39(8):1117-1123.
64. Marzani B, Felzani G, Bellomo RG, Vecchiet J, Marzatico F. Human muscle aging: ROS-mediated alterations in rectus abdominis and vastus lateralis muscles. *Exp Gerontol.* 2005; 40(12):959-65.

7. Literaturverzeichnis

65. Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1990; 65(3):375-98.
66. Mehlhase J, Sandig G, Pantopoulos K, Grune T. Oxidation-induced ferritin turnover in microglial cells: role of proteasome. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38(2):276-85.
67. Mendoza-Núñez VM, Ruiz-Ramos M, Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Muñoz-Sánchez JL. Aging-related oxidative stress in healthy humans. *Tohoku J Exp Med.* 2007; 213(3):261-8.
68. Merker K, Stolzing A, Grune T. Proteolysis, caloric restriction and aging. *Mech Ageing Dev.* 2001; 122(7):595-615.
69. Merker K, Ullrich O, Schmidt H, Sitte N, Grune T. Stability of the nuclear protein turnover during cellular senescence of human fibroblasts. *FASEB J.* 2003; 17(13):1963-5.
70. Merker K, Grune T. Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescence. *Exp Gerontol.* 2000; 35(6-7):779-86.
71. Mutlu-Türkoğlu U, İlhan E, Öztezcan S, u.a. Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clin Biochem.* 2003; 36(5):397-400.
72. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* 1987; 262(12):5488-5491.
73. Ozbay B, Dülger H. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking. *Tohoku J Exp Med.* 2002; 197(2):119-24.
74. Pansarasa O, Bertorelli L, Vecchiet J, Felzani G, Marzatico F. Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27(5-6):617-22.

7. Literaturverzeichnis

75. Pantke U, Volk T, Schmutzler M, u.a. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27(9-10):1080-6.
76. Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR, u.a. Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. *J Am Geriatr Soc.* 1998; 46(7):833-8.
77. Reinheckel T, Sitte N, Ullrich O, u.a. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem J.* 1998; 335 (Pt 3):637-42.
78. Requena JR, Levine RL, Stadtman ER. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids.* 2003; 25(3-4):221-6.
79. Richter C. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1995; 27(7):647-653.
80. Rondanelli M, Melzi d'Eril GV, Anesi A, Ferrari E. Altered oxidative stress in healthy old subjects. *Aging (Milano).* 1997; 9(3):221-3.
81. Satchek JM, Milbury PE, Cannon JG, Roubenoff R, Blumberg JB. Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34(12):1575-88.
82. Safciuc F, Constantin A, Manea A, u.a. Advanced glycation end products, oxidative stress and metalloproteinases are altered in the cerebral microvasculature during aging. *Curr Neurovasc Res.* 2007; 4(4):228-234.
83. Saraymen R, Kilic E, Yazar S, Cetin M. Influence of sex and age on the activity of antioxidant enzymes of polymorphonuclear leukocytes in healthy subjects. *Yonsei Med J.* 2003; 44(1):9-14.
84. Saretzki G, Von Zglinicki T. Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 959:24-9.

7. Literaturverzeichnis

85. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30(11):1191-212.
86. Shimizu T, Shirasawa T. [The present and future of antiaging]. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2008; 35(1):1-5.
87. Siems WG, Hapner SJ, van Kuijk FJ. 4-hydroxynonenal inhibits Na(+)-K(+)-ATPase. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20(2):215-23.
88. Siems WG, Zollner H, Grune T, Esterbauer H. Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonenone is not the main product. *J Lipid Res.* 1997; 38(3):612-22.
89. Siems WG, Capuozzo E, Verginelli D, u.a. Inhibition of NADPH oxidase-mediated superoxide radical formation in PMA-stimulated human neutrophils by 4-hydroxynonenal--binding to -SH and -NH₂ groups. *Free Radic Res.* 1997; 27(4):353-8.
90. Siems WG, Pimenov AM, Esterbauer H, Grune T. Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic lipid peroxidation product, in thymocytes as an effective secondary antioxidative defense mechanism. *J Biochem.* 1998; 123(3):534-9.
91. Siems W, Bremer A, Przyklenk J. *Allgemeine Krankheitslehre für Physiotherapeuten: Ein Lehrbuch für Physiotherapeuten.* 1. Aufl. Springer, Berlin; 2008:398.
92. Sitte N, Merker K, Grune T. Proteasome-dependent degradation of oxidized proteins in MRC-5 fibroblasts. *FEBS Lett.* 1998; 440(3):399-402.
93. Sitte N, Huber M, Grune T, u.a. Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *FASEB J.* 2000; 14(11):1490-8.
94. Sitte N, Merker K, Von Zglinicki T, Grune T, Davies KJ. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I-effects of proliferative senescence. *FASEB J.* 2000; 14(15):2495-502.

7. Literaturverzeichnis

95. Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, u.a. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991; 88(23):10540-10543.
96. Sorsa M. Somatic mutation theory. *J Toxicol Environ Health.* 6(5-6):977-82.
97. Sri Kantha S. Total immediate ancestral longevity (TIAL) score as a longevity indicator: an analysis on Einstein and three of his scientist peers. *Med Hypotheses.* 2001; 56(4):519-22.
98. Stadtman ER. Biochemical markers of aging. *Exp Gerontol.* 1988; 23(4-5):327-47.
99. Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 928:22-38.
100. Stadtman ER. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33(5):597-604.
101. Stadtman ER. Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem.* 2004; 11(9):1105-12.
102. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res.* 2006; 40(12):1250-8.
103. Stolzing A, Grune T. The proteasome and its function in the ageing process. *Clin Exp Dermatol.* 2001; 26(7):566-72.
104. Stolzing A, Grune T. Impairment of protein homeostasis and decline of proteasome activity in microglial cells from adult Wistar rats. *J Neurosci Res.* 2003; 71(2):264-71.
105. Strohmaier H, Hinghofer-Szalkay H, Schaur RJ. Detection of 4-hydroxynonenal (HNE) as a physiological component in human plasma. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1995; 11(1):51-61.
106. Strosova M, Voss P, Engels M, Horakova L, Grune T. Limited degradation of oxidized calmodulin by proteasome: Formation of peptides. *Arch Biochem Biophys.* 2008.

7. Literaturverzeichnis

107. Terman A, Brunk UT. Lipofuscin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(8):1400-4.
108. Théron P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2000; 3(5):373-84.
109. Tokunaga K, Kanno K, Ochi M, u.a. [Lipid peroxide and antioxidants in the elderly]. *Rinsho Byori.* 1998; 46(8):783-9.
110. Traverso N, Patriarca S, Balbis E, u.a. Anti malondialdehyde-adduct immunological response as a possible marker of successful aging. *Exp Gerontol.* 2003; 38(10):1129-35.
111. Troen BR. The biology of aging. *Mt Sinai J Med.* 2003; 70(1):3-22.
112. Ullrich O, Grune T, Henke W, Esterbauer H, Siems WG. Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by mitochondria isolated from rat kidney cortex. *FEBS Lett.* 1994; 352(1):84-6.
113. Ullrich O, Siems WG, Lehmann K, u.a. Inhibition of poly(ADP-ribose) formation by 4-hydroxynonenal in primary cultures of rabbit synovial fibroblasts. *Biochem J.* 1996; 315 (Pt 3):705-8.
114. Voss P, Engels M, Horakova L, Grune T. Limited degradation of oxidized calmodulin by proteasome: Formation of peptides. *Arch Biochem Biophys.* 2008.
115. Voss P, Grune T. The nuclear proteasome and the degradation of oxidatively damaged proteins. *Amino Acids.* 2007; 32(4):527-34.
116. Voss P, Siems W. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radic Res.* 2006; 40(12):1339-49.
117. Ward WF, Qi W, Van Remmen H, u.a. Effects of age and caloric restriction on lipid peroxidation: measurement of oxidative stress by F2-isoprostane levels. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005; 60(7):847-51.

7. Literaturverzeichnis

118. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, u.a. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem.* 1987; 33(2 Pt 1):214-20.

119. Wright WE, Shay JW, Piatyszek MA. Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23(18):3794-5.

8. Erklärung über gute und wissenschaftliche Arbeit

8. Erklärung über gute und wissenschaftliche Arbeit

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Ergänzend kann zur beigefügten Publikation

Breusing N, Arndt J, Voss P, Bresgen N, Wiswedel I, Gardemann A, Siems W, Grune T:

Inverse correlation of protein oxidation and proteasome activity in liver and lung.

Mech Ageing Dev 2009 Sep 26 (Epub ahead of print)

mitgeteilt werden, dass ich den Hauptteil der experimentellen Arbeiten für diese Publikation erbracht habe und wesentlich an der Interpretation der Daten beteiligt war. N Breusing ist Erstautorin der Publikation, weil sie auf der Grundlage der Daten und meiner textlichen Zuarbeit die eingereichte Version der Publikation federführend erstellt hat.

9. Anhang

Tab. A1: MDA-Konzentrationen in Herzen von Ratten unterschiedlichen Alters; angegeben werden die Einzelwerte und die dazugehörigen Mittelwerte sowie Standardabweichungen (StA) sowie die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) jeweils in nmol/mg Protein

								Mittelwerte	StA	SEM
Herz	0,01584	0,01232	0,00695	0,00458	0,00879	0,00368	0,00432	0,00869	0,00458	0,00173
Herz	0,01368	0,00482	0,00951	0,01617	0,00918			0,01067	0,00439	0,00196
Herz	0,01884	0,02129	0,03433	0,04929	0,01922	0,04433		0,02859	0,01345	0,00549
Herz	0,02023	0,03541	0,03431	0,03090	0,03008			0,03019	0,00600	0,00268

Tab. A2: MDA-Konzentrationen im Blut von Ratten unterschiedlichen Alters

								Mittelwerte	StA	SEM
Blut	0,01162	0,00483	0,00618	0,00339	0,00175	0,00607	0,00683	0,00581	0,00312	0,00118
Blut	0,00384	0,00302	0,00317	0,00417	0,00400			0,00364	0,00051	0,00023
Blut	0,01773	0,01050	0,01515	0,01680	0,01357	0,02439		0,01636	0,00469	0,00192
Blut	0,01358	0,01748	0,01557	0,01631	0,01740			0,01607	0,00160	0,00072

Tab. A3: MDA-Konzentrationen in der Lunge von Ratten unterschiedlichen Alters

								Mittelwerte	StA	SEM
Lunge	0,00902	0,01203	0,00522	0,00555	0,00437	0,00605	0,00651	0,00697	0,00267	0,00101
Lunge	0,01287	0,00412	0,00749	0,00495	0,00904			0,00769	0,00350	0,00157
Lunge	0,02445	0,02608	0,02582	0,03311	0,02030	0,02779		0,02626	0,00420	0,00171
Lunge	0,03003	0,04133	0,01841	0,03856	0,03267			0,03220	0,00893	0,00399

Tab. A4: MDA-Konzentrationen in der Milz von Ratten unterschiedlichen Alters

								Mittelwerte	StA	SEM
Milz	0,02166	0,01677	0,03436	0,01759	0,01048	0,01319	0,01816	0,01889	0,00771	0,00291
Milz	0,02090	0,01994	0,03714	0,03687	0,01805			0,02658	0,00957	0,00428
Milz	0,05635	0,06147	0,05686	0,06529	0,03889	0,07174		0,05843	0,01115	0,00455

Tab. A5: MDA-Konzentrationen in der Niere von Ratten unterschiedlichen Alters

								Mittelwerte	StA	SEM
Niere	0,00794	0,02899	0,00358	0,01344	0,01756	0,01945	0,00700	0,01399	0,00877	0,00332
Niere	0,01720	0,01042	0,03573	0,01438	0,01102			0,01775	0,01042	0,00466
Niere	0,05364	0,03738	0,05698	0,06839	0,05421	0,09061		0,06020	0,01790	0,00731
Niere	0,03866	0,04685	0,04009	0,07973	0,05868			0,05280	0,01701	0,00761

9. Anhang

Tab. A6: MDA-Konzentrationen in der Skelettmuskulatur von Ratten unterschiedlichen Alters

								Mittelwerte	StA	SEM
Muskel	0,01075	0,00630	0,02611	0,00476	0,00485	0,00705	0,01050	0,01005	0,00749	0,00283
Muskel	0,00420	0,00323	0,00273	0,00030	0,01071			0,00423	0,00389	0,00174
Muskel	0,01057	0,02937	0,01489	0,01659	0,01833	0,04754		0,02288	0,01361	0,00556
Muskel	0,02844	0,02253	0,00089	0,04250	0,01924			0,02272	0,01510	0,00675

Tab. A7: Carbonyl-Konzentrationen in Herzen von Ratten unterschiedlichen Alters; angegeben werden die Einzelwerte und die dazugehörigen Mittelwerte sowie Standardabweichungen (StA) und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) jeweils in nmol/mg Protein

								Mittelwerte	StA	SEM
Herz	0,00228	0,00193	0,00109	0,00232	0,00850	0,00137	0,00050	0,00257	0,00270	0,00102
Herz	0,00238	0,00078	0,00179	0,00218	0,00052			0,00153	0,00084	0,00037
Herz	0,00204	0,00021	0,00502	0,00263	0,00412	0,00577		0,00330	0,00207	0,00085
Herz	0,00797	0,00639	0,01061	0,01173	0,00842			0,00902	0,00213	0,00095

Tab. A8: Carbonyl-Konzentrationen im Blut von Ratten unterschiedlichen Alters

								Mittelwerte	StA	SEM
Blut	0,00211	0,00029	0,00050	0,00023	0,00045	0,00146	0,00050	0,00079	0,00071	0,00027
Blut	0,00155	0,00070	0,00059	0,00211	0,00223			0,00144	0,00077	0,00034
Blut	0,00248	0,00740	0,00190	0,00438	0,00229	0,00128		0,00329	0,00227	0,00093
Blut	0,00806	0,00618	0,00566	0,00329	0,00779			0,00620	0,00192	0,00086

Tab. A9: Carbonyl-Konzentrationen in der Lunge von Ratten unterschiedlichen Alters

								Mittelwerte	StA	SEM
Lunge	0,00084	0,00050	0,00050	0,00050	0,00045	0,00126	0,00065	0,00067	0,00029	0,00011
Lunge	0,00063	0,00078	0,00179	0,00373	0,00041			0,00147	0,00137	0,00061
Lunge	0,00330	0,00230	0,00346	0,00266	0,00151	0,00323		0,00274	0,00075	0,00031
Lunge	0,00508	0,00692	0,00722	0,01982	0,00227			0,00826	0,00676	0,00302

9. Anhang

Tab. A10: Carbonyl-Konzentrationen in der Leber von Ratten unterschiedlichen Alters

								Mittelwerte	StA	SEM
Leber	0,00050	0,00078	0,00050	0,00070	0,00100	0,00072	0,00050	0,00067	0,00019	0,00007
Leber	0,00050	0,00155	0,00059	0,00048	0,00059			0,00074	0,00046	0,00021
Leber	0,00956	0,00735	0,01356	0,00562	0,00613	0,00647		0,00811	0,00301	0,00122
Leber	0,00552	0,01425	0,00860	0,01909	0,00559			0,01061	0,00592	0,00264

Tab. A11: Carbonyl-Konzentrationen in der Milz von Ratten unterschiedlichen Alters

								Mittelwerte	StA	SEM
Milz	0,00050	0,00050	0,00077	0,00091	0,00050	0,00077	0,00059	0,00065	0,00017	0,00006
Milz	0,00060	0,00155	0,00063	0,00179	0,00075			0,00106	0,00056	0,00025
Milz	0,01199	0,01340	0,00050	0,01020	0,00811	0,01113		0,00922	0,00463	0,00189

Tab. A12: Carbonyl-Konzentrationen in der Niere von Ratten unterschiedlichen Alters

								Mittelwerte	StA	SEM
Niere	0,00100	0,00100	0,00050	0,00200	0,00100	0,0005	0,00050	0,00100	0,00055	0,00024
Niere	0,00351	0,00155	0,00028	0,00104	0,00324			0,00193	0,00140	0,00063
Niere	0,00912	0,00281	0,00689	0,00407	0,00662	0,00662		0,00602	0,00225	0,00092
Niere	0,01867	0,00862	0,01289	0,01135	0,00864			0,01203	0,00414	0,00185

Tab. A13: Carbonyl-Konzentrationen im Skelettmuskel von Ratten unterschiedlichen Alters

								Mittelwerte	StA	SEM
Muskel	0,00079	0,00241	0,00042	0,00050	0,00050	0,00208	0,00126	0,00114	0,00081	0,00031
Muskel	0,00115	0,00155	0,00028	0,00063	0,00324			0,00137	0,00115	0,00052
Muskel	0,00406	0,00298	0,00403	0,00391	0,00419	0,00207		0,00354	0,00084	0,00034
Muskel	0,00632	0,00434	0,00186	0,00279	0,00236			0,00353	0,00181	0,00081

9. Anhang

Tab. A14-16: Proteasomenaktivität Aktivität in $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \times \text{min}}$

Herz	0,19511	0,17120	0,21875	0,38995	0,31386	0,33288	0,18560	0,17609	0,21875	0,06658	0,08560
Herz	0,03804	0,06689	0,01379	0,13779	0,08267	0,08267	0,03670	0,02755	0,03670	0,03670	0,15150
Herz	0,04545	0,04545	0,09091	0,04545	0,05682	0,04545	0,03409	0,06818	0,03409	0,07955	0,10227
Herz	0,05109	0,07664	0,07664	0,06387	0,05109	0,06387	0,14051	0,15328	0,12774	0,14964	0,17518
Herz	0,13315	0,97609	0,11413	0,10462	0,16658	0,15218	0,14755	0,04755	0,03804	0,04755	
Herz	0,06890	0,56490	0,56490	0,50980							
Herz	0,09091	0,18182	0,19318	0,18182	0,55682	0,53600	0,71591				
Herz	0,54562	0,10219	0,08942	0,10219							

Mittelwerte	StA	SEM
0,20390	0,20474	0,03729
0,16130	0,04407	0,09434
0,17245	0,01328	0,02294
0,13126	0,04830	0,24528

Lunge	2,74864	1,94022	1,37908	1,15082	1,27446	1,01547	0,85598	0,98913	0,64674	1,55163	2,73370
Lunge	0,96457	1,15748	1,11614	0,78543	0,84055	0,99213	0,49606	0,61411	0,34449	0,75787	0,64764
Lunge	0,15909	0,14773	0,12500	0,05682	0,06818	0,06818	0,31818	0,45455	0,53409	0,21591	0,22727
Lunge	0,11496	0,12774	0,14051	0,21715	0,17883	0,20438	0,16606	0,17883	0,19161	0,37044	0,42153
Lunge	1,97962	0,28533	0,30435	0,29484	0,43750	0,25679	0,05770	0,15217	0,13315	0,12364	
Lunge	0,85433	0,05787	1,22638	1,26772							
Lunge	0,13636	0,19318	0,14773	0,19318	0,10227	0,09091	0,10227				
Lunge	0,39599	0,14051	0,11496	0,12774							

Mittelwerte	StA	SEM
0,96719	0,82771	0,03729
0,80818	0,19425	0,09434
0,18561	0,21477	0,02294
0,20608	0,01951	0,24528

Leber	5,95380	6,96196	6,45788	5,30707	5,35462	4,55571	3,68071	2,26359	2,28261	1,50272	1,88315
Leber	3,85827	4,24409	3,92717	2,61811	2,03937	3,23819	3,70669	3,78937	4,50591	3,04528	4,10630
Leber	0,82955	0,75000	0,11364	0,40909	0,34091	0,30682	1,01136	0,64773	0,55682	0,46591	0,39773
Leber	0,65146	0,31934	1,11131	0,58759	0,99635	1,41788	0,61314	0,52372	0,76642	1,27737	1,96715
Leber	1,73098	4,02310	3,48098	3,75679	6,95245	6,15353	5,29755	5,11685	5,93478	5,05027	
Leber	5,33268	2,02559	2,23228	3,25197							
Leber	0,57955	0,52273	0,39773	0,85227	0,56818	0,71591	0,60227				
Leber	1,00912	1,00912	0,79197	1,27737							

Mittelwerte	StA	SEM
4,46196	1,71010	1,14992
3,46142	1,02351	0,36659
0,55934	0,19294	0,09140
0,95462	0,41602	0,13605

9. Anhang

Tab. A17-19: Proteasomenaktivität Aktivität in $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \times \text{min}}$

Milz	0,31386	0,35190	0,33588	0,19973	0,37092	0,35190	0,27582	0,28533	0,27582	0,32337	0,35190
Milz	0,17913	0,19291	0,31693	0,28937	0,24803	0,27559	0,05512	0,16535	0,12402	0,09646	0,19290
Milz	0,13636	0,12500	0,12500	0,35227	0,12500	0,11364	0,09091	0,10227	0,11364	0,17045	0,23864
Milz	0,18071	0,26630	0,19973	0,28533	0,65625	0,48505	0,39946	0,03804	0,03804	0,03804	
Milz	0,11024	0,17913	0,23425	0,16535							
Milz	0,17045	0,07955	0,09910	0,09091	0,12500	0,13636	0,14773				

Mittelwerte	StA	SEM
0,28683	0,12189	0,05739
0,18832	0,07373	0,02848
0,14124	0,07067	0,03783

Niere	0,38043	0,45652	0,59918	0,31386	0,24728	0,20924	0,23777	0,77989	0,36141	0,17712	0,19973
Niere	0,28937	0,28937	0,23425	0,19291	0,26181	0,22047	0,23425	0,20669	0,13780	0,46850	0,59252
Niere	0,40909	0,49318	0,60227	0,36364	0,27273	0,02273	0,17045	0,21591	0,20455	0,17045	0,20455
Niere	0,21715	0,31934	0,38321	0,35766	0,37044	0,35766	0,20438	0,53650	0,34489	0,35803	0,60221
Niere	0,29484	0,89402	0,88451	0,64674	0,19973	0,15217	0,12364	0,61821	0,55163	0,74185	
Niere	0,57874	0,26181	0,34449	0,31693							
Niere	0,20455	0,11364	0,12500	0,14773	0,15909	0,14773					
Niere	0,53650	0,22993	0,22993	0,26825							

Mittelwerte	StA	SEM
0,43189	0,27419	0,10052
0,30866	0,15077	0,06261
0,23195	0,07619	0,03962
0,35441	0,13049	0,06566

Muskel	1,59783	1,93071	1,45516	0,19022	0,32337	0,23777	0,26630	0,32337	0,34239	0,36141	0,64674
Muskel	0,55118	0,46850	0,38583	0,02756	0,06890	0,04134	0,52362	0,59252	0,50984	0,62772	0,38223
Muskel	0,13636	0,09091	0,06818	0,23864	0,31818	0,26136	0,19318	0,13636	0,25000	0,05682	0,06818
Muskel	0,11496	0,07664	0,08942	0,07664	0,06387	0,07664	0,07664	0,06387	0,07664	0,86861	0,84307
Muskel	0,95109	0,02853	0,03804	0,03804	1,09375	1,28397	1,60734	0,04755	0,03804	0,04755	
Muskel	0,39823	0,37712	0,68701	0,48344							
Muskel	0,06818	0,20455	0,23864	0,21591	0,55682	0,51136	0,71591				
Muskel	0,97080	0,39599	0,44708	0,62591							

Mittelwerte	StA	SEM
0,61187	0,49205	0,18930
0,40834	0,23019	0,53205
0,24053	0,18936	0,07780
0,32445	0,36123	0,16508

9. Anhang

3.5 Statistische Ergebnisse

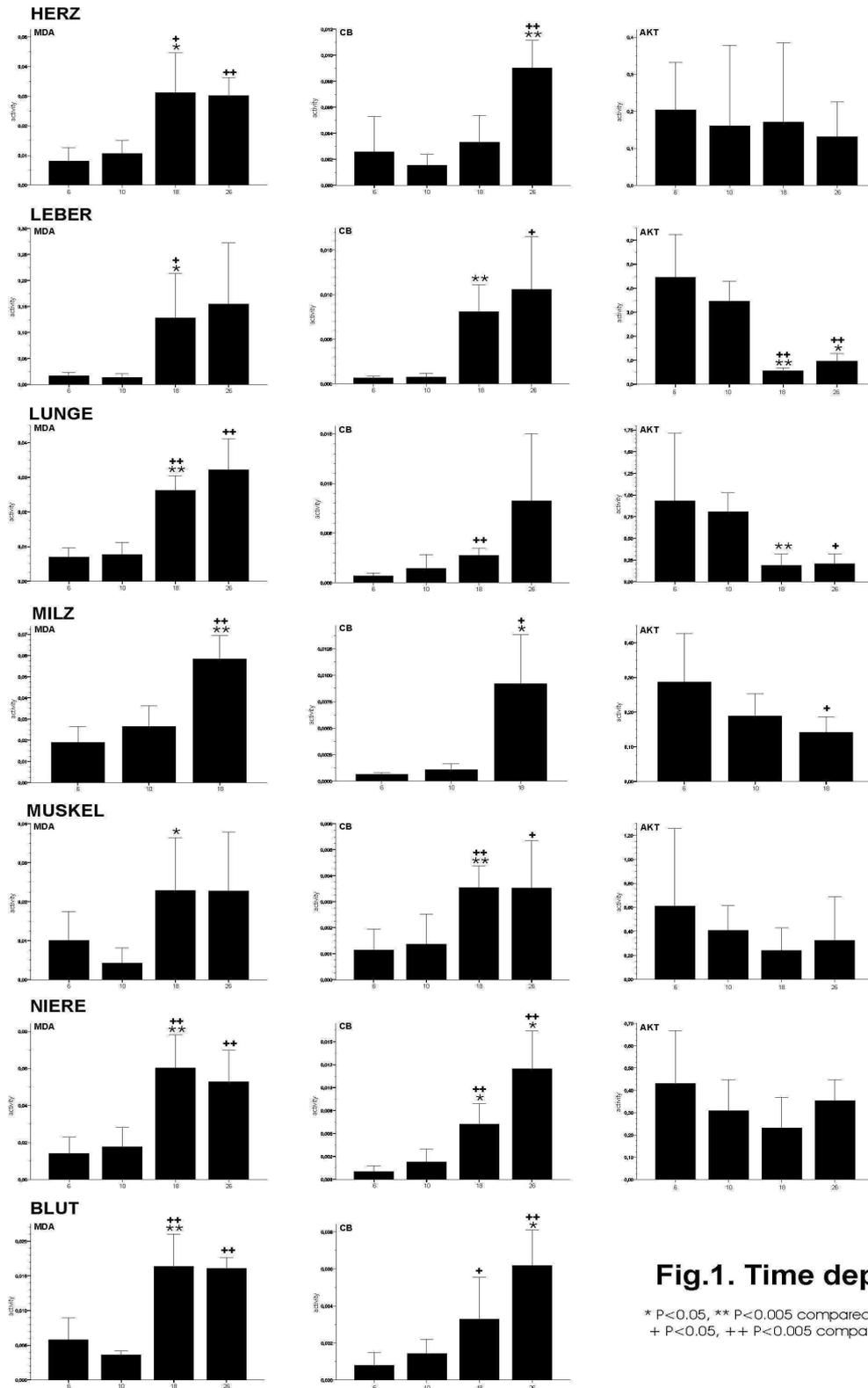


Fig.1. Time dependence

* P<0.05, ** P<0.005 compared to the preceding timepoint;
+ P<0.05, ++ P<0.005 compared to 6 months.

Abb. A1: statistische Ergebnisse - Vergleich der gemessenen Parameter (zeitabhängig)

9. Anhang

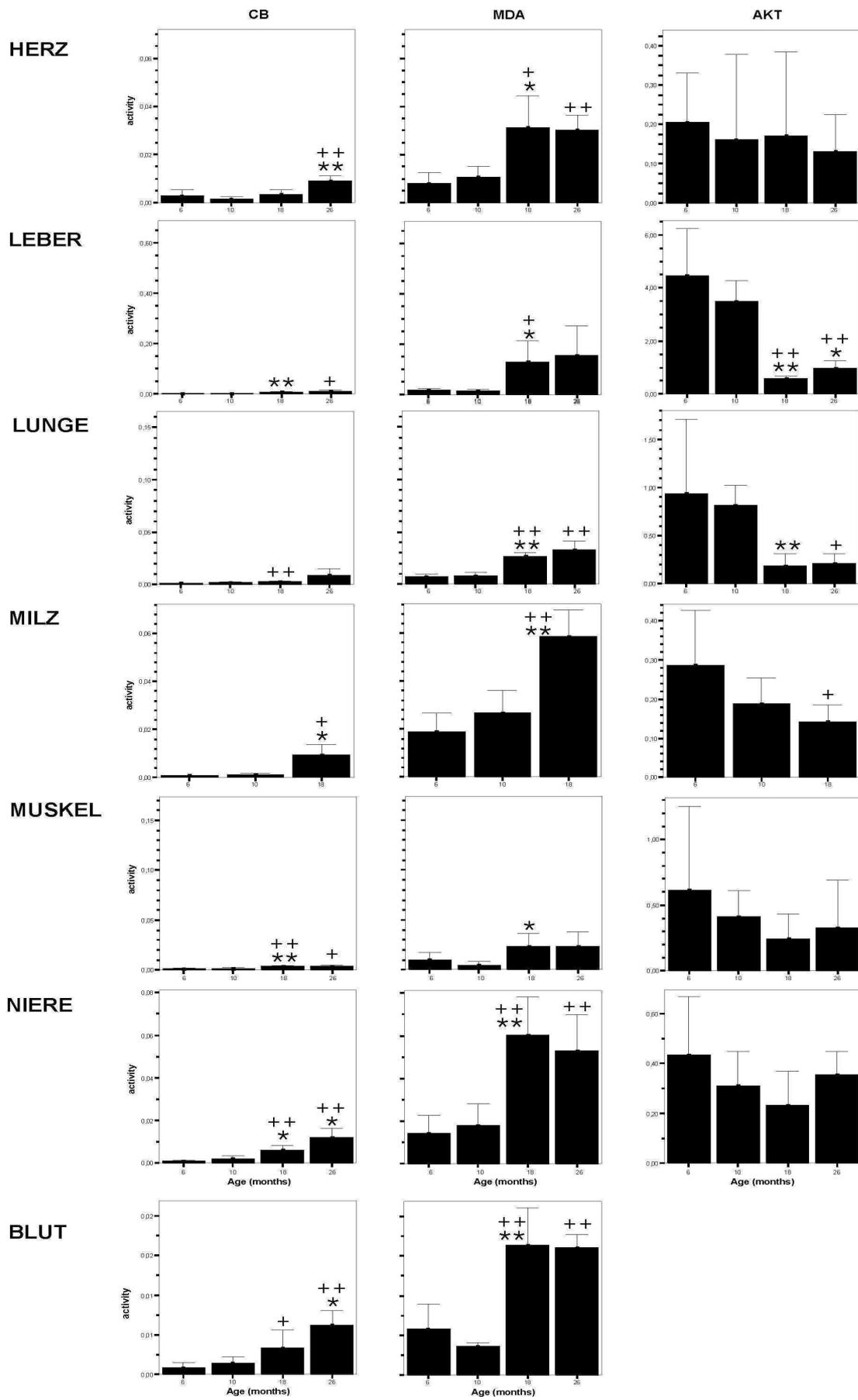


Abb. A2: statistische Ergebnisse - Vergleich der gemessenen Parameter (Konzentration)

9. Anhang

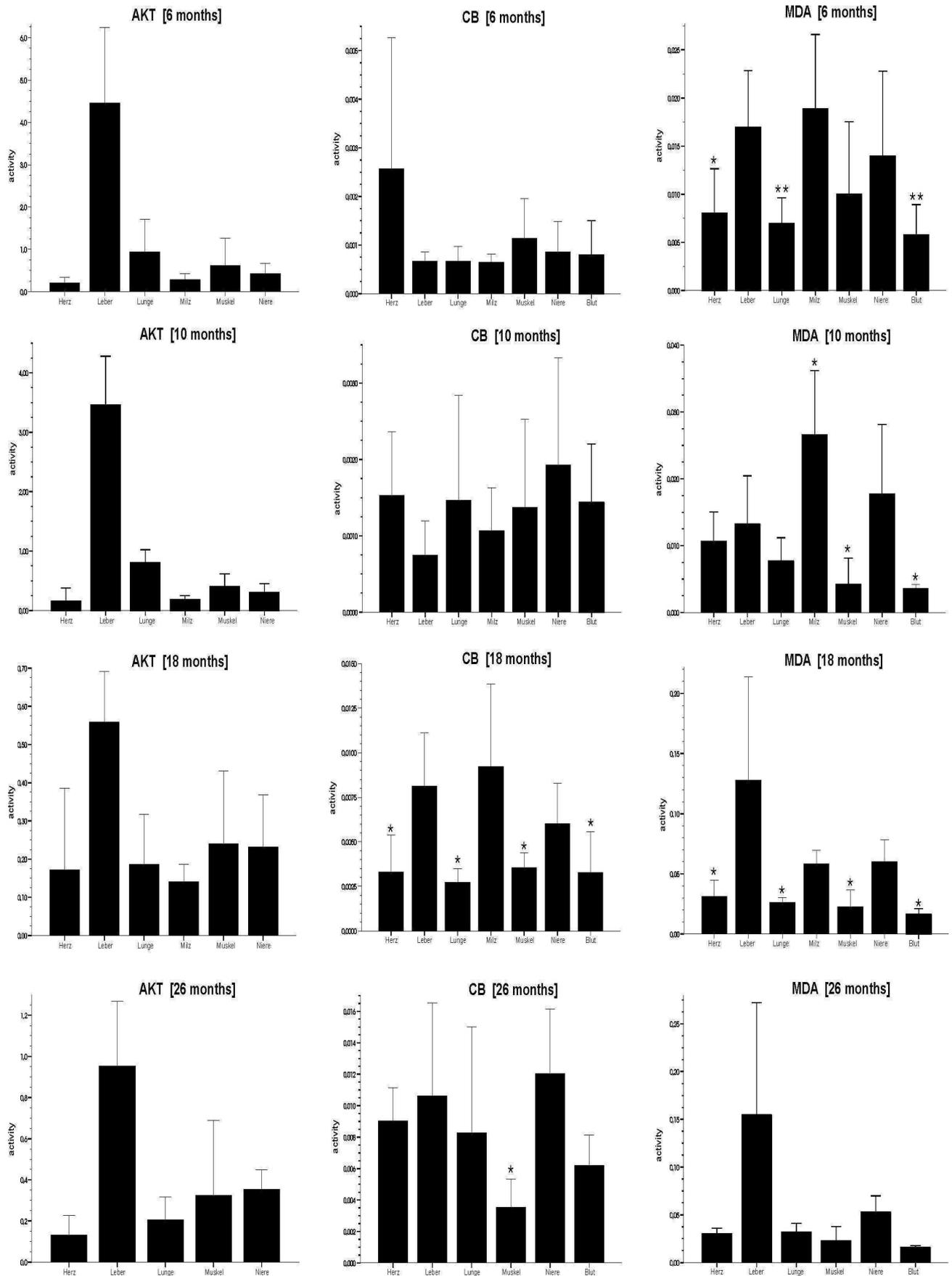


Abb. A3: statistische Ergebnisse - Vergleich der gemessenen Parameter (Organe/ Gewebe untereinander in der jeweiligen Altersgruppe)

9. Anhang

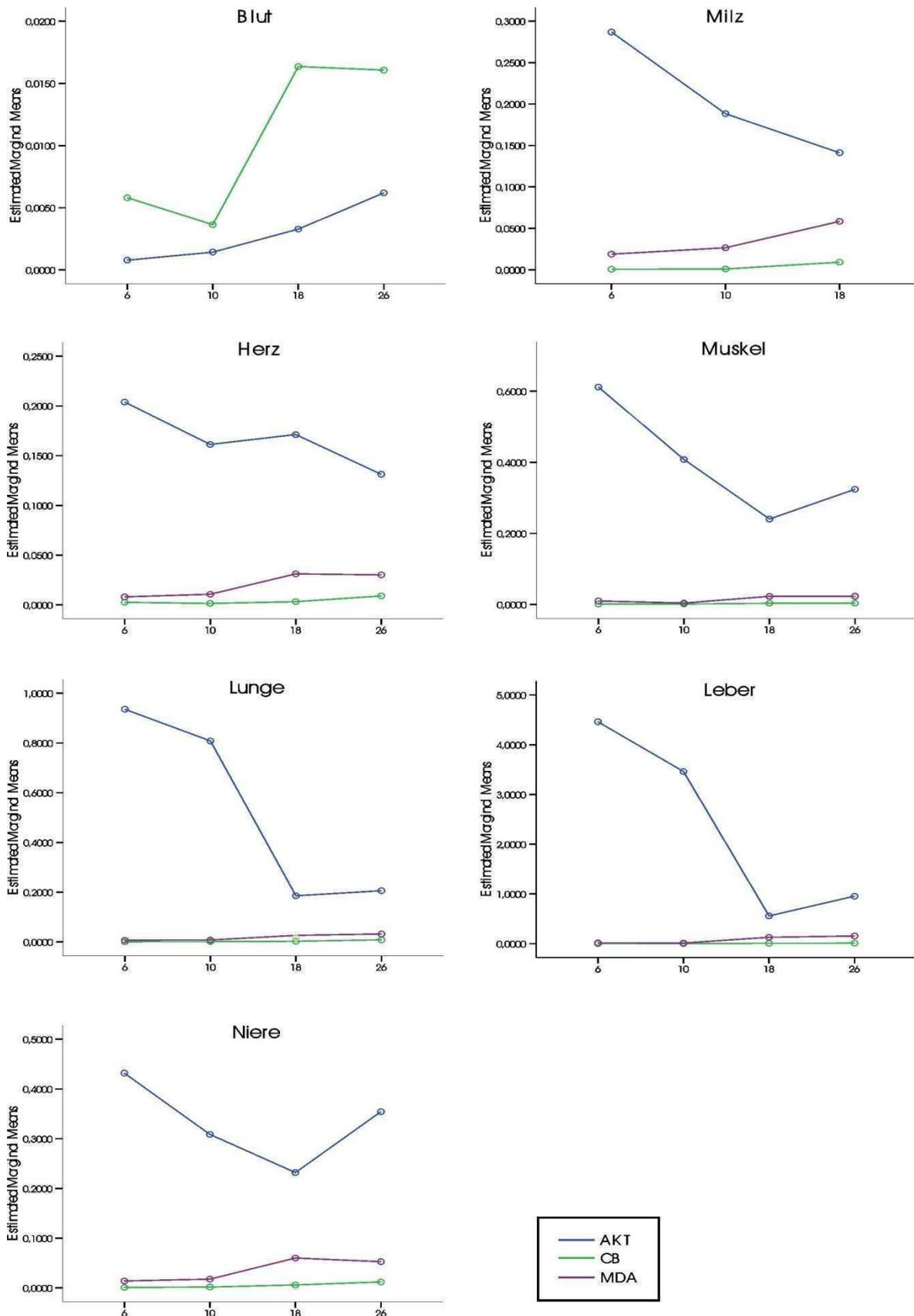
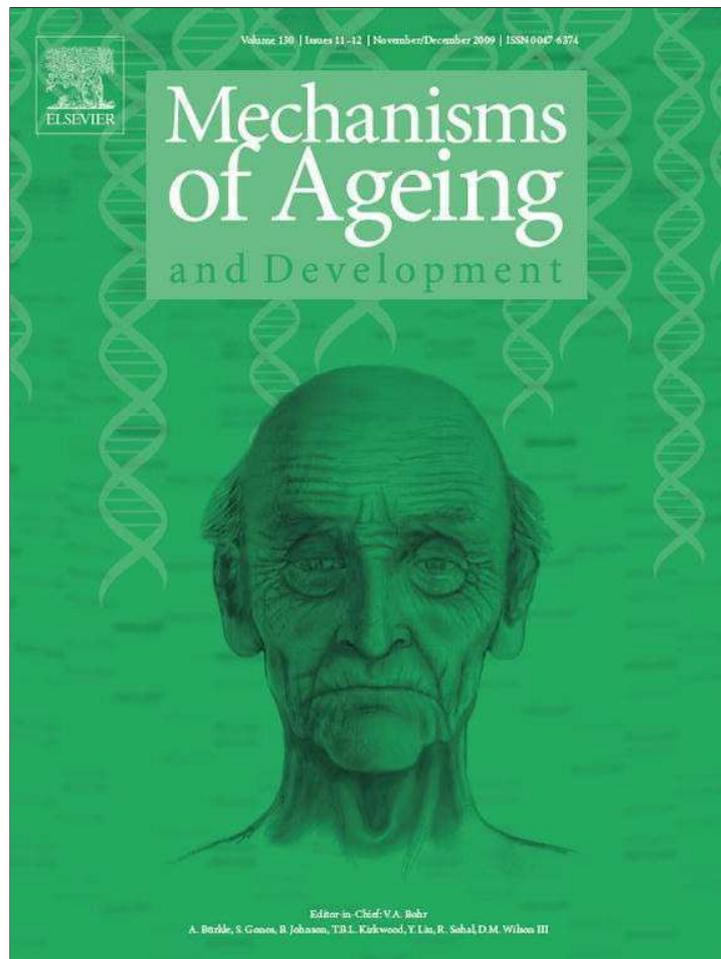


Abb. A4: Diagramm Darstellung der statistischen Ergebnisse - Vergleich der gemessenen Parameter (alle gemessenen Parameter in einem Organ/Gewebe)

9. Anhang

9.2 Akzeptierte und im Druck befindliche Publikation / bereits in PubMed registriert:
Mech Ageing Dev. 2009 Sept 26 [Epub ahead of print]: Breusing N, Arndt J, Voss P, Wiswedel I, Gardemann A, Siems W, Grune T; Inverse correlation of protein oxidation and proteasome activity in liver and lung.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

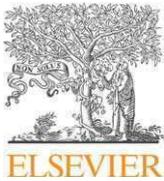


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

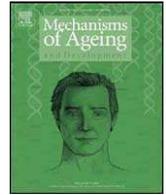
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Mechanisms of Ageing and Development

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mechagedev

Inverse correlation of protein oxidation and proteasome activity in liver and lung

Nicolle Breusing^a, Jana Arndt^a, Peter Voss^a, Nicolaus Bresgen^b, Ingrid Wiswedel^c, Andreas Gardemann^c, Werner Siems^d, Tilman Grune^{a,*}^a Institute of Biological Chemistry and Nutrition, University of Hohenheim, Garbenstraße 28, 70593 Stuttgart, Germany^b Department of Cell Biology, University of Salzburg, Salzburg, Austria^c Department of Pathological Biochemistry, Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, Otto-von-Guericke University, Magdeburg, Germany^d Research Institute of Physiotherapy and Gerontology, KortexMed Institute of Medical Education, Bad Harzburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2009

Received in revised form 15 September 2009

Accepted 18 September 2009

Available online 26 September 2009

Keywords:

Protein oxidation

Proteasome

Rat

ABSTRACT

Several studies have demonstrated that proteasome activity decreases whereas protein oxidation increases with aging in various tissues. However, no studies are available correlating both parameters directly comparing different tissues of one organism. Therefore, we determined whether there is an age-related change in proteasome activity and protein oxidation in heart, lung, liver, kidney and skeletal muscle samples of 6-, 10-, 18- and 26-month-old rats. There was a significant age-related increase in protein carbonyls at 18 and 26 months compared to young rats. Thereby, protein carbonyl formation was rather due to a general than a specific protein carbonylation as shown by immunoblot studies. The highest increase in protein carbonyl formation was found in liver, lung and kidney samples. Proteasome activity decreased significantly with age in lung and liver samples. Proteasome activity in liver and lung decreased by factor five compared to young rats. Strong correlations between proteasome activity and protein oxidation were found in liver and lung, whereas in other tissues only a trend was found. These results demonstrate that the increase in protein oxidation and the decline in proteasome activity are correlating. Further studies are needed to determine the mechanisms which cause organ-specific aging-rates and their consequences.

© 2009 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

Aging is accompanied by a gradual but yet progressive decrease of physiological function in organs leading to an increased susceptibility for diseases. Thus, aging is associated with an increased incidence of cardiac arrhythmias in heart, reduced perfusion in kidney and liver, reduced efficiency in ventilation and gas exchange, a decreased muscular strength and others. However, it has been difficult to separate the effects of aging per se from those of age-associated diseases.

Although the mechanisms leading to the described alterations in different organs are not fully understood, the contribution of oxidative stress in age-related organ changes seems generally agreed (Kregel and Zhang, 2007). The “oxidative stress theory” holds that increases in ROS accompany aging, leading to functional alterations, increased incidence of disease, and a reduction in life span (Hagen, 2003). An increased production of reactive oxygen species in mitochondria of old vs. young animals has been demonstrated by many authors in different tissues (Richter, 1995) which raised the question if mitochondrial DNA damage can be

considered as the pacemaker of the aging process (Grune and Davies, 2001). As a consequence, the accumulation of oxidative damage from the mitochondria, DNA damage, protein damage and lipid peroxidation with age is a common feature of all cells, regardless of their tissue type.

The oxidation of free amino acids, peptides and proteins has been studied by many laboratories (Stadtman, 1993; Davies, 1987). Oxidation reactions can mediate intra- and intermolecular cross-linking of peptides and proteins and fragmentation of polypeptide chains. In different model systems an age-related increase of intracellular protein oxidation has been demonstrated (Stadtman, 2001). A large body of studies measured the formation of protein-bound carbonyls (Gil et al., 2006; Judge et al., 2005; Safciuc et al., 2007). Protein carbonyl content in fibroblasts increased as a function of age of the fibroblast donors (Oliver et al., 1987). An age-dependent increase in the amount of oxidized proteins has also been reported in different aging models of proliferating fibroblasts and non-dividing human fibroblasts (Jung et al., 2009; Sitte et al., 2000a,b). Carbonyl content in human brain rises exponentially with age as shown by Smith et al. (1991). Other markers of age-related changes in protein oxidation have also been observed. In rat liver the level of oxidized methionine was found to rise with animal age (Chao et al., 1997). A large body of literature exists on increased amounts of oxidized proteins in skeletal

* Corresponding author. Fax: +49 711 459 23386.

E-mail address: grune@uni-hohenheim.de (T. Grune).

muscle, heart, skin, liver, lymphocytes of various animal species (for review, see Grune and Davies, 2001).

The increased amounts of intracellular formed oxidized proteins should be either repaired or removed. Cells have developed highly regulated intracellular proteolytic systems responsible for the removal of non-functional proteins, whereas protein disulfides and methionine sulfoxides can be repaired enzymatically (Friguet, 2006; Mary et al., 2004). It is well accepted that the proteasome is able to degrade oxidized proteins selectively (Grune et al., 1997) which distinguishes it from other cellular proteases. The 20S proteasome contains six active proteolytic sites, whereby two of the sites are chymotrypsin-like in specificity and cleave mainly after hydrophobic residues. The other four proteolytic sites are trypsin- and peptidyl-glutamyl-like and cut after basic and acidic residues, respectively. Although the relative importance of the three proteolytic sites varies widely with the substrate and probably other factors (Kisselev et al., 2006), it was shown by a few authors that the chymotrypsin-like site is rate-limiting in protein breakdown (Arendt and Hochstrasser, 1997; Chen and Hochstrasser, 1996; Heinemeyer et al., 1997).

A decrease in the activity of numerous enzymes during aging has been demonstrated in various models (Grune and Davies, 2001). Also the protein catabolism diminishes as an organism ages. A large body of literature exists on the decrease of proteasome activity in vitro and in vivo (Chondrogianni and Gonos, 2005; Vernace et al., 2007). Indeed, studies implying age-related changes of each of the catalytically active sites of the proteasome are complicating the field: it has been reported that peptidyl-glutamyl hydrolyzing activity either decreased (Conconi and Friguet, 1997) or showed no change (Ferrington et al., 2005). Further, trypsin- and chymotrypsin-like activities have been shown to either decrease (Ferrington et al., 2005), increase (Anselmi et al., 1998) or being not influenced by age (Shibatani et al., 1996). Since oxidatively modified proteins are known to be more susceptible to proteolytic degradation by the proteasome than native proteins, it seems obvious that the proteolytic activity of the proteasome is required more and more with increasing age. In contrast, it was shown that the proteasome activity is progressively inhibited by accumulating oxidized and cross-linked cellular proteins as shown in ex vivo (Bulteau et al., 2000) and in vitro (Sitte et al., 2000c) experiments. In the latter investigation the peptidyl-glutamyl hydrolyzing activity pointed out to be the most affected.

Therefore, the age-related accumulation of oxidized proteins may result from either an increase in protein oxidation or a decline in the degradation of oxidized proteins. Further, it seems possible that proteasome inhibition by accumulating protein oxidation products further inhibits the degradation of cellular proteins. It seems possible that both processes contribute to an age-related accumulation of oxidized proteins.

To best of our knowledge, there are no studies investigating protein oxidation and proteasome activity in parallel as age-dependent factors in various animal tissues. Therefore, in order to display the relationship between protein oxidation and the degradation of modified proteins as a function of age, protein carbonyl content and chymotrypsin-like activity was assessed in rats of different ages. To further study whether the different tissues of an organism age at same rates, our investigations were observed in heart-, lung-, liver-, kidney-, skeletal muscle samples in the different age groups.

2. Material and methods

2.1. Animals

The experiments were conducted with 6-month ($n = 7$), 10-month ($n = 5$), 18-month ($n = 6$) and 24-month ($n = 5$)-old male albino rats of the Wistar strain.

Animals were purchased from the animal facility of the University of Düsseldorf. The animals were kept under controlled conditions (12 h light–dark cycle) with free access to food and tap water.

All surgeries were performed under ether anesthesia. A midline incision of the skin down the abdomen was performed to expose the internal organs. The whole organs of heart, liver, lung, kidneys and musculus quadriceps femoris were removed. The procedure after blood flow interruption took less than 3 min. The different tissues were immediately separated into a few fractions, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis (maximum 48 h after surgery). Tissue fractions for proteasome activity were immediately homogenized with 500 μl PBS and stored on ice. Prior to all measurements, frozen tissues fractions were homogenized with 500 μl PBS and stored on ice.

2.2. Protein carbonyl measurements

Protein carbonyl content was determined in the homogenized tissue supernatant from heart, liver, lung, muscle and kidney with protein concentrations of 2 mg/ml employing an ELISA method (Buss et al., 1997), with the appropriate modifications steps (Voss et al., 2006). The detection system used was an anti-dinitrophenyl rabbit IgG-antiserum (Sigma, Deisenhofen, Germany) as the primary antibody and a monoclonal anti-rabbit IgG antibody peroxidase conjugate (Sigma) as the secondary antibody. Development was performed with *o*-phenylenediamine and H_2O_2 .

2.3. Immunoblot analyses

After equalizing the protein content of the different tissue fractions, samples were modified with 2,4-dinitrophenylhydrazine prior to SDS-PAGE, as described previously (Sitte et al., 2000b; Voss et al., 2007). Proteins were transferred from SDS-PAGE gels to nitrocellulose membranes using a Bio-Rad Trans-Blot apparatus and incubated with an anti-rabbit DNP antibody (Sigma). The secondary antibody was an anti-rabbit IgG peroxidase conjugate, which was detected by chemiluminescence using the ECL assay (Amersham, Little Chalfont, U.K.).

2.4. Proteasome activity

The degradation of the fluoropeptide suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (chymotrypsin-like) was measured after addition of the substrate to the tissue homogenates. Protein was determined using a Bio-Rad kit. 20 μl of tissue homogenates were incubated with 170 μl proteolysis buffer (0.15 M sucrose, 25 mM Hepes (pH 7.8), 20 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol) and with 10 μl of the fluoropeptide (2 mM stock solution in DMSO). The mixture was incubated for 60 min at 37°C , and the reaction then stopped by addition of an equal volume of ice-cold 96% ethanol. The fluorescence determination was performed at 360 nm excitation and 485 nm emission using free MCA as a standard and background fluorescence (without suc-LLVY-MCA) was subtracted.

2.5. Statistics

Different organs (heart, liver, lung, kidney, skeletal muscle) from 5 to 7 animals per age group were analyzed. All the data were normalized prior to statistical analysis. Descriptive statistics were carried out with Statistica 7.0. All values reported are mean \pm standard deviation (SD). Data were analyzed by ANOVA and independent sample *t*-test to test for differences between different age groups in different tissues. For the correlation analyses, Pearson's correlation coefficients were calculated. A *P*-value of <0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

In the study the effects of aging on protein oxidation, protein carbonyl content in tissue samples in rats of different ages (6, 10, 18 and 26 months) were determined (Fig. 1). Although the protein carbonyl contents varied little in each organ between 6- and 10-month-old rats, it increased significantly in liver, lung, kidney and skeletal muscle at 18 months of age ($P < 0.05$). Protein carbonyl concentrations in each organ of 26 months old rats were significantly higher compared to 6 months old rats ($P < 0.05$). The results suggest an age-associated increase in protein oxidation in various tissues of rats. The relative changes of protein carbonyl content in all studied tissues are shown in Fig. 2A. The rates of protein oxidation were highest in liver and kidney samples (about 13–15-fold), whereas heart and skeletal muscle showed a smaller increase (about 3-fold) in protein oxidation. To further explore whether the increase in carbonyl content in the different tissues was due to carbonylation of a single protein, we additionally

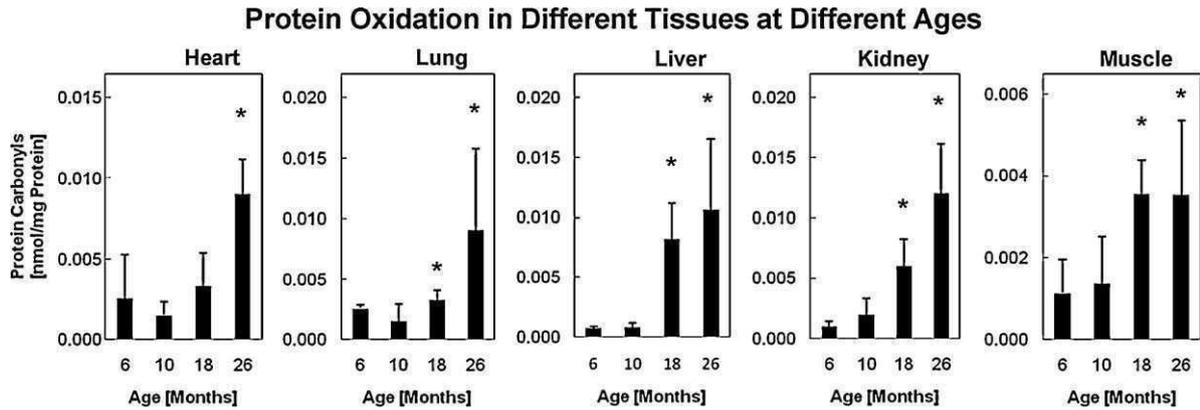


Fig. 1. Age-related changes in protein carbonyl formation in liver, kidney, heart, lung, muscle samples of 6-, 10-, 18- and 26-month-old Wistar rats. Whole organs of heart, liver, lung, kidneys and musculus quadriceps femoris were removed from 6-, 10-, 18- and 26-month-old rats. The different tissues were immediately separated into a few fractions, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis (maximum 48 h after surgery). After homogenization in PBS the homogenate was analyzed by ELISA for protein carbonyl formation. Values represent means \pm SD of 6–8 samples, $^*P < 0.05$ compared to 6-month-old rats (independent sample *t*-test).

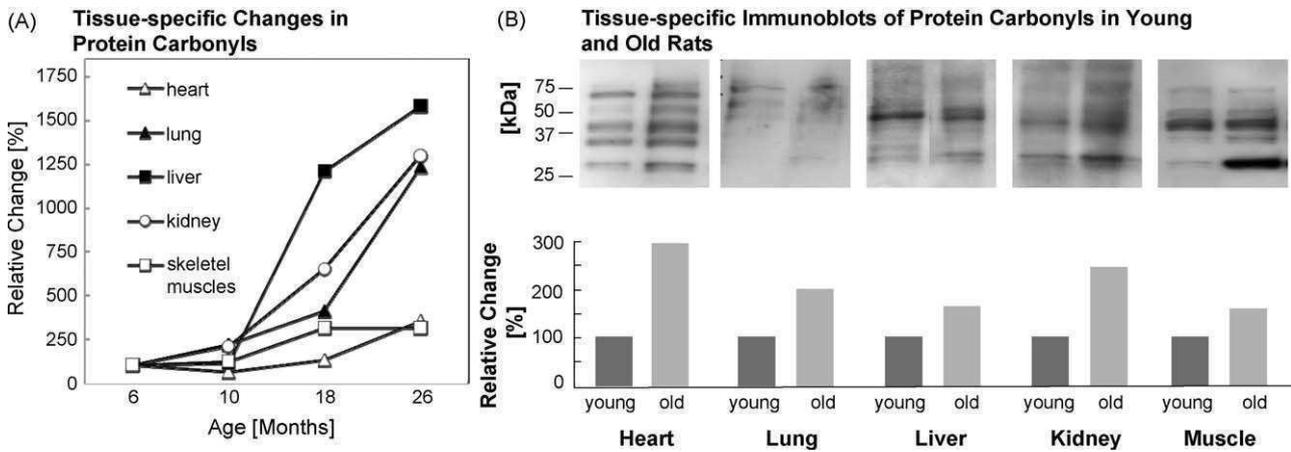


Fig. 2. Tissue-specific changes in protein carbonyl formation with age. (A) The results demonstrate the quantitative evaluation of the means of the different age groups with the mean of the 6 months age group set as 100%. (B) Tissue samples of young (=6 months) and old (=26 months) rats were analyzed by immunoblot analyses with protein bands between 25 and 75 kDa. Results of the young rats were set as 100% in each tissue.

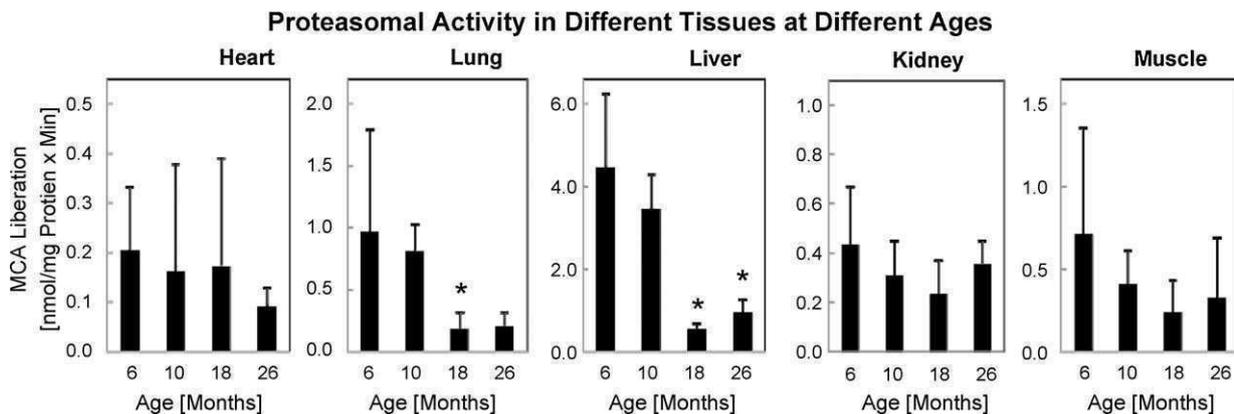


Fig. 3. Age-related changes in proteasome activity in liver, kidney, heart, lung and muscle samples of 6-, 10-, 18- and 26-month-old Wistar rats. Whole organs of heart, liver, lung, kidneys and musculus quadriceps femoris were removed from 6-, 10-, 18- and 26-month-old rats. Tissue fractions for proteasome activity were immediately homogenized with 500 μl PBS. Proteasome activity was measured as the degradation of the fluoropeptide suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (chymotrypsin-like) added to the tissue homogenates. Values represent means \pm SD of 6–8 samples, $^*P < 0.05$ compared to 6-month-old rats (independent sample *t*-test).

examined protein carbonyls by immunoblot analyses in young (6 months) and old (26 months) rats. Fig. 2B shows the tissue-specific immunoblots with protein bands between 25 and 75 kDa. As expected, carbonylation levels increased in all studied tissues and were not due to the carbonylation of a single protein.

To study the effect of tissue aging on the rate of protein catabolism chymotrypsin-like proteasome activity was determined in all tissues of each age group. The results of the measurements are shown in Fig. 3. An age-related decrease in proteasome activity has been observed in liver and lung samples

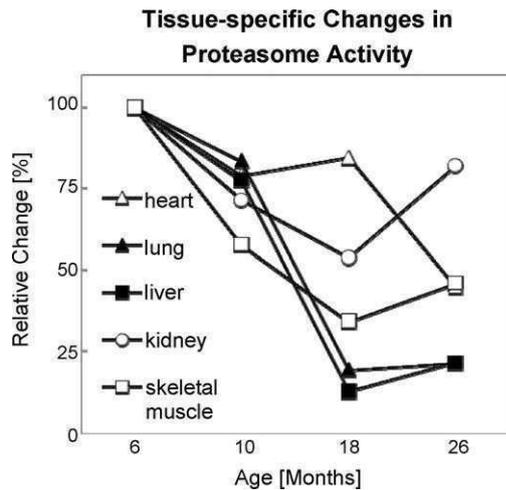


Fig. 4. Tissue-specific changes in proteasome activity with age. The results demonstrate the quantitative evaluation of the means of the different age groups with the mean of the 6 months age group set as 100%.

showing a significant difference between 6- and 18-month-old rats (liver and lung, $P < 0.05$) and 6- and 26-month-old rats (liver, $P < 0.05$), respectively. However, the proteasome activity showed no significant changes in heart, kidney and skeletal muscle samples between the four age groups. Interestingly, liver and lung samples of young rats display a higher basal proteasome activity (5 and 1 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein min) than the other tissue. As shown in Fig. 4, the relative decrease of proteasome activity in liver and lung between young and old rats was about 5-fold, whereas the effects were smaller and inconsistent in kidney, skeletal muscle and heart samples.

Next, we studied the relationship between individual protein oxidation (as indicated by protein carbonyls) and individual proteasome activity in all age groups. A strong correlation between protein carbonyl formation and proteasomal activity was found as shown in Fig. 5A ($R^2 = 0.11$, $P < 0.001$). Sorting the data by the different tissues revealed that the observed significant effect was mainly due to strong correlations found in liver ($R^2 = 0.68$, $P < 0.001$, Fig. 5B) and lung ($R^2 = 0.32$, $P < 0.01$, Fig. 5C), whereas only weak correlations were found in the other tissues (data not shown).

The last analyses were aimed to test if organs age at the same rates. Tissue-specific proteasome activity as well as protein carbonyl formation was correlated in animals of all groups. With

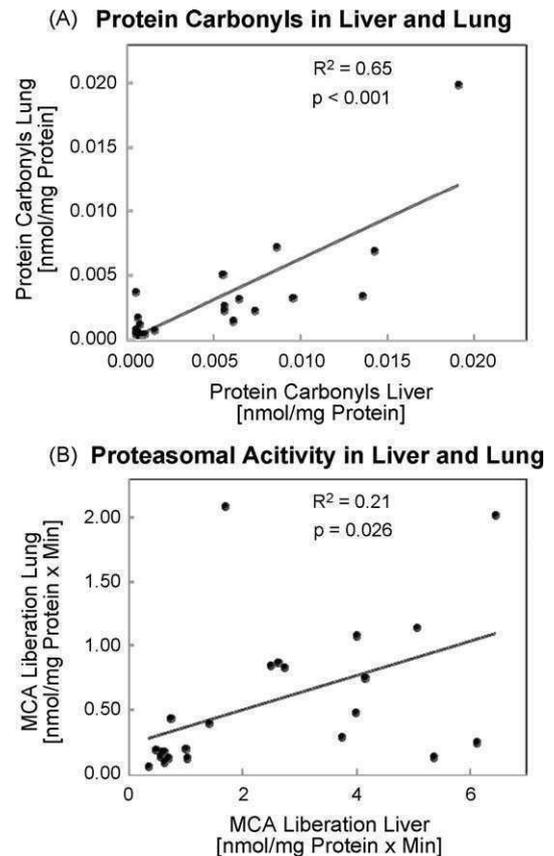


Fig. 6. Correlation between the liver- and lung-specific (A) protein carbonyl formation and (B) proteasome activity in 6-, 10-, 18- and 26-month-old rats. For the correlation analyses, Pearson's correlation coefficients were calculated.

respect to previous results (Fig. 5), the analyses were restricted to liver and lung samples. As shown in Fig. 6A, there is a strong correlation in protein carbonyl formation between liver and lung samples ($R^2 = 0.65$, $P < 0.001$). Similar results were observed for proteasome activity ($R^2 = 0.21$, $P < 0.05$).

4. Discussion

The age-related accumulation of oxidized proteins may result from an increase in protein oxidation or a decline in the degradation of oxidized proteins. Unfortunately, the majority of

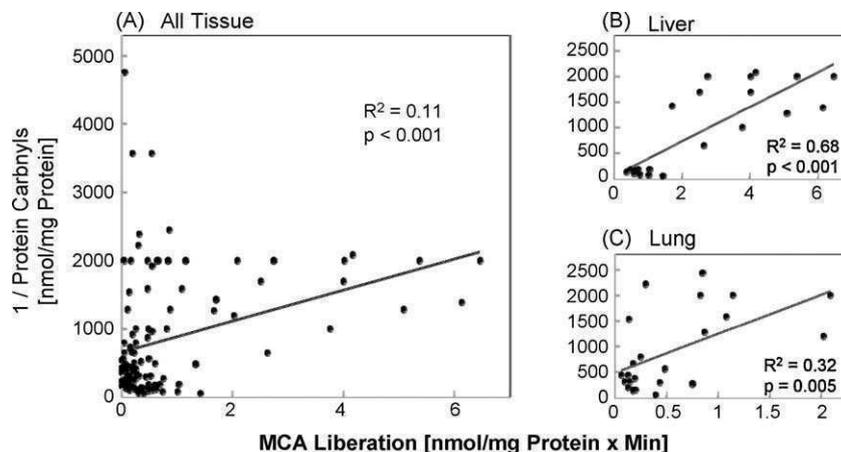


Fig. 5. Correlation between protein oxidation and proteasome activity in 6-, 10-, 18-, and 26-month-old rats in (A) all tissues, (B) liver and (C) lung tissue samples. For the correlation analyses, Pearson's correlation coefficients were calculated.

studies either examined protein oxidation or the activity of protein oxidation degrading systems to study age-related changes. Further, to best of our knowledge there are no studies where in the context of aging different tissues of one animal were studied in parallel regarding these two parameters. To investigate the correlation between protein oxidation and proteasomal degradation, the age-dependent levels of protein carbonyls and the proteasome activity in five tissue samples (heart, lung, liver, kidney and skeletal muscle) of Wistar rats were compared in the present study.

We observed a similar pattern of age-related accumulation of protein carbonyls in all studied tissues (Fig. 1). At an age of 18 months, protein carbonyl concentrations in all but one tissue (heart) were significantly different from the concentrations observed in young rats. 26-month-old rats showed a higher protein carbonyl formation in all studied tissues. The dramatic increase of the steady state levels of oxidized proteins in the second half of the maximal lifespan in different species was already reported (for review, see Levine and Stadtman, 2001). Interestingly, the absolute amount of protein carbonyls was comparable in liver, lung, kidney and heart samples, whereas a lower concentration was observed in skeletal muscle samples. Liver, lung and kidney samples were characterized by the strongest age-dependent increase in protein carbonyls (Fig. 2A).

Our data support the idea that protein carbonyls may serve as a biomarker relevant to aging. Even more, our results have shown that protein carbonyl formation is an early specific marker of aging. The increase in carbonyl formation of the young vs. adult group tended to be higher than the increase in old compared to adult rats. Cakatay et al. (2003) also demonstrated a stronger increase in protein carbonyls in adult vs. young than in old vs. adult skeletal muscle samples.

An age-related increase in protein carbonyl formation might be caused by the preferential oxidation of a single protein. Prior studies have shown that only albumin and alpha1-macroglobulin exhibited an age-associated increase in carbonylation in rats (Jana et al., 2002). Interestingly, a species-dependent specificity of protein carbonylation was found, whereby albumin was the only protein that showed carbonylation in the three studied species mouse, rat and Rhesus monkey (Jana et al., 2002). However, our data strongly support that the higher rate of formation of protein-bound carbonyls in old rats is due to a more random and not an exclusively selective process (Fig. 2B).

The age-related accumulation of protein carbonyls has been demonstrated by many laboratories and fits with the free radical theory of aging or related theories of aging. Reactive oxygen species have been hypothesized to play an important role in the process of aging. As a consequence an enhanced accumulation of defective and/or oxidatively damaged mitochondria might result in an increasing disturbance of cellular metabolism (Kirkwood and Kowald, 1997). It is comprehensible that these changes in cellular homeostasis are able to disturb both pro- and antioxidant processes (Martin et al., 1993) leading to an age-dependent increase in cellular oxidation products. It is widely accepted that aging has a cellular basis inevitable influencing organismic aging. Consequently, the accumulating damage over a lifetime has the potential to result in gradual loss of function explaining the age-dependent increase in disease incidences. Kayali et al. (2007) have demonstrated an increased extent of myocardial protein oxidation as tested by a battery of protein oxidation markers in male compared to female rats. It was hypothesized that the gender factor responsible for the higher protein oxidation in male animals might partly explain the differences in life expectancy in females and males.

It is well known that total rates of protein degradation are reduced as an organism ages (Chondrogianni et al., 2002). An

altered cellular protein handling has been implicated as the source of a large number of human diseases which have an accumulation of protein aggregates in common. The increase in the incidence of organ pathologies seems to be the most obvious consequence of aging. The degradation of the bulk of oxidatively modified proteins is mainly accomplished by the 20S core proteasome (Breusing and Grune, 2008). However, there is evidence from in vitro studies that oxidized proteins, if cross-linked, are themselves able to inhibit the proteasome (Friguet and Szewda, 1997; Sitte et al., 2000a,b,c). Assessing the correlation between both, protein oxidation and proteasomal activity, might help to reveal their relationship. This relationship was assessed in the present study in rats of different ages in the five studied tissues. Importantly, we observed a strong negative correlation between protein oxidation and proteasome activity in liver and lung tissue. We suggest that the relationship between protein oxidation and proteasome activity in rats of different age groups is tissue-specific. However, since the present work was limited to only five tissues, we cannot estimate the relationship in the overall body.

Our findings demonstrate an organ-specific decline in the proteasomal activity. It was already shown that the proteasomal activity was declined in heart, liver, kidney, lung and a few brain regions with age in rats (Bulteau et al., 2002; Keller et al., 2000). Here we could demonstrate significant proteasomal activity declines in liver and lung, whereas the increase in protein carbonyls was more general in all organs. However, the high variability of proteasome activity measurements in some organs and in particular in young animals has to be considered. The design of the study did not allow to differentiate between the intra- and extracellular accumulation of oxidized proteins, the contribution of various cell type composition of the organs to this effect, and the total cell amount per tissue. On the other hand it should be mentioned here that the established inhibitory effect of oxidized proteins towards the proteasome is limited to cross-linked proteins. Here we measured the accumulation of protein carbonyls. Although, it is assumed that a high level of protein carbonylation is leading to a high level of protein aggregates, this is still only an assumption. However, liver and lung were the most affected organs, which might be due to a high stress exposure or a lower adaptation level to stress situations. It seems to us likely that both organs exposed to environmental exposures (air and chemicals) are, therefore, also mostly affected with age.

Finally it should be mentioned, that we were able to show for the first time the long-time postulated age-related inverse correlation between protein oxidation and proteasome activity in vivo in different tissues. But still this is only a correlative observation, not revealing any causal consequences or mechanistic connections. Taken together, the collected data emphasize the need to study individually each tissue, since tissues show unique patterns of age-related changes.

Acknowledgement

The investigations were carried out within the work of European research project COST-B35 Lipid peroxidation-associated disorders and the Landesstiftung BW.

References

- Anselmi, B., Conconi, M., Veyrat-Durebex, C., Turlin, E., Biville, F., Alliot, J., Friguet, B., 1998. Dietary self-selection can compensate an age-related decrease of rat liver 20S proteasome activity observed with standard diet. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 53, B173–B179.
- Arendt, C.S., Hochstrasser, M., 1997. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7156–7161.
- Breusing, N., Grune, T., 2008. Regulation of proteasome-mediated protein degradation during oxidative stress and aging. *Biol. Chem.* 389, 203–209.

- Bulteau, A.L., Petropoulos, I., Friguet, B., 2000. Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis. *Exp. Gerontol.* 35, 767–777.
- Bulteau, A.L., Szweda, L.I., Friguet, B., 2002. Age-dependent declines in proteasome activity in the heart. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 298–304.
- Buss, H., Chan, T.P., Sluis, K.B., Domigan, N.M., Winterbourn, C.C., 1997. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 361–366.
- Cakatay, U., Telci, A., Kayali, R., Tekeli, F., Akçay, T., Sivas, A., 2003. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clin. Biochem.* 36, 51–55.
- Chao, C.C., Ma, Y.S., Stadtman, E.R., 1997. Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2969–2974.
- Chen, P., Hochstrasser, M., 1996. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* 86, 961–972.
- Chondrogianni, N., Gonos, E.S., 2005. Proteasome dysfunction in mammalian aging: steps and factors involved. *Exp. Gerontol.* 40, 931–938.
- Chondrogianni, N., Fragoulis, E.G., Gonos, E.S., 2002. Protein degradation during aging: the lysosome-, the calpain- and the proteasome-dependent cellular proteolytic systems. *Biogerontology* 3, 121–123.
- Conconi, M., Friguet, B., 1997. Proteasome inactivation upon aging and on oxidation—effect of HSP 90. *Mol. Biol. Rep.* 24, 45–50.
- Davies, K.J., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem.* 262, 9895–9901.
- Ferrington, D.A., Husom, A.D., Thompson, L.V., 2005. Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *FASEB J.* 19, 644–646.
- Friguet, B., 2006. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Lett.* 580, 2910–2916.
- Friguet, B., Szweda, L.I., 1997. Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein. *FEBS Lett.* 405, 21–25.
- Gil, L., Siems, W., Mazurek, B., Gross, J., Schroeder, P., Voss, P., Grune, T., 2006. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic. Res.* 40, 495–505.
- Grune, T., Davies, K.J., 2001. Oxidative processes in aging. In: Masoro, E.J., Austad, S.N. (Eds.), *Handbook of the Biology of Aging*. Academic Press, San Diego, pp. 25–58.
- Grune, T., Reinheckel, T., Davies, K.J., 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* 11, 526–534.
- Hagen, T.M., 2003. Oxidative stress, redox imbalance, and the aging process. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 503–506.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., Wolf, D.H., 1997. The active sites of the eukaryotic 20S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* 272, 25200–25209.
- Jana, C.K., Das, N., Sohal, R.S., 2002. Specificity of age-related carbonylation of plasma proteins in the mouse and rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 433–439.
- Judge, S., Jang, Y.M., Smith, A., Hagen, T., Leeuwenburgh, C., 2005. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB J.* 19, 419–421.
- Jung, T., Höhn, A., Catalgol, B., Grune, T., 2009. Age-related differences in oxidative protein-damage in young and senescent fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 483, 127–135.
- Kayali, R., Cakatay, U., Uzun, H., Genç, H., 2007. Gender difference as regards myocardial protein oxidation in aged rats: male rats have increased oxidative protein damage. *Biogerontology* 8, 653–661.
- Keller, J.N., Hanni, K.B., Markesbery, W.R., 2000. Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress. *Mech. Ageing Dev.* 113, 61–70.
- Kirkwood, T.B., Kowald, A., 1997. Network theory of aging. *Exp. Gerontol.* 32, 395–399.
- Kisselev, A.F., Callard, A., Goldberg, A.L., 2006. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J. Biol. Chem.* 281, 8582–8590.
- Kregel, K.C., Zhang, H.J., 2007. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R18–R36.
- Levine, R.L., Stadtman, E.R., 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol.* 36, 1495–1502.
- Martin, G.R., Danner, D.B., Holbrook, N.J., 1993. Aging—causes and defenses. *Annu. Rev. Med.* 44, 419–429.
- Mary, J., Vouquier, S., Picot, C.R., Perichon, M., Petropoulos, I., Friguet, B., 2004. Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized proteins. *Exp. Gerontol.* 39, 1117–1123.
- Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S., Stadtman, E.R., 1987. Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* 262, 5488–5491.
- Richter, C., 1995. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 27, 647–653.
- Safciuc, F., Constantin, A., Manea, A., Nicolae, M., Popov, D., Raicu, M., Alexandru, D., Constantinescu, E., 2007. Advanced glycation end products, oxidative stress and metalloproteinases are altered in the cerebral microvasculature during aging. *Curr. Neurovasc. Res.* 4, 228–234.
- Shibatani, T., Nazir, M., Ward, W.F., 1996. Alteration of rat liver 20S proteasome activities by age and food restriction. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 51, B316–B322.
- Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Grune, T., Davies, K.J., 2000a. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts. Part I—effects of proliferative senescence. *FASEB J.* 14, 2495–2502.
- Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Davies, K.J., Grune, T., 2000b. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts. Part II—aging of nondividing cells. *FASEB J.* 14, 2503–2510.
- Sitte, N., Merker, K., von Zglinicki, T., Grune, T., 2000c. Protein oxidation and degradation during proliferative senescence of human MRC-5 fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 701–708.
- Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A., Markesbery, W.R., 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10540–10543.
- Stadtman, E.R., 1993. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 797–821.
- Stadtman, E.R., 2001. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 928, 22–38.
- Vernace, V.A., Arnaud, L., Schmidt-Glenewinkel, T., Figueiredo-Pereira, M.E., 2007. Aging perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J.* 21, 2672–2682.
- Voss, P., Horakova, M., Jakstadt, M., Kiebusch, D., Grune, T., 2006. Ferritin oxidation and proteasomal degradation: protection by antioxidants. *Free Radic. Res.* 40, 673–683.
- Voss, P., Hajimiragha, H., Engels, M., Ruhwiedel, C., Calles, C., Schroeder, P., Grune, T., 2007. Irradiation of GAPDH: a model for environmentally induced protein damage. *Biol. Chem.* 388, 583–592.

10. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht breite Unterstützung und Hilfe gehabt hätte.

An erster Stelle seien Herrn PD. Dr. Dr. Werner Siems, Institut für Physiotherapie und Gerontologie an KortexMed Bad Harzburg sowie Herrn Prof. Dr. Tilman Grune, Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft, Universität Jena herzlichst gedankt für die Übernahme und Betreuung meiner thematischen Fragestellung. Ein großes Dankeschön für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung gilt Herrn Dr. Nikolaus Bresgen, Institut für Genetik und Allgemeine Biologie der Universität Salzburg. Ferner sei Herrn Prof. Dr. Dr. Andreas Gardemann, Fr. Dr. Ingrid Wiswedel und Mitarbeitern vom Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie im Universitätsklinikum Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg herzlich mein Dank ausgesprochen für die Hilfestellung bei der Auswertung der Daten.

Meinem Bruder und Dr. Ulrich Lemke sei gedankt für die stilistischen und orthografischen Korrekturvorschläge.

Zum Schluss danke ich meiner Familie für die Geduld, Unterstützung und Aufmunterung während der Arbeit.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.