

Aus dem Institut für Klinische Chemie, Pathobiochemie und
Laboratoriumsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zum mTOR-Signalweg in humanen Kontroll-
und Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Juliane Mensch

aus Dresden

Datum der Promotion: 04.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Abstract (Deutsch)	8
Abstract (English)	10
1 Einleitung.....	11
1.1 Kennzeichen des Alterns.....	11
1.2 Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom	13
1.3 mTOR Signalweg.....	15
1.3.1 mTOR-Komplex-1 (mTORC1)	15
1.3.2 mTOR-Komplex-2 (mTORC2)	17
1.3.3 mTOR, Rapamycin und Altern	18
1.4 Molekulare Mechanismen des normalen Alterns und der Progerie in Bezug auf Telomerlänge, Seneszenz, mTOR-Signalweg und Autophagie	18
1.5 Ableitung der Fragestellung.....	20
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Chemikalien, Antikörper, Verbrauchsmaterialien und Geräte	21
2.2 Zellkultur.....	24
2.2.1 Zellcharakteristika	24
2.2.2 Zellkulturbedingungen	25
2.2.3 Anlegen der Zellkultur aus Rückfrierproben	25
2.2.4 Passagieren der Zellkulturen	26
2.2.5 Einfrieren der Zellen.....	26
2.2.6 Immortalisierung der Zellen mit hTERT.....	27
2.3 Western Blot – Analyse zur (semi-)quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	27
2.3.1 H ₂ O ₂ -Versuch und Ernten der Zellen für den Western Blot	28
2.3.2 Zellaufschluss und Bestimmung der Proteinkonzentration für den Western Blot	28
2.3.3 SDS-PAGE	29
2.3.4 Wet Western Blot.....	30
2.3.5 Quantitative und statistische Auswertung.....	32

2.4	Bestimmung von Seneszenzmarkern	32
2.4.1	<i>H₂O₂- Versuch</i>	33
2.4.2	<i>SA-β-Galactosidase-Färbung</i>	34
2.4.3	<i>MUG-Assay</i>	34
2.5	Erstellung der Wachstumskurven	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Zellkultur.....	37
3.2	MUG und SA- β-Gal-Färbung	40
3.3	Western Blot Analyse	43
3.3.1	<i>Gesamt-Akt und phosphoryliertes Akt</i>	43
3.3.2	<i>Gesamt-mTOR und phosphoryliertes mTOR</i>	46
3.3.3	<i>Gesamt-p70 und phosphoryliertes p70</i>	50
3.3.4	<i>Gesamt-ULK1 und phosphoryliertes ULK1</i>	53
3.3.5	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse der Western-Blot-Analyse</i>	57
3.3.6	<i>Western Blot Analyse der Erwachsenen-Kontrollzelllinie</i>	58
4	Diskussion	59
4.1	Diskussion der Methodik	59
4.2	Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten mit gesteigerter Proliferation und verfrühter replikativer Seneszenz	61
4.3	Unterschiedliche Regulation des mTOR-Signalweges zwischen Hutchinson- Gilford-Progerie und gesunden Fibroblasten während des replikativen Alterns	62
4.4	Beeinflusst die Telomerlänge den mTOR-Signalweg?.....	64
4.5	Wasserstoffperoxid hat im Vergleich zum replikativen Altern kaum einen Einfluss auf den mTOR-Signalweg.....	64
4.6	Ist die Alterung von Kinderzellen gleichzusetzen mit der Alterung von Zellen von Erwachsenen?	65
4.7	mTOR-Inhibition und verlängertes Leben?	67
4.8	Zusammenfassung und Ausblick	67
5	Literaturverzeichnis	69
	Eidesstattliche Versicherung	80
	Lebenslauf	81
	Danksagung	82

Abkürzungsverzeichnis

4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
AMPK	AMP-abhängige Kinase
ATG 9/13/101	Autophagy-related protein 9/13/101
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Arbitrary Unit (willkürliche Einheit)
C. elegans	Caenorhabditis elegans (Fadenwurm)
CAAX	Komplex aus Cystein, zwei aliphatischen und einem weiteren Rest
CON	Kontrolle
CRISPR/Cas	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-assoziertes Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPTOR	DEP-domain containing mTOR interactin protein
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
FIP200	Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa
FoxO	Forkhead-Box-Protein O3
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
HGP	Hutchinson-Gilford-Progerie, hier auch nur als Progerie bezeichnet
HIF1 α	Hypoxia inducible factor 1 α
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase
IGF1	Insulin-like growth factor 1
LAP2 α	Lamina-associated polypeptide 2 α
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MW	Mittelwert
mLST8	Mammalian lethal with Sec13 protein 8
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mSIN1	Mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
mTORC1	mTOR-Komplex 1
mTORC2	mTOR-Komplex 2
p70	p70S6 Kinase 1 / p70S6K

PD	Population Doubling
PDK1	3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor g
PRAS40	Proline rich Akt substrate 40kDa
Protor1/2	Protein observed with rictor 1 and 2
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Raptor	Regulatory protein associated with mTOR
Ras	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastom-Protein
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RPS6	Ribosomal protein S6
SA- β -Galaktosidase	Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase
SD	Standardabweichung
SREBP1	Sterol regulatory element-binding protein 1
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
ULK1	Unc-51-like kinase 1
VPS34	Vacuolar protein sorting 34
ZMPSTE24	Zink-Metalloprotease 24

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Hallmarks of Aging nach López-Otin et al. 2013.....	12
Abb. 2: Stark vereinfachte Darstellung des mTOR-Signalweges.....	17
Abb. 3: Arbeitsschema Zellkultur.....	26
Abb. 4 Wachstumskurven der primären Zelllinien und deren erste Ableitung.	37
Abb. 5: Wachstumskurven der immortalisierten Zelllinien und deren erste Ableitung.	39
Abb. 6: SA- β -Gal-Färbung der Kontrollzellen (grün) und der Progerie-Zellen (blau).	40
Abb. 7: MUG-Assay der Kontrollzellen (grün) und der Progerie-Zellen (blau).	42
Abb. 8: Western-Blot-Analyse der relativen Gesamt-Akt-Mengen in Kontroll- und Progerie- Fibroblasten.	44
Abb. 9: Western-Blot-Analyse der relativen Phospho-Akt-Mengen in Kontroll- und Progerie- Fibroblasten.	46
Abb. 10: Western-Blot-Analyse der relativen Gesamt-mTOR-Mengen in Kontroll- und Progerie- Fibroblasten.	47
Abb. 11: Western-Blot-Analyse der relativen Phospho-mTOR-Mengen in Kontroll- und Progerie-Fibroblasten.	49
Abb. 12: Western-Blot-Analyse der relativen Gesamt-p70-Mengen in Kontroll- und Progerie- Fibroblasten.	50
Abb. 13: Western-Blot-Analyse der relativen Phospho-p70-Mengen in Kontroll- und Progerie- Fibroblasten.	52
Abb. 14: Western-Blot-Analyse der relativen Gesamt-ULK1-Mengen in Kontroll- und Progerie- Fibroblasten.	54
Abb. 15: Western-Blot-Analyse der relativen Phospho-ULK1-Mengen in Kontroll- und Progerie- Fibroblasten.	56
Abb. 16: Western-Blot-Analyse der Erwachsenen-Kontrollzelllinie 168.	58
Abb. 17: Regelung des mTOR-Signalweges in replikativ gealterten Kontroll- und Progerie-Zellen.	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Chemikalien	21
Tabelle 2: Antikörper	22
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 4: Geräte	24
Tabelle 5: Zellcharakteristika der Kontrollzellen	24
Tabelle 6: Zellcharakteristika der Hutchinson-Gilford-Progerie-Zellen	25
Tabelle 7: Zelllinien und verwendete PDs für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen	27
Tabelle 8: Antikörper und deren Verdünnungen	30
Tabelle 9: Zelllinien und verwendete PDs für die Bestimmung von Seneszenzmarkern	33

Abstract (Deutsch)

Untersuchungen zum mTOR-Signalweg in humanen Kontroll- und Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten

Altern ist ein Prozess, der sich durch einen Verlust der Funktionen des Körpers, der Organe und der Zellen mit zunehmender Lebenszeit äußert und früher oder später zum Tod der meisten lebenden Organismen führt. Beschleunigt wird das Altern durch verschiedene Faktoren, wie oxidativer Stress, energiereiche Strahlung, Lebensgewohnheiten oder genetische Defekte. Zu den genetischen Erkrankungen gehört die Hutchinson-Gilford-Progerie (HGP), eine monogenetische Erkrankung, die sich durch verfrüht einsetzende und beschleunigte Alterung auszeichnet. Als möglicher therapeutischer Ansatz sowohl bei der Progerie als auch beim normalen Alternsprozess wird das mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) und dessen Signalweg untersucht. Der mTOR-Signalweg ist in die Regulation von wichtigen Stoffwechselprozessen und die Regulation von Zellwachstum involviert. Dabei ist dessen Rolle bei Alterungsprozessen und bei der Pathogenese der Progerie nur unzureichend geklärt.

Der mTOR-Signalweg wurde auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse semi-quantitativ analysiert. Dazu wurden das up-stream-Protein Akt, mTOR selbst und die down-stream-Proteine p70S6K und ULK1 betrachtet. Als zelluläres Modell wurden Kontroll- und HGP-Fibroblastenkulturen so lange vermehrt, bis sie durch zunehmende Telomerverkürzung das Stadium der replikativen Seneszenz erreichten. Der Einfluss der Telomerlänge wurde durch den Vergleich von Zellen mit kurzen und langen Telomeren (nach Immortalisierung mit humaner Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT)) untersucht. Wasserstoffperoxid diente als nicht-replikativer Stressor.

Es wurde gezeigt, dass bei HGP-Fibroblasten eine um ca. 53% ($\pm 35\%$) beschleunigte Proliferationsrate vorlag sowie ein frühzeitiger Wachstumsstopp (im Mittel 226 Tage eher) bei gleichzeitig erhöhtem Anteil an seneszenten Zellen (HGP 73 $\pm 18\%$ vs. CON 40 $\pm 3\%$) zu verzeichnen war.

Während in gesunden, replikativ gealterten Zellen mit geringerer Proliferation die genannten Schlüsselproteine des mTOR-Signalweges um mindestens 50% supprimiert waren, konnte in gealterten Progerie-Zellen mit Ausnahme von p70S6K eine verstärkte Proteinexpression des mTOR-Signalweges gezeigt werden. Die Immortalisierung mit hTERT, verbunden mit einer Telomerverlängerung, wirkte den Effekten des replikativen Alterns sowohl in Kontrollzellen als auch in den Progerie-Zellen in unterschiedlichem Ausmaß entgegen.

Wasserstoffperoxid hatte keinen signifikanten Effekt auf den mTOR-Signalweg und konnte die Effekte des replikativen Alterns nicht imitieren. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse bei Progerie-Zellen, dass eine verstärkte Proliferation mit einer veränderten Aktivierung des mTOR-Signalweges als ein möglicher Pathomechanismus der verstärkten Alterungsprozesse diskutiert werden kann.

Abstract (English)

Investigations on the mTOR Signaling Pathway in Human Control and Hutchinson-Gilford-Progeria-Fibroblasts

Aging is a process in almost all living organisms, which is defined by an increased loss of function over time on different levels and is finally leading to death. Aging is accelerated by various factors such as oxidative stress, high-energy radiation, lifestyle and genetic defects. Hutchinson-Gilford-Progeria (HGP) is a monogenetic disease which is characterized by premature and accelerated aging and represents an important model because many aspects are also observed in normal aging. One therapeutical target of normal aging and HGP is the mechanistic target of rapamycin (mTOR) and its signaling pathway. It regulates important metabolic processes and is involved in cell growth and metabolism. Its specific role in aging and in the pathogenesis of HGP is only partially known.

Here, the mTOR signaling pathway was investigated by using semi-quantitative Western-blot-analysis of up-stream-protein Akt, mTOR, and down-stream proteins p70S6K and ULK1. Control- and HGP-fibroblasts were grown until they reached replicative senescence through progressive shortening of telomeres. The effects of telomere length were examined by comparing cells with short telomeres and cells with long telomeres after immortalization with human telomerase reverse transcriptase (hTERT). Hydrogen peroxide served as a non-replicative stressor.

HGP-fibroblasts revealed an increased proliferation rate by 53% ($\pm 35\%$) and a premature entry into arrest (on average 226 days earlier) with a higher percentage of senescent cells (HGP 73 $\pm 18\%$ vs. CON 40 $\pm 3\%$).

Healthy, replicatively aged cells exhibit lower proliferation rates, while key proteins of the mTOR signaling pathway were suppressed by at least 50%. HGP cells showed an impaired reduction of the mTOR pathway except for p70S6K. Immortalization, accompanied by telomere elongation, counteracted the effects of aging in both groups to varying extents. Treatment with hydrogen peroxide showed no significant effects on the mTOR pathway and could not imitate replicative aging.

The results suggest that increased proliferation rates and impaired mTOR-signaling could be a pathogenetic mechanism of accelerated aging in progeria.

1 Einleitung

1.1 Kennzeichen des Alterns

Altern ist ein Prozess in den meisten lebenden Organismen, der sich durch einen Verlust der Funktionen des Körpers, der Organe und der Zellen mit zunehmender Lebenszeit äußert und früher oder später zum Tod des Organismus führt. Bei Menschen ist das Alter einer der Hauptrisikofaktoren für eine Vielzahl an Pathologien. Darunter unter anderem Diabetes mellitus, kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen sowie eine Vielzahl an Tumoren [1]. Diverse Faktoren können das Altern beschleunigen, von denen viele von Lebensgewohnheiten abhängen, wie Rauchen, ungesunde Ernährung, exzessive Exposition gegenüber energiereicher Strahlung oder Stress [2–5]. Auch genetische und epigenetische Faktoren haben einen Einfluss auf das Altern [6,7].

Im Jahr 2013 wurden von López-Otin et al. die Hallmarks of Aging definiert [1]. Diese bestehen aus 9 Punkten, die bei allen Säugetieren zu beobachten sind. An dieser Stelle soll eine kurze Zusammenfassung dieser Kennzeichen folgen:

Mit steigendem Alter wird eine zunehmende Instabilität des Genoms festgestellt. Darunter fallen neben Mutationen der nukleären DNA auch die der mitochondrialen DNA und eine zunehmende Veränderung der nukleären Architektur [8–12].

Darüber hinaus verändern sich Strukturkomponenten der DNA wie die endständigen Telomere. Telomere bestehen aus sich wiederholenden 5'-TTAGGG-3'-Sequenzen und befinden sich an den Enden der Chromosomen [13]. Sie bilden die Schutzkappen der DNA. Bei jeder Zellteilung kommt es zu einer Verkürzung der Telomere, da die DNA-Polymerase die DNA am Folgestrang nur diskontinuierlich replizieren kann. Damit sind die Telomerrepeats ein Schutz der Chromosomenenden, da der Verlust nicht-codierender DNA bei einer Teilung ohne Konsequenzen für die Zelle bleibt. Um einen Verlust an codierender DNA durch zu häufige Teilung zu verhindern, kann ein Zellzyklus-Arrest von der Zelle angestrebt werden [14,15]. Der durch die Telomerverkürzung ausgelöste Stopp der Proliferation wird als replikative Seneszenz oder auch Hayflick-Grenze bezeichnet [16,17].

Allgemein bildet die zunehmende Anzahl seneszenten Zellen ein deutliches Merkmal des Alterns. Seneszenz ist definiert als stabiler Zellzyklus-Arrest und geht mit typischen Änderungen des Zell-Phänotyps einher. Die Fibroblasten stellen sich dabei flacher und vergrößert dar, weisen vermehrt Vakuolen auf und es können auch mehrere oder vergrößerte Nuklei beobachtet werden [18]. Seneszenz soll die Vermehrung geschädigter Zellen verhindern. Verschiedene zelluläre

Mechanismen führen zur Seneszenz: zum einen die zunehmende Verkürzung der Telomere, was als replikative Seneszenz bezeichnet wird, zum anderen Telomer-unabhängige Mechanismen wie oxidativer oder genotoxischer Stress, Strahlung, mitochondriale Dysfunktion, Chemotherapeutika oder auch Aktivierung von onkogenen bzw. Verlust von Tumor-Suppressor-Mechanismen [19,20].

Weiterhin gelten epigenetische Veränderungen wie veränderte Histon-Modifizierungen, DNA-Methylierungen oder Remodelling des Chromatins als Ursache des Alterns. Alle Modifikationen können zu einer veränderten Proteinexpression in den Zellen [21–23].

Im Verlauf des Alterns kommt es also zu einem Ungleichgewicht im Proteinhaushalt der Zellen [24]. Die Effizienz der beiden wichtigsten proteolytischen Prozesse, Autophagie und Ubiquitinylierung, nehmen mit zunehmendem Alter ab und es kommt zur Akkumulation von Proteinen in den Zellen [25–27].

Da im Alter verschiedene Stoffwechselwege eine gegenüber jüngeren Organismen eingeschränkte Leistungsfähigkeit haben (z.B. Zunahme der Insulinresistenz und gestörte Glukosetoleranz), werden auch für diese Prozesse Einflüsse auf das Altern diskutiert. So soll eine moderate Kalorienreduktion die Lebenserwartung erhöhen. Dabei werden vor allem Signalwege in der Zelle herunterreguliert, die zu einer vermehrten Proliferation führen. Darunter ist der Insulin/IGF-1-Signalweg, der mTOR-Signalweg und der AMPK-Signalweg [28–31].

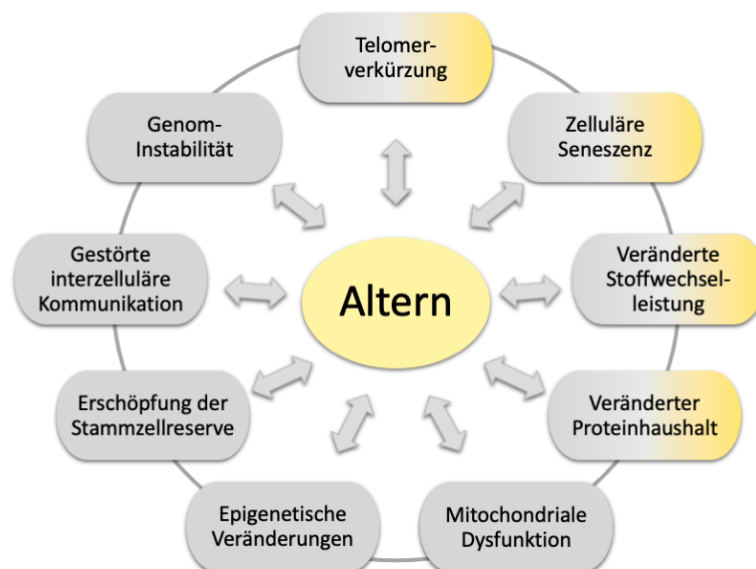


Abb. 1: Hallmarks of Aging nach López-Otin et al. 2013 [1].

Das Schema stellt die wichtigsten Merkmale des Alterns dar. Dabei beeinflusst jeder einzelne Aspekt die anderen. Orange hervorgehoben sind die Merkmale, auf die in dieser Arbeit eingegangen wird.

Als nächstes Merkmal des Alterns gilt die mitochondriale Dysfunktion. Die Effizienz der Atmungskette scheint nachzulassen mit der Folge einer zunehmenden Elektronen-Leckage und ineffizienter ATP-Generierung [32–35].

Neben der zuvor genannten Akkumulation seneszenten Zellen ist auch die erschöpfte Neubildung aus Stammzellen ein Merkmal des Alterns [36,37].

Letztendlich ist die interzelluläre Kommunikation zwischen den Zellen gestört mit der Folge, dass inflammatorische Prozesse zunehmen, Pathogene oder prä-maligne Zellen schlechter abgewehrt werden können und veränderte extrazelluläre Bedingungen die mechanischen und funktionellen Aufgaben der Gewebe einschränken [38–41].

Die beschriebenen Aspekte sind in gealterten Organismen gleichzeitig zu finden, bedingen sich dabei gegenseitig und sind Bestandteil aktueller Forschung [1,42].

1.2 Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom

Das Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom (im Folgenden HGP oder Progerie) ist eine extrem seltene Erkrankung, deren Hauptmerkmal in der vorzeitigen Alterung der Patienten liegt. Die Krankheit wurde zuerst 1886 von Jonathan Hutchinson und 12 Jahre später von Hastings Gilford beschrieben [43,44]. Bei einem normalen Geburtsgewicht und einer unauffällig postnatalen Phase zeigt sich innerhalb der ersten Lebensjahre eine Wachstumsretardierung, sowie der Verlust des subkutanen Fettgewebes einhergehend mit zu niedrigem Körpergewicht. Charakteristische Eigenschaften des Kopfes sind Mikrognathie, eine schmale Nasenbrücke, eine spitze Nase sowie eine zunehmende Alopezie. Weiterhin zeigen sich Gelenkkontrakturen, Knochen- und Nageldysplasien und ein verspäteter Durchbruch der Milchzähne. Spätere Symptome sind Verlust des Hörvermögens, Lagophthalmus, Zahnfehlstellungen, das Raynaud-Syndrom, sowie eine gesteigerte Insulinresistenz ohne Zeichen für einen Diabetes mellitus. Kardiovaskuläre Veränderungen wie Arteriosklerose, Klappenfehler und Herzinsuffizienz, sowie Myokardinfarkte und Schlaganfälle machen sich ab einem Alter von ca. 8 Jahren bemerkbar [45,46] und stellen im Verlauf der Erkrankung die häufigste Todesursache dar. Die durchschnittliche Lebenserwartung liegt bei 13 Jahren [47].

Von der Krankheit nicht betroffen sind im Allgemeinen die intellektuelle und die motorische Entwicklung der Kinder. Das Immunsystem und die Wundheilung sind intakt. Leber, Niere und der Gastrointestinaltrakt sind ebenfalls nicht betroffen. Demenz, Arthrose und Tumore wurden nicht beobachtet. Die Hutchinson-Gilford-Progerie zeigt damit viele Merkmale, die bei gesunden Menschen im Rahmen des natürlichen Alterns vorkommen: Alopezie, Gelenkkontrakturen, eine verringerte Knochendichte, Verlust des subkutanen Fettgewebes sowie Arteriosklerose. Vom

normalen Altern unabhängige Merkmale der Erkrankung sind Wachstumsstörungen, fehlende Ausprägung sekundärer Geschlechtsmerkmale bzw. fehlende pubertäre Entwicklung. [46].

Auf molekularer Ebene findet sich bei der Hutchinsin-Gilford-Progerie eine Mutation im *LMNA*-Gen auf dem Chromosom 1. Dieses codiert für Lamin A und Lamin C, zwei nukleäre Strukturproteine, die durch unterschiedliches Splicen aus dem gleichen Gen hervorgehen. Lamin A spielt dabei eine besondere Rolle als Bestandteil der Kernlamina, einem Proteinnetzwerk, das der inneren Kernmembran anliegt. Zusätzlich kann es aber auch im gesamten Nukleoplasma nachgewiesen werden [10,48,49]. Lamin A ist am Erhalt der Kernstruktur, sowie der Organisation des Chromatins, der DNA-Replikation und der Gen-Expression beteiligt [42,50]. Es entsteht über posttranslationale Modifikationen aus Prälamina A. Prälamina A besteht aus einem Komplex aus Cystein, zwei aliphatischen und einem weiteren Rest (CAAX). Während der posttranslationalen Modifikation wird zunächst das Cystein farnesyliert, dann wird der AAX-Rest proteolytisch abgespalten. Als nächstes kommt es zu einer Methylierung des bereits farnesylierten Cysteins. Zuletzt werden 15 Aminosäuren des Prälamina A abgespalten, darunter auch das farnesylierte Cystein. Für beide proteolytischen Prozesse ist die Zinkmetalloprotease ZMPSTE24 verantwortlich [42,51,52].

Die häufigste Ursache der Hutchinson-Gilford-Progerie ist eine de-novo-Punktmutation an der Stelle c.1824C>T im *LMNA*-Gen. Diese stille Mutation aktiviert eine kryptische Splice Stelle, welche letztendlich zu einem am C-Terminus um 50 Aminosäuren verkürzten Prälamina A führt, dem sogenannten Progerin [12]. Diesem fehlt die Bindungsstelle für ZMPSTE24 und bleibt demnach permanent farnesyliert. Das Progerin bildet so eine stabile Verbindung mit der inneren Membran des Zellkerns und kann nicht richtig in die Kernlamina integriert werden [42,49,53]. Daraus ergeben sich morphologische und funktionelle Besonderheiten bei der Hutchinson-Gilford-Progerie, wie der lobulierte Zellkern mit verdickter Lamina, ein Verlust des peripheren Heterochromatins, vermehrte Schäden an der DNA sowie Telomeraberrationen und mitochondriale Dysfunktion, was in einem Anstieg zellulärer Seneszenz resultiert [54–57]

Eine kausale Therapie ist bis jetzt nicht bekannt. Aktuelle Therapiestrategien streben eine Verzögerung des Krankheitsverlaufes durch drei Hauptmechanismen an: Verhinderung der posttranslationalen Modifikation des Progerin, Reduktion der Progerin-Expression und Verbesserung schädigender Down-stream-Effekte des Progerin. In einer Studie mit Lonafarnib, einem Farnesyltransferase-Inhibitor, zeigte die Interventionsgruppe nach 2,2 Jahren eine niedrigere Mortalität als die Kontrollgruppe ohne Medikation [58]. Bei Everolimus und Rapamycin, die zu einer verstärkten Progerin-Clearance führen, zeigte sich in Zellmodellen ein deutlich

verbesserter Phänotyp. All-Trans-Retinsäure, Sulforaphan und Calcitriol konnten reduzierte Progerin-Level in präklinischen Studien ausweisen [59–62]. Als Krankheit auf Basis einer Punktmutation ist die Hutchinson-Gilford-Progerie ein idealer Kandidat für Gentherapie, wie eine Behandlung mit der Genschere CRISPR/Cas9 [63,64].

1.3 mTOR Signalweg

Als Signalweg innerhalb der Zellen, der immer wieder im Zusammenhang mit Altern erwähnt wird, soll der mTOR-Signalweg in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehen. mTOR steht für mechanistic target of rapamycin und ist eine Serin/Threonin-Protease, die in viele Prozesse innerhalb der Zelle integriert ist. Die zentrale Rolle der Protease liegt dabei in der Koordination von Metabolismus und Zellwachstum in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen wie Nährstoffangebot und Wachstumsfaktoren. mTOR liegt in der Zelle in zwei Komplexen vor: mTOR-Komplex 1 (mTORC1) und mTOR-Komplex 2 (mTORC2), die sich in Zusammensetzung und Funktion unterscheiden [28,31].

1.3.1 mTOR-Komplex-1 (mTORC1)

mTORC1 besteht neben mTOR selbst aus Raptor (regulatory protein associated with mTOR) und mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8)[65–67], sowie den inhibitorischen Domänen PRAS40 (proline rich Akt substrate 40kDa) und DEPTOR (DEP-domain containing mTOR interactin protein) [68,69]. Raptor verstärkt die Kinase-Aktivität von mTOR und ist für die subzelluläre Verortung des Proteinkomplexes in der Zelle verantwortlich [66], mLST8 stabilisiert die Verbindung zwischen Raptor und mTOR [67]. DEPTOR und PRAS40 inhibieren die Aktivierung verschiedener Downstream-Proteine des mTOR [68,69]. Lokalisiert ist der mTORC1 hauptsächlich im Zytoplasma bzw. an den Lysosomen, aber auch in Mitochondrien, Stress-Granula oder der Plasmamembran [70].

Die Aktivierung des mTORC1 erfolgt bei ausreichendem Angebot von Nährstoffen (Aminosäuren, Glukose, Lipiden) und Energie (Sauerstoff und ATP). Über Wachstumsfaktoren werden unter anderem der PI3K/Akt-Signalweg [71,72], der Ras/Raf/MAPK-Signalweg [73,74], sowie der TNF α -Signalweg aktiviert, was im Weiteren zu einer Inhibition des Tuberous Sclerosis Complex1 (TSC1)/TSC2-Komplexes führt [75]. Der TSC-Komplex unterdrückt die Aktivität des G-Proteins Rheb. Eine Inhibierung des TSC-Komplexes führt damit zu einer Aktivierung des Rheb. Rheb kann daraufhin den mTORC1 aktivieren [69,76].

Die Downstream-Proteine des mTORC1 haben drei Hauptaufgaben: Regulation der Proteinbiosynthese, des Zell-Metabolismus und des Proteinumsatzes.

Für die Regulation der Proteinbiosynthese phosphoryliert der mTORC1 die p70S6 Kinase 1 (p70S6K, fortan p70) an der Stelle T389, sodass es anschließend von PDK1 weiter phosphoryliert und damit aktiviert werden kann. Das aktivierte p70 phosphoryliert das ribosomale Protein S6 (RPS6), sodass es zur Translation von mRNA kommt, die für die Ribosom-Biogenese verantwortlich sind. mTORC1 phosphoryliert außerdem 4EBP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1), sodass dieses vom eIF4E dissoziiert und es letztendlich zu einer 5'-Cap-abhängigen mRNA-Translation kommt. Beide zusammen sind am Zellwachstum beteiligt.

Verschiedene Transkriptionsfaktoren werden über den mTORC1 aktiviert. Dazu zählen HIF1 α (hypoxia inducible factor 1 α) als Regulator verschiedener Gene der Glykolyse, SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein 1) und PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) als Transkriptionsfaktor von Genen der Lipidsynthese und Adipogenese. Weiterhin wird die Synthese von Nukleotiden, die für die Replikation der DNA gebraucht werden, gefördert. Über die Aktivierung des mTORC1 wird damit Bereitstellung von Energie und Grundbausteinen als Voraussetzung für die Entstehung neuer Zellen gesichert.

Neben den anabolischen Prozessen reguliert der mTORC1 das Zellwachstum auch über den Proteinabbau. Der Abbau von Proteinen in den Zellen wird benötigt, um geschädigte Proteine bis hin zu Zellorganellen zu eliminieren, Energie unter katabolischen Bedingungen zu generieren und so die funktionale Integrität der Zellen zu gewährleisten. Die einzelnen Bestandteile können dann wieder zum Aufbau neuer Proteine genutzt werden. Die beiden Hauptwege zum Abbau von Proteinen sind zum einen der gezielte Abbau fehlgefalteter Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System und die unter anderem durch mTORC1 gesteuerte Autophagie für den allgemeinen Abbau zelleigener Bestandteile bis hin zu ganzen Zellorganellen [77,78].

Die Autophagie ist ein komplexer Prozess und noch nicht komplett verstanden. An dieser Stelle soll nur ein kurzer Überblick gegeben werden: Ein Komplex aus ULK1 (unc-51-like kinase 1), ATG (autophagy-related protein) 13 (ATG13), FIP200 (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa), und ATG101 initiiert die Autophagie, indem es als weiteren Proteinkomplex VPS34 (vacuolar protein sorting 34) aktiviert und ATG9 rekrutiert. Das führt zur Bildung eines Phagophors (Lipiddoppelschicht), welches sich um die abzubauenen Proteine hüllt und so das Autophagosom bildet. Dieses fusioniert dann mit den Lysosomen und es kommt zu Abbau der enthaltenen Bestandteile [26,79]. Der mTORC1 kontrolliert die Autophagie, indem es ULK1 unter katabolischen Bedingungen phosphoryliert und damit inaktiviert [26,28,79,80].

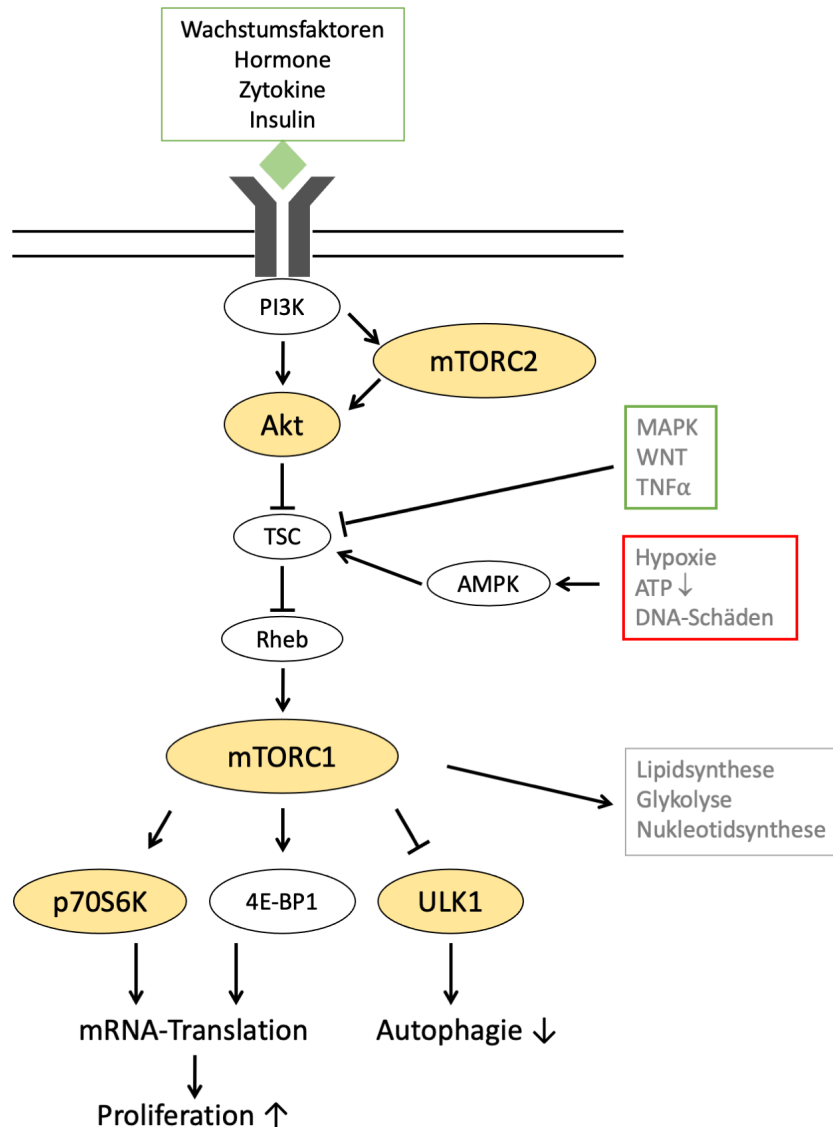


Abb. 2: Stark vereinfachte Darstellung des mTOR-Signalweges.

Orange hervorgehoben sind die Proteine, auf die in dieser Arbeit eingegangen wird. grün: aktivierende Einflüsse, rot: inhibierende Einflüsse. Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine und Insulin führen zu einer Aktivierung des PI3K/Akt-Weges. Das aktivierte Akt, sowie weitere Effektoren der MAPK-, WNT-, TNF α -Signalwege inaktivieren TSC, sodass dessen hemmende Wirkung auf Rheb wegfällt. Rheb aktiviert den mTORC1. mTORC1 aktiviert p70S6K und inaktiviert 4E-BP1 durch Phosphorylierung. Dies führt zur Translation von mRNA. mTORC1 inaktiviert außerdem ULK1 durch Dephosphorylierung und verhindert damit die Autophagie. Ferner werden die Lipidsynthese, Glykolyse und Nukleotidsynthese begünstigt. mTORC2 wird über PI3K aktiviert und phosphoryliert Akt.

1.3.2 mTOR-Komplex-2 (mTORC2)

Der mTORC2 ist im Gegensatz zum mTORC1 weit weniger erforscht. mTORC2 enthält neben mTOR ebenfalls mLST8 und DEPTOR [68], sowie Rictor (Rapamycin insensitive companion of mTOR) [81,82], und die regulatorischen Untereinheiten mSIN1 [83,84] und Protor1/2 [85,86]. Lokalisiert ist der mTORC2 an Mitochondrien-assoziierten Membranen des Endoplasmatischen

Retikulums, sowie der Plasmamembran und im Nukleoplasma [70]. Er gilt als Effektor des Insulin/PI3K-Signalweges und phosphoryliert und aktiviert damit Akt (auch Proteinkinase B) [87]. Das aktivierte Akt vermittelt Überleben, Proliferation und Wachstum über verschiedene Signalwege wie FoxO, GSK3 und über Aktivierung des mTORC1 [81,88]. Als weitere Substrate des mTORC2 gelten verschiedene Isoformen der PKC (Proteinkinase C), die an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt sind [28,82]. Aktiviert wird der mTORC2 über mSIN1. Dieses enthält eine Domäne, die die katalytische Funktion des Komplexes in Abwesenheit von Insulin unterdrückt. Die Bindung von Insulin aktiviert PI3K, welches PIP₃ rekrutiert, das dann an mSIN1 bindet, sodass die Hemmung des mTORC2 wegfällt und dieser dann Akt phosphorylieren kann [89]. Akt phosphoryliert und inaktiviert mSIN1 in einem positiven Feedback-Loop, was zur Vollständigen Aktivierung von Akt führt [90].

1.3.3 mTOR, Rapamycin und Altern

Rapamycin, als mTOR-Inhibitor, wurde zunächst als Antimykotikum beschrieben und zur Wachstumshemmung von Hefen eingesetzt, während daraufhin auch immunsuppressive und tumor-supprimierende Eigenschaften beobachtet wurden [28,91,92].

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass Rapamycin bei *C. elegans* [93,94] und *Drosophila* [95], Hefen [96] und Mäusen [28,97] zu einem verlängerten Überleben führt. Weitere Hinweise auf eine Beteiligung des mTORs am Altern lieferten Versuche, in denen die Versuchstiere unter Kalorienrestriktion beobachtet und analysiert wurden. Auch dies führte zu einer verlängerten Lebensspanne der Organismen, was durch die Rolle des mTORs am Erfassen des Nährstoffangebots und des Insulins erklärt wird [28,95,96].

Eine generelle Reduktion der mRNA-Translation während der mTOR-Inhibierung wird als lebensverlängernd diskutiert. Ursächlich dabei sind der verringerte proteotoxische und oxidative Stress. Zusätzlich soll sich eine Steigerung der Autophagie-Aktivität positiv auf das Altern und altern-assozierte Erkrankungen auswirken [28].

1.4 Molekulare Mechanismen des normalen Alterns und der Progerie in Bezug auf Telomerlänge, Seneszenz, mTOR-Signalweg und Autophagie

Aufgrund der vielen Ähnlichkeiten zum normalen Altern dient die Hutchinson-Gilford-Progerie als Modellerkrankung für das Altern und wird in der Forschung häufig eingesetzt, um Erscheinungen des Alterns genauer zu betrachten. Dementsprechend gibt es viele Arbeiten, die

sich mit den Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen der Progerie und dem normalen Altern beschäftigen.

Progerin, als direktes Resultat der *LMNA*-Mutation, konnte auch in gesunden Fibroblasten nachgewiesen werden. Die Anzahl Progerin-positiver Zellen hing dabei stark vom Alter der Person ab, die untersucht wurde: je älter die Person war, desto mehr Fibroblasten mit Progerin konnten nachgewiesen werden. Dies steht im Zusammenhang mit einer steigenden Anzahl an seneszenten Zellen im Alter, in denen Progerin nachgewiesen werden konnte [11,98]. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen vermehrter Progerin-Expression und Zellen mit kürzeren Telomeren gezeigt werden. So führt eine durch Progerin induzierte DNA Damage Response mittels p53 und Rb zu Telomeraggregaten und Chromosomenabberationen. Dieser Effekt konnte durch Telomerase, einem Enzym, das die Telomere verlängert, wieder aufgehoben werden [99]. Unterstützt wird diese Beobachtung durch Experimente, bei denen die HGP-Fibroblasten im Durchschnitt kürzere Telomere haben als normale Fibroblasten [100]. Umgekehrt konnte bei Schäden an den Telomeren eine vermehrte Expression von Progerin gezeigt werden [11].

Progerin wird somit für verschiedene Pathologien sowohl bei HGP als auch beim normalen Altern verantwortlich gemacht, sodass eine Elimination dieses Proteins als Ansatzpunkt für Therapien dient. Der Einsatz von Rapamycin, einem mTOR-Inhibitor, konnte eine vermehrte Clearance von Progerin in der Zellkultur bewirken [101] und bestärkt einen Zusammenhang zwischen dem mTOR-Signalweg, der Progerie und dem natürlichen Altern.

Mittels einer bioinformatischen Analyse konnte gezeigt werden, dass gleiche Signalwege beim natürlichen Altern und der Progerie hoch- (mTOR, GSK3, TGF- β , ERK u.m.) bzw. herunterreguliert (Mismatch repair, DNA Damage Response, durch Mitochondrien vermittelte Apoptose) sind [29]. Auch mehrere experimentelle Studien deuten darauf hin, dass der mTOR-Signalweg in normalen alten Fibroblasten und in HGP-Fibroblasten hochreguliert sei [53,102,103]. Die Rolle der Autophagie bei Progerie und beim natürlichen Altern ist noch nicht abschließend geklärt. Dabei zeigen unterschiedliche Studien gegensätzliche Ergebnisse [53,103]. Die Aussagen zur Autophagie beruhen überwiegend auf indirekten Beobachtungen bei Experimenten mit pharmakologischer Herangehensweise oder Beeinflussung des mTOR-Signalweges an anderer Stelle [28,103,104].

1.5 Ableitung der Fragestellung

Viele Aspekte des natürlichen Alterns und der Hutchinson-Gilford-Progerie sind noch nicht vollständig verstanden. In der Literatur weichen die Ergebnisse zum Teil sehr weit voneinander ab. Es stellten sich folgende Fragen:

- 1) Gibt es Unterschiede in Proliferation und Regulation des mTOR-Signalweges während des replikativen Alterns zwischen Kontrollzellen und Progerie-Zellen?
- 2) Falls Unterschiede bestehen: Welche Rolle spielen replikative (durch Telomerverkürzung verursachte) Prozesse? Welchen Einfluss haben äußere Stressoren, wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid?

Dabei ist es nahezu unmöglich, alle Aspekte des Alterns gleichzeitig zu betrachten. Ziel dieser Arbeit ist es, einen systematischen Überblick über die Regulation des mTOR-Signalweges auf Proteinebene während des replikativen Alterns von Fibroblasten gesunder und an Progerie erkrankter Kinder zu erhalten.

Dazu wurden Kontroll- und Progerie-Zellen so lange in Kultur gebracht, bis das Wachstum der Kultur sistierte. Verglichen wurden jeweils Zellen in niedriger Passage und Zellen in hoher Passage, um die mit Zellteilungen verbundene progrediente Verkürzung der Telomere zu untersuchen. Um den Einfluss der Telomere weiter zu spezifizieren, wurden die Zelllinien mit der katalytischen Sub-Unit der humanen Telomerase infiziert und damit immortalisiert und weiter kultiviert. Um Effekte herauszuarbeiten, die durch vermehrte äußere Einflüsse bei älteren Zellen ausgelöst werden, wurden die Zellen zusätzlich mit H₂O₂ gestresst.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Antikörper, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 1 Chemikalien

Name	Cat.-Nummer	Firma
4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Galactopyranosid (MUG)	M1633	Sigma-Aldrich
Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	3029.2	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	9592.1	Carl Roth
beta-Mercaptoethanol	M6250-100ML	Sigma
Albumin Fraktion V (BSA)	1ETA.1	Carl Roth
CHAPS	331717-45-4	Merck
cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail/ 30 Stk	05892791001	Sigma
DMEM (1x) (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose (4.5 g/L) with L-Glutamine, without Pyruvate	41965062	Gibco/ Thermo Fisher
DPBS (1x) (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), without Ca^{2+} and Mg^{2+}	14190250	Gibco/ Thermo Fisher
Ethanol, 100% vergällt	K928.4	Carl Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	TMS-013-B	Merck
Glycin	3187.4	Carl Roth
Hepes	9105.2	Carl Roth
Histochemical Staining Kit	CS0030	Sigma
Isopropanol	109634	Merck
Luminol	9253	Fluka
Magermilchpulver		Sucofin
Magnesiumchlorid	814733	Merck
Methanol	7342.1	Carl Roth
Natriumcarbonat	106392	Merck
Natriumchlorid	3957.1	Carl Roth
Natriumchlorid	106404	Merck

Natriumhydroxid	P031.2	Carl Roth
Natriumphosphat	106578	Merck
Page Ruler™ Plus, prestained 250µl	26619	Thermo Fisher
Para-Coumariensäure	501-98-4	Sigma
Penicillin/Streptomycin	A 2212	Biochrom AG
Pierce™ BCA™ Protein Assay	23225	Thermo Fisher
Salzsäure, 32%	P074.1	Carl Roth
SDS (Pellets)	CN30.3	Carl Roth
Senescence Cells Histochemical Staining Kit	CS0030	Sigma
Sucrose	1.076.511.000	Merck/Sigma
Super Signal West Femto Max	34096	Thermo/Pierce
Temed	161-0801	BioRad
Tris Base (M= 121,14 g/mol)	1.083.821.000	Merck/Sigma
Trypsin/EDTA 0.25%	25200-056	Gibco/ Thermo Fisher
Tween 20	A4974,0100	AppliChem
Wasserstoffperoxid, 30%	1.072.090.250	Merck
Zitronensäure	100247	Merck

Tabelle 2: Antikörper

Name	Cat.-Nummer	Firma
Goat Anti – Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate	1706515	BioRad
Goat Anti – Mouse IgG (H + L) – HRP Conjugate	1706516	BioRad
Rabbit Anti – Goat Immunoglobulins, Polyclonal, HRP	P0449	Dako Cytomation
Phospho – p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2) Rabbit mAb	9234	Cell Signaling
Phospho – mTOR (Ser2448) (D9C2) XP Rabbit mAb	5536	Cell Signaling
Phospho – Akt (Ser473) Rabbit mAb	9271	Cell Signaling
Anti – p70 S6 Kinase Antibody clone 20 – 10C – 6, Rabbit mAb	05-781R	Millipore
mTOR (7C10) Rabbit mAb	2983	Cell Signaling

Akt1 – Antibody (C-20)	sc-1618	Santa Cruz Biotechnology
Monoclonal Anti – β – Actin antibody produced in mouse, clone AC – 15	A5441	Sigma-Aldrich

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Name	Cat.-Nummer	Firma
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	IPVH00010	Millipore
CL-Exposure™ Filme	34089	Thermo Fisher Scientific
Falcon™ Tissue Culture Treated Flasks T25-Zellkulturflasche (25cm ² Kulturfläche)	10-126-10	Falcon™(Thermo Fisher Scientific)
Falcon™ Tissue Culture Treated Flasks T75-Zellkulturflasche (75cm ² Kulturfläche)	10-126-11	Falcon™(Thermo Fisher Scientific)
6cm-Petrischale	10099170	Corning™ Falcon™ (Thermo Fisher Scientific)
15ml Zentrifugenröhrchen	10263041	Falcon™(Thermo Fisher Scientific)
50ml Zentrifugenröhrchen	10788561	Falcon™(Thermo Fisher Scientific)
Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5ml	30120086	Eppendorf Quality™
Eppendorf Reaktionsgefäß 2ml	30120094	Eppendorf Quality™
96-Well Platte, schwarz	237108	Thermo Scientific™ Nunc™
96-Well Platte, durchsichtig	260836	Thermo Scientific™ Nunc™
Insulinspritzen 26G	9641344	Terumo
Kryoröhrchen	72.379	Sarstedt
Microseal “B” PCR Plate Sealing Film	MSB1001	Bio-rad
Whatman-Papier	11312875	GE Healthcare
Zellschaber	800020	Biochrom
12-Well Platte	10489482	Falcon™(Thermo Fisher Scientific)

Tabelle 4: Geräte

Axiovert 25	Zeiss
Axio Observer 7	Zeiss
Fluoroskan Ascent FL	Thermo Fisher
GS-800 Calibrated Densitometer	Bio-Rad
Infinite M200	Tecan

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zellcharakteristika

Für diese Arbeit wurden Fibroblasten von Kindern verwendet, die nicht an Hutchinson-Gilford-Progerie erkrankt waren. Weiterhin wurde eine Erwachsenenkontrolle untersucht. Alle Kontrollzelllinien waren Geschenke der Kinderklinik und Neurologie der Uniklinik Münster (Professor Thorsten Marquardt und Professor Peter Young) an die AG Walter. Fibroblasten von Patienten mit Hutchinson-Gilford-Progerie wurden von der Progeria-Foundation erworben.

Tabelle 5: Zellcharakteristika der Kontrollzellen

Name	Geschlecht	Alter bei der Biopsie	Grund der Biopsie/ Erkrankung
707	w	5 Monate	Plötzlicher Kindstod
731	m	5 Monate	ALTE (Primäre Schlafapnoe im Säuglingsalter)
778	m	8 Monate	V.a. Natriumdiarrhö
811	w	1 Monat	Sepsis
168	m	42 Jahre	Keine Angaben

Tabelle 6: Zellcharakteristika der Hutchinson-Gilford-Progerie-Zellen

Name/ Bezeichnung	Geschlecht	Alter bei der Biopsie	Mutation laut „Progeria Foundation“
HGADFN003/ HGP003	m	2 Jahre 0 Monate	<i>LMNA</i> Exon 11, heterozygot c.1824C>T (p.Gly608Gly)
HGADFN127/ HGP127	w	3 Jahre 9 Monate	
HGADFN164/ HGP164	w	4 Jahre 8 Monate	
HGADFN178/ HGP178	w	6 Jahre 11 Monate	

2.2.2 Zellkulturbedingungen

Die Kulturbedingungen waren über den gesamten Zeitraum konstant bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Alle Arbeiten an den Zellkulturen erfolgten steril unter einer Sicherheitswerkbank. Sämtliche hierzu benötigten Reagenzien und Medien wurden vorher auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Im Abstand von 2-7 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel inklusive eines Waschschrilles mit PBS.

Das Medium für die Kontrollzellen enthielt folgende Komponenten:

DMEM	500 ml
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)
Fetales Kälberserum (FCS)	10% (v/v)

Das Medium für die Progerie-Zellen enthielt folgende Komponenten:

DMEM	500ml
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)
Fetales Kälberserum (FCS)	15% (v/v)

2.2.3 Anlegen der Zellkultur aus Rückfrierproben

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellaliquots wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Danach wurden die Zellen in 7 ml Medium tropfenweise überführt und anschließend bei 1200 g 5 Minuten lang sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml neuem

Medium resuspendiert und anschließend in eine Zellkulturflasche der Größe T25 (25 cm² Kulturfläche) überführt. Danach wurden die Zellen wie unter 2.2.2 beschrieben kultiviert.

2.2.4 Passagieren der Zellkulturen

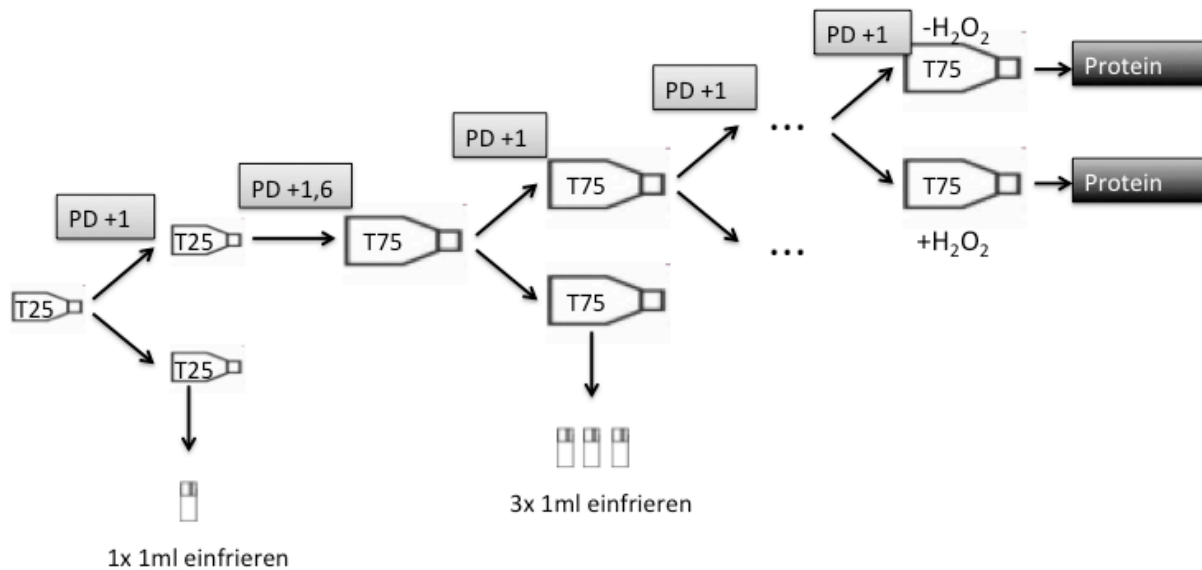


Abb. 3: Arbeitsschema Zellkultur

Bei einer Konfluenz der Zellen von 100%, wurden die Kulturen gesplittet. Nach Absaugen des vorhandenen Mediums wurden die Zellen mit 0,1% EDTA/PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte enzymatisch durch die Zugabe Trypsin/EDTA (250 µl pro T25/500 µl pro T75). Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von Medium gestoppt. Die gesamten Zellen wurden in neue Flaschen umgesetzt. Die Berechnung der Anzahl der Verdopplungen einer Fibroblastenpopulation (Population Doublings (PD)) erfolgte entsprechend dem Schema in Abb. 3. Eine exakte Zählung der Fibroblasten ist nicht erfolgt.

2.2.5 Einfrieren der Zellen

Nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz wurde das vorhandene Medium abgesaugt und mit 0,1% EDTA/PBS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben. Sobald sich die Zellen gelöst hatten, wurde die Reaktion durch Zugabe von Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1200 g 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet anschließend in Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden nun in eine mit Isopropanol gefüllte Kryobox gestellt und langsam in einem -80°C kalten Gefrierschrank eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte dann in einem Stickstofftank bei -172°C.

Das Einfriermedium war wie folgt zusammengesetzt:

30 % FCS (v/v), 1 % Penicillin/ Streptomycin (v/v), 10 % DMSO (v/v) in DMEM-Medium

2.2.6 Immortalisierung der Zellen mit hTERT

Die Immortalisierung der Zellen wurde von Kerstin Gorzelniak (ehem. AG Walter) und Brigitte Köttgen (AG Walter) durchgeführt. Im Folgenden wird das Prinzip der Immortalisierung kurz beschrieben: Die Fibroblasten wurden bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert und dann mit dem retroviralen Überstand der Verpackungszelllinie PA317-TERT für dreimal 8 Stunden infiziert. Die Verpackungszelllinie exprimiert stabil den Vektor pBabe puro hTERT, der neben der katalytischen Sub-Unit der humanen Telomerase auch ein Gen enthielt, durch welches eine Resistenz gegenüber Puromycin aufgebaut wird. Über die nächsten Wochen erfolgte die Selektion der immortalisierten Zellen durch die Zugabe von Puromycin. Anschließend wurde die Transfektion durch die Bestimmung der hTERT-Expression durch quantitative Real-Time-PCR nachgewiesen.

2.3 Western Blot – Analyse zur (semi-)quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Für die Western Blot-Analyse standen folgende Zelllinien in den aufgezeigten Population Doublings zur Verfügung:

Tabelle 7: Zelllinien und verwendete PDs für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zelllinie	Ohne hTERT		Mit hTERT	
	Niedrige PD	Hohe PD	Niedrige PD	Hohe PD
707	17,4	53,6	17,6 (49,6)	70,1 (25,1)
731	13,4	55,5	15,6 (44,5)	55,6 (17,8)
778	15,0	40,5	14,0 (39,0)	66,0 (16,6)
811	14,6	49,0	28,5 (17,5)	62,5 (17,5)
168	13,9	22,5	16,8 (8,3)	55,7 (22,1)
HGP003	18,6	34,3	33,5 (18,1)	63,5 (18,1)
HGP127	19,3	40,0	14,6 (39,3)	56,7 (12,4)
HGP164	14,6	41,8	14,6 (11,2)	64,0 (11,4)
HGP178	19,6	34,3	21,9 (12,9)	59,3 (12,9)

Zahlen in den Klammern kennzeichnen die PD zum Zeitpunkt der Immortalisierung. Nach Immortalisierung begann die Zählung der PDs wieder bei 0.

2.3.1 H₂O₂-Versuch und Ernten der Zellen für den Western Blot

Für die Western Blot-Analyse wurden für jede Zelllinie primäre Zellen in niedriger und hoher PD und mit hTERT immortalisierte Zellen in niedriger PD (bezogen auf den Zeitpunkt der Immortalisierung) und in hoher PD genutzt. Dazu wurden die Zellen solange entsprechend dem Arbeitsschema Zellkultur (Abb. 3) gesplittet, bis sie die gewünschte PD erreicht hatten und jeweils zwei Flaschen der Größe T75 in einer Konfluenz von 100% vorhanden waren. Dann wurden die Zellen mittels Zugabe von H₂O₂ oxidativen Stress ausgesetzt. Dazu wurde dem Medium 200µM H₂O₂ zugegeben. Zusätzlich wurde eine Vergleichskultur gleicher Passage unter normalen Kulturbedingungen mitgeführt. Nach 2 Stunden Inkubation wurden beide Flaschen mit PBS gewaschen und in neuem Medium für weitere 22 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1% EDTA/PBS gewaschen und dann mit Trypsin/ETDA gelöst. Die Zellen wurden nun in 7 ml Medium aufgenommen, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 1ml PBS resuspendiert, in ein 1,5ml Eppi umgesetzt und noch einmal auf gleiche Weise zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgenommen und das Pellet in 200µl Sucrose-Hepes-Puffer +cComplete gelöst. Die Zellen wurden bis zum Weitergebrauch bei -80°C eingefroren.

Zusammensetzung des Sucrose-Hepes-Puffers:

Sucrose-Hepes-Puffer: 0,2M Sucrose, 0,02M Hepes, pH 7,3, steril filtriert

Sucrose-Hepes-Puffer + cComplete: 1 Tablette auf 10ml Sucrose-Hepes-Puffer

2.3.2 Zellaufschluss und Bestimmung der Proteinkonzentration für den Western Blot

Der Aufschluss und das Homogenisieren der Zellen erfolgte nach dem Auftauen durch mehrfaches Scheren mittels einer Spritze mit Kanüle (Terumo 26G). Dazu wurden die Zellen im Sucrose-Hepes-Puffer (+Complete) 10-mal heraufgezogen und wieder heruntergedrückt. Die Proben wurden daraufhin in einer Zentrifuge kurz bis auf eine g-Zahl von 5000 beschleunigt und gleich wieder gestoppt, um nicht lösliche Anteile zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Eppi überführt.

Die anschließende Bestimmung des Gesamtproteingehalts der Zelllysate erfolgte mit dem Pierce™ Protein BCA Assay Kit (ThermoFisher).

Das Zelllysate wurde für die Proteinbestimmung zunächst 1:10 mit PBS vorverdünnt. Jeweils 10 µl Zelllysate, Kalibrator und Leerwert (PBS) wurden auf eine 96-Well-Platte gegeben. Zu jedem Well wurden 200 µl Arbeitsreagenz (50 Teile Reagenz A und 1 Teil Reagenz B) gegeben. Nach

kurzem Mischen (Schwenken) erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 30min. Anschließend wurde die Absorption bei 562 nm gemessen (Tecan Infinite M 200). Mit Hilfe der Kalibration (8-Punkt-Kalibration im Bereich von 25 µg/ml – 2 mg/ml) wurde die jeweilige Konzentration mittels linearer Eichkurve ermittelt. Dann wurden Aliquots der zelllysate mit einem Proteingehalt von jeweils 50 µg gebildet und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Bedingt durch die langen Lagerzeiten wurde vor der weiteren Verwendung der Aliquots eine erneute Proteinbestimmung nach der gleichen Methodik durchgeführt.

2.3.3 SDS-PAGE

Für die Gelelektrophorese wurden selbst hergestellte Polyacrylamid-Gele mit den Konzentrationen 7,5% und 10% Acrylamid für die Trenngele und 5% Acrylamid für alle Sammelgele mit einer Schichtdicke von je 1,5 mm verwendet. Je 20µg Proteinlysate, je nach Volumen verdünnt mit mit Sucrose-Hepes-Puffer + cComplete, wurde mit 2xSDS-Probenpuffer versetzt.

Die vorbereiteten Proben wurden bei 60°C für 10min denaturiert. Danach wurden bis zu 30 µl Probe aufgetragen (finaler Proteingehalt: 20 µg). Der Lauf der Gelelektrophorese erfolgte in 1xElektrophoresepuffer bei 60mA über 90min.

Zusammensetzung der Gelelektrophorese-Puffer:

Trenngel-Puffer: 1,5 M Tris, pH 8,8 in Reinstwasser (MilliQ)

Trenngel 10%: 10 % Acrylamid Stock (v/v), 375 mM Trenngel- Puffer, 0,1 % SDS (w/v), 0,1 % APS (w/v), 0,01 % TEMED (v/v) in Reinstwasser (MilliQ)

Trenngel 7,5%: 7,5 % Acrylamid Stock (v/v), 375 mM Trenngel- Puffer, 0,1 % SDS (w/v), 0,1 % APS (w/v), 0,01 % TEMED (v/v) in Reinstwasser (MilliQ)

Sammelgel-Puffer: 0,5 M Tris, pH 6,8 in Reinstwasser (MilliQ)

Sammelgel: 5 % Acrylamid Stock (v/v), 167 mM Sammelgel- Puffer, 0,1 % SDS (w/v), 0,1 % APS (w/v), 0,01 % TEMED (v/v) in Reinstwasser (MilliQ)

2 x SDS-Probenpuffer: 0,1 M Tris (pH 6,8), 8 % (w/v) SDS, 40 % (w/v) Glycerin, 0,2 mg/ mL Bromphenolblau, 20 % β- Mercaptoethanol

10x Elektrophoresepuffer: 1,9 M Glycin, 250 mM Tris, 1 % SDS (w/v) in Reinstwasser (MilliQ)

Als Proteinstandard dienten jeweils 4 µl PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder von ThermoFisher Scientific.

2.3.4 Wet Western Blot

Der elektrophoretische Transfer der Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte mittels Wet Western Blot. Die PVDF-Membran wurde vor dem Blotten für 5min in Methanol aktiviert und anschließend kurz mit destilliertem Wasser gewaschen. Währenddessen wurden die Schwämme und Whatman-Papier mit Blotpuffer durchtränkt. Der Western-Blot-Tank wurde in folgender Reihenfolge aufgebaut: Anode, Schwamm, Whatman-Papier, PVDF-Membran, SDS-Gel, Whatman-Filter, Schwamm, Katode. Der Transfer erfolgte unter Kühlung mit einem Kühlpack bei 350mA über 35min für die 7,5%igen Gele und bei 350mA über 40min für die 10%igen Gele.

Der Blot-Puffer war wie folgt zusammengesetzt:

Blotpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % Ethanol (v/v) in Reinstwasser (MilliQ)

Tabelle 8: Antikörper und deren Verdünnungen

Primär-AK	Gel-Konzentration	Primär-AK Verdünnung	Sekundär-AK mit Verdünnung
Akt1 (C20)	7,5% und 10%	1:500	Ziege, 1:5000
P-Akt1 Ser473	10%	1:1000	Hase, 1:5000
mTOR (7C10)	7,5% und 10%	1:1000	Hase, 1:5000
P-mTOR Ser2448 (D9C2)	7,5%	1:1000	Hase, 1:5000
P70 (20-10C-6)	7,5% und 10%	1:3000	Hase, 1:5000
P-p70 Thr389 (108D2)	10%	1:1000	Hase, 1:5000
ULK1 (D8H5)	7,5% und 10%	1:1000	Hase, 1:5000
P-ULK1 Ser757 (D7O6U)	7,5%	1:1000	Hase, 1:5000
β-Aktin	7,5% und 10%	1:30.000	Maus, 1:20.000

2.3.4.1 Proteinbestimmung von Phospho-Akt, Phospho-mTOR, Phospho-p70, Phospho-ULK1

Vor der Inkubation mit den Antikörpern wurden die Membranen zunächst für 30 min in BSA-Blocking-Puffer geblockt. Anschließend wurden die Membranen mit einem Antikörper gegen das jeweilige phosphorylierte Protein inkubiert (siehe Tabelle 8). Dazu wurde für jedes phosphorylierte Protein eine 3 ml - Antikörperlösung mit BSA-Blocking-Puffer in den entsprechenden Konzentrationen laut Tabelle 8 in einem Falcon-Röhrchen mit 50 ml

Fassungsvermögen hergestellt. Die Membranen wurden mit Protein-beschichteten Seite nach innen in die Falcon-Röhrchen gebracht und dann über Nacht bei 4°C auf einem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 3x für 10min in 1xTBS-T gewaschen. Die Inkubation mit 5 ml Sekundärantikörperlösung erfolgte in entsprechender Verdünnung für 1h bei Raumtemperatur, ebenfalls auf einem Rollenmischer. Es folgten 3 weitere Waschschrte mit 1xTBS-T über jeweils 10 min. Die Detektion der Proteine erfolgte mithilfe einer selbst hergestellten ECL-Lösung (enhanced chemiluminescence). Dazu wurde die fertige ECL-Lösung erst kurz vor jeder Reaktion frisch angesetzt, auf die Membranen gegeben und 2 min lang inkubiert. Danach folgte je nach Intensität der Signale die Exposition der Röntgenfilme gegenüber den Membranen.

Für die quantitative Auswertung wurden alle fertig entwickelten Blots mithilfe eines Densitometers eingescannt und in das Programm Image Studio™ Lite der Firma LI-COR eingepflegt. Zur Normalisierung wurden alle Werte auf das entsprechende β -Aktin bezogen.

Zusammensetzung der genutzten Puffer:

10x TBS: 200 mM Tris, 1,5 M NaCl in Reinstwasser (MilliQ) (pH 7,5)

1x TBS-T: 0,1% Tween 20 in 1x TBS

BSA-Blocking-Puffer: 5% (w/v) BSA in 1xTBS-T

ECL-Lösung-A: 0,25% (w/v) Luminol, 0,1M Tris (50mg Luminol in 200ml 0,1M Tris)

ECL-Lösung B: 1,1% (w/v) Para-Coumariensäure in DMSO (11mg Para-Coumariensäure in 10ml DMSO)

ECL-Lösung: 2ml A, 0,2ml B, 1 μ l 30% H₂O₂

2.3.4.2 *Strippen der Membranen*

Um neben den phosphorylierten auch die nicht-phosphorylierten Proteine auf einer einzelnen Membran nachzuweisen, wurden alle Membranen nach Analyse der phosphorylierten Proteine für 1h bei 60°C mit Glycin-Stripping-Puffer auf einem Schüttler gestrippt. Nach 3 Waschschrten mit 1xTBS-T über je 5 min folgte eine weitere Blockierung unspezifischer Bindungen auf der Membran mit Milch-Blocking-Puffer für weiter 30 min.

Zusammensetzung der genutzten Puffer:

Milch-Blocking-Puffer: 5 % Magermilchpulver in 1x TBS-T

Glycin- Stripping Puffer: 0,1 M Glycin, 1,1 % HCl in Reinstwasser (MilliQ)

2.3.4.3 *Proteinbestimmung von Gesamt-Akt, Gesamt-mTOR, Gesamt-p70, Gesamt-ULK1 und β -Aktin*

Für den Nachweis der jeweiligen Proteine inklusive des phosphorylierten Anteils wurden Gemische aus mehreren Antikörpern hergestellt. Auf die Membranen wurde jeweils ein Primär-Antikörper-Mix gegeben. Dementsprechend wurde anschließend mit dem passenden Sekundär-Antikörper-Mix inkubiert. Die Inkubationszeiten und weiteren Arbeitsschritte wurden in gleicher Weise wie bei den phosphorylierten Proteinen durchgeführt.

Zusammensetzung der verwendeten Antikörper-Mischungen:

Primär-Antikörper-Mix 1: mTOR (1:1000), p70 (1:3000), β -Aktin (1:80.000) in Milch-Blocking-Puffer

Primär-Antikörper-Mix 2: Akt (1:1000), ULK (1:1000), β -Aktin (1:80.000) in Milch-Blocking-Puffer

Sekundär-Antikörper-Mix 1: Anti-Rabbit-AK (1:5000), Anti-Mouse-AK 1: (20.000) in Milch-Blocking-Puffer

Sekundär-Antikörper-Mix 2: Anti-Rabbit-AK (1:5000), Anti-Goat-AK (1:5000), Anti-Mouse-AK 1: (20.000) in Milch-Blocking-Puffer

2.3.5 **Quantitative und statistische Auswertung**

Das GS-800 Calibrated Densitometer wurde zur Digitalisierung der Blots verwendet. Die quantitative Auswertung erfolgte in technischen Triplikaten mit der Software ImageStudio™ Lite der Firma LI-COR. β -Aktin diente zur Normalisierung der Ergebnisse. Ausgeschlossen wurden diejenigen Blots, bei denen die Darstellung der Banden auf eine ungleiche Verteilung des Antikörpers schließen ließ bzw. keine Banden erkennbar waren. Die Zusammenstellung aller eingeschlossenen Blots kann auf Anfrage in den Primärdaten eingesehen werden. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software IBM SPSS Statistics. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt unter Verwendung der exakten 2-seitigen Signifikanz. Werte $<0,05$ wurden als signifikant definiert. Die grafische Darstellung der Quantifizierung wurde mit Origin 2018b von OriginLab umgesetzt.

2.4 **Bestimmung von Seneszenzmarkern**

Die Versuche wurden bis einschließlich der Generierung der Rohdaten in Zusammenarbeit mit Katharina Binder durchgeführt.

Für die Bestimmung von Seneszenzmarkern standen folgende Zelllinien in den aufgezeigten Population Doublings zur Verfügung:

Tabelle 9: Zelllinien und verwendete PDs für die Bestimmung von Seneszenzmarkern

Zelllinie	Ohne hTERT		Mit hTERT	
	Niedrige PD	Hohe PD	Niedrige PD	Hohe PD
731	N/A	53,3	21,4	60,4
811	22,0	57,0	16,2	57,2
HGP003	18,6	30,8	14,6	57,5
HGP127	18,8	40,0	23,0	66,2
HGP164	18,8	41,8	19,4	66,4
HGP178	17,8	34,4	20,0	66,0

Von einer statistischen Auswertung der Experimente wurde aufgrund der geringen Kontrollzellzahl abgesehen.

2.4.1 H₂O₂- Versuch

Da beschrieben wurde, dass bei konfluenten Zellen falsch positive Ergebnisse zustande kommen [105], musste der H₂O₂-Versuch für die Bestimmung der Seneszenzmarker leicht abgewandelt werden. Die Experimente wurden mit ca. 60-80%-konfluenten Zellen durchgeführt. Die Spannbreite ergab sich aus den unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der Zellen. Es wurden jeweils konfluente Zellen in einer T25-Zellkulturflasche einen Tag vor dem Experiment auf jeweils zwei Petrischalen (Ø 5 cm) und zwei Vertiefungen einer 12-Well-Platte überführt und über Nacht adhären gelassen. Jeweils eine Petrischale und ein Well der 12-Well-Platte wurden mit H₂O₂ versetzt, die anderen wurden parallel mit normalem Medium weiter kultiviert. Die zweistündige Inkubation mit 200 µM H₂O₂ folgte am nächsten Morgen; bei den Kontrollschalen wurde ein einfacher Mediumwechsel durchgeführt. Nach Ablauf der zwei Stunden folgte ein Wechsel des Mediums bei allen Zellen. Nach weiteren 4 Stunden wurden die Zellen je nach Experiment aufbereitet

Die verkürzten Inkubationszeiten mit H₂O₂ waren notwendig, da in Vorversuchen bei den nicht-konfluenten Zellen unter den Bedingungen des Versuchs, wie im Kapitel 2.3.1 beschrieben, nahezu alle Zellen abgestorben sind.

2.4.2 SA- β -Galactosidase-Färbung

Die SA-(Seneszenz-assoziierte)- β -Galaktosidase -Färbung ist eine Standard-Methode zum Nachweis seneszenter Zellen [105,106]. Für diese Experimente wurde das Senescence Cells Histochemical Staining Kit von Sigma-Aldrich verwendet und entsprechend dem beigelegten Protokoll durchgeführt: Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden jeweils 600 μ l 1xFixationspuffer auf die Zellen gegeben und für 7 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde die Staining Mixture laut Herstellerprotokoll vorbereitet. Der Fixationspuffer wurde abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden jeweils 400 μ l Staining Mixture auf die Zellen gegeben. Der Plattendeckel wurde aufgelegt und die Platte mit Parafilm ringsum luftdicht umwickelt. Die Platte wurde dann in einen 37°C warmen Brutschrank ohne CO₂-Begasung über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Staining Mixture abgesaugt und die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen. Zur Konservierung wurde 70%iges Glycerin auf die Zellen gegeben. Für die Betrachtung unter dem Mikroskop wurde das Glycerin entfernt, mit PBS gewaschen und zuletzt 500 μ l PBS auf die Zellen gegeben. Die Beurteilung der Zellen erfolgte mithilfe des Axio Observers der Firma Zeiss bei 50-facher Vergrößerung. Pro Well wurden jeweils bis zu vier Aufnahmen gemacht. Weniger Aufnahmen wurden bei denjenigen Wells gemacht, bei Zellvitalität <50% war. Alle Bilder wurden in gleicher Vergrößerung aufgenommen. Die Aufnahmen können bei Bedarf in den Primärdaten eingesehen werden.

Die angefertigten Aufnahmen wurden zwei am Experiment unbeteiligten Personen verblindet vorgelegt, die jeweils alle sichtbaren Zellen der Aufnahme zählten und dabei den Anteil der blau-gefärbten Zellen ermittelten.

2.4.3 MUG-Assay

Da die SA- β -Galaktosidase -Färbung subjektiv beeinflusst ist hinsichtlich der Auszählung der Zellen, wurde eine quantitative Methode zur Bestimmung der seneszenten Zellen durchgeführt. Dazu wurde das Protokoll von Gary und Kindell (2005) [105] des 4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Galactopyranosid (MUG) Assays als Grundlage genommen: Die verwendeten Zellen befanden sich auf Petrischalen (\varnothing 5 cm). Zunächst wurde das vorhandene Medium abgesaugt und die Zellen sechsmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 300 μ l eiskalter Lysispuffers auf die Fibroblasten gegeben. Durch Schwenken und Klopfen gegen die Petrischalen wurden die Zellen vom Untergrund gelöst. Verbliebene Zellen wurden durch einen Zellschaber vom Untergrund gelöst. Die Zellsuspension wurde mithilfe einer Pipette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß

gegeben und darin für 30 s gevortext. Dann folgte ein Zentrifugationsschritt bei 12.000 g über 5 min. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Aus diesem Überstand wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt nach gleichem Vorgehen wie unter 2.3.2 beschrieben. Für den MUG-Assay wurden 100 µl des Überstandes in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl Lysispuffer versetzt. 150 µl 2xReaktionspuffer wurden dazugegeben und das Reaktionsgemisch in den Heizblock bei 37°C gut verschlossen inkubiert. Nach 30 min, 1 h, 2 h und 3 h wurden jeweils 50 µl des Reaktionsgemisches in 500 µl vorgelegte Stopp-Lösung überführt und dieses dann bei 4°C im Dunklen bis zur Messung verwahrt. Nach Abschluss des Versuches wurde die Fluoreszenzmessung als Zweifachbestimmung durchgeführt. Dazu wurden jeweils zweimal 150 µl der Proben in je ein Well einer 96-Well-Platte gegeben. Die fluorimetrische Messung des durch die SA-β-Galaktosidase freigesetzte 4-Methylumbelliferyl wurde mithilfe des Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific) bei 360 nm Exzitation und 465 nm Emission durchgeführt. Die ermittelten Werte wurden mit den Ergebnissen des jeweiligen Proteinwertes der Probe normalisiert. Das Ergebnis wurde in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) pro mg Protein angegeben.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

Lysispuffer: 5 mM CHAPS, 40 mM Zitronensäure, 40 mM Natriumphosphat, 1x Complete in Reinstwasser (MilliQ) (pH 6)

2x Reaktionspuffer: 40 mM Zitronensäure, 40 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, 4 mM Magnesiumchlorid, 1,7 mM MUG in Reinstwasser (MilliQ) (pH 6)

Stopp-Lösung: 400 mM Natriumcarbonat in Reinstwasser (MilliQ)

2.5 Erstellung der Wachstumskurven

Ziel war es, jeweils Zellen in einer niedrigen PD (low PD) und einer hohen PD (high PD), sowohl primär als auch immortalisiert, zu erhalten. Dazu wurden die primären Zellen passagiert, bis sich der Zeitraum zum Erreichen der 100% Konfluenz deutlich verlängerte, die Zellen in ihrer Morphologie seneszenten Zellen ähnelten (Verbreiterung) und sie sich damit dem Stadium der replikativen Seneszenz annäherten. Bei den immortalisierten Zellen konnten solche Veränderungen nicht beobachtet werden, sodass die Kultivierung nach über 50 PDs abgebrochen wurde. Für die vorliegende Arbeit wurden Zellpassagen in frühen und späten Passagen aus

Rückfrierproben genutzt. Die Rohdaten der Wachstumskurven wurden von Kathrin Jäger zusammengestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Da keine durchgängigen Wachstumskurven aufgezeichnet wurden, sondern nur frühe und späte Passagen in Kultur genommen wurden, wurde nur jeder fünfte PD in den Kurven dargestellt. Sie stellen somit jeweils eine Annäherung an die tatsächlichen Wachstumskurven dar.

Die Grafiken der ersten Ableitungen wurden mithilfe des Programms Origin 2018b von OriginLab berechnet. Die Anstiege in Tabelle 10 sind durch Berechnung der Anstiege der Geraden zwischen zwei Punkten entstanden.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultur

Abb. 4 zeigt approximierte Wachstumskurven der primären Kontroll- und HGP-Zellen und die ersten Ableitungen dieser.

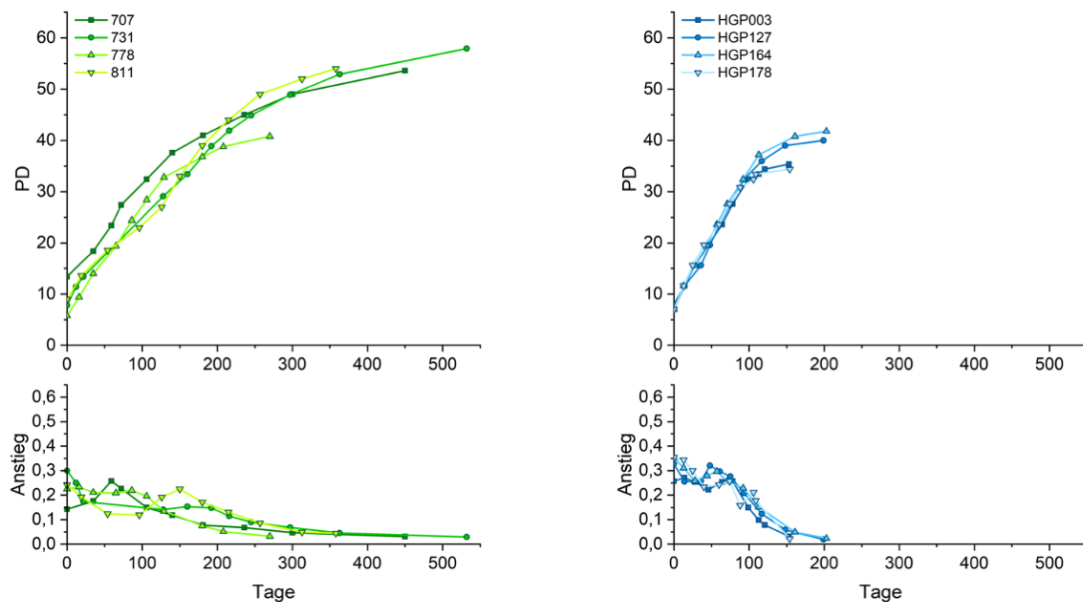


Abb. 4 Wachstumskurven der primären Zelllinien und deren erste Ableitung.

Im oberen Teil der Abbildung sind die Wachstumskurven der primären Kontrollzelllinien (grün) und Progerie-Zelllinien (blau) abgebildet, im unteren Teil ist der Anstieg der Kurven dargestellt ermittelt durch Bildung der ersten Ableitung der Geraden zwischen zwei Punkten. Alle Progerie-Zelllinien weisen eine im Durchschnitt höhere Wachstumsgeschwindigkeit in niedrigen und mittleren PDs, eine schnelle Plateaubildung kurz vor der Seneszenz und ein früheres Erreichen der Seneszenz auf als die Kontrollzellen auf.

Um die Dimensionen der Unterschiede herauszuarbeiten, wurden die Anstiege zwischen zwei Punkten zu bestimmten Zeitpunkten berechnet (Tabelle 10). Dabei ist zu betonen, dass die Berechnungen auf der Approximation der Wachstumskurven beruhen.

Auffallend ist, dass die HGP-Zellen in niedrigen Passagen schneller wuchsen als die Kontrollzellen, jedoch auch in einer niedrigeren Passage das Stadium des Wachstumsstopps erreichten. So zeigen die HGP-Zellen nach 50 Tagen in Kultur eine um $53 \pm 35\%$ erhöhte Proliferationsrate an als die Kontrollen. Nach 100 Tagen in Kultur wuchsen die Progerie-Zellen schon langsamer als die Kontrollen. Der Unterschied im Anstieg der Kurven zwischen den Progerie-Zellen war hier am deutlichsten bei einem Mittelwert von 89% der Kontrollen. Die Zelllinie HGP164 weicht mit 62% über dem Mittelwert der Progerie-Zellen am weitesten ab. Nach 150 Tagen lag die Verdopplungszeit der Progerie-Zellen bei 30% der Kontrollen, wobei

die Zelllinie HGP164 mit 61% des Anstiegs der Kontrollen die schnellste Wachstumsrate der HGP-Zellen aufwies. Den Wachstumsstopp der Kultur erreichten die Progerie-Zellen im Mittel bei $37,9 \pm 3,9$ PDs und nach 177 (± 26) Tagen, die Kontrollzellen bei $51,6 \pm 10,8$ PDs und 403 (± 129) Tagen.

Tabelle 10: Anstiege der Wachstumskurven zu nach 50, 100 und 150 Tagen in Kultur

CON	Anstieg nach 50 Tagen	HGP	Anstieg	% vom MW der CON
707	0,21	HGP003	0,22	131
731	0,15	HGP127	0,31	181
778	0,18	HGP164	0,31	181
811	0,14	HGP178	0,20	118
MW	0,17		0,26	153

CON	Anstieg nach 100 Tagen	HGP	Anstieg	% vom MW der CON
707	0,15	HGP003	0,07	47
731	0,13	HGP127	0,15	99
778	0,20	HGP164	0,23	151
811	0,13	HGP178	0,09	59
MW	0,15		0,13	89

CON	Anstieg nach 150 Tagen	HGP	Anstieg	% vom MW der CON
707	0,08	HGP003	0,03	25
731	0,13	HGP127	0,02	16
778	0,08	HGP164	0,07	61
811	0,20	HGP178	0,02	18
MW	0,12		0,04	30

Die Wachstumskurven der einzelnen Kontrollzellen stellen sich einheitlich dar ohne große Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Ebenso haben die Progerie-Zelllinien einen übereinstimmenden Verlauf.

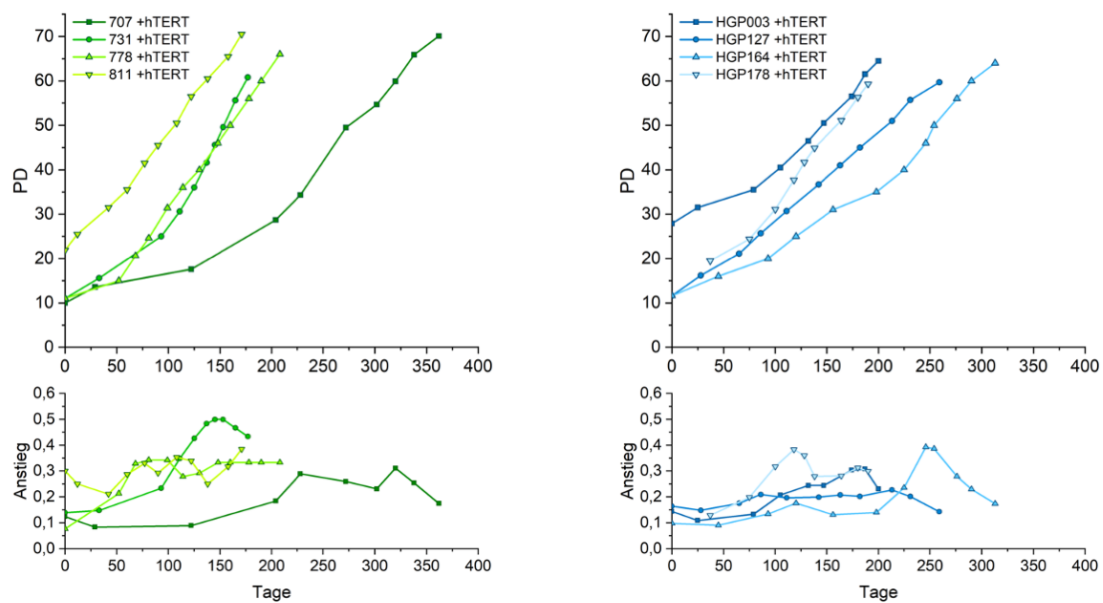


Abb. 5: Wachstumskurven der immortalisierten Zelllinien und deren erste Ableitung.

Im oberen Teil der Abbildung sind die Wachstumskurven der immortalisierten Kontrollzelllinien (grün) und Progerie-Zelllinien (blau) abgebildet, im unteren Teil ist der Anstieg der Kurven dargestellt ermittelt durch Bildung der ersten Ableitung der Geraden zwischen zwei Punkten. Die Kontroll- und Progerie-Zellen weisen hier ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten auf. Es zeigten sich keine Zeichen der Seneszenz der Zellkulturen. Die Kultivierung wurde zwischen der PD 60-70 eingestellt.

Durch Immortalisierung mit hTERT konnte sowohl bei den Kontroll- als auch den HGP-Fibroblasten die Lebenszeit deutlich verlängert werden.

Abb. 5 zeigt die approximierten Wachstumskurven der immortalisierten Zellen und deren erste Ableitungen. Auch diese Wachstumskurven stellen eine Annäherung an die tatsächlichen Kurven dar aufgrund mehrerer Einfrier- und Auftauprozesse.

Es fällt auf, dass die Wachstumsgeschwindigkeiten kurz nach der Immortalisierung langsamer sind als in höheren PDs. Mit steigender Passage weisen die immortalisierten Kontrollzellen eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit auf als die primären Kontrollzellen. Die Progerie-Zellen normalisieren sich knapp unter dem Niveau der primären HGP-Zellen ein.

Alle Zelllinien konnten bis zu einer PD deutlich über 50 nach Immortalisierung kultiviert werden, ohne Anzeichen der zellulären Seneszenz wie verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit und typische Veränderungen in der Morphologie aufzuweisen

3.2 MUG und SA- β -Gal-Färbung

Aufgrund begrenzter Mengen an Versuchszellen, konnten die Versuche nicht an allen Zelllinien in allen PDs durchgeführt werden. Fehlende Daten sind entsprechend mit N/A in den Abbildungen gekennzeichnet. Aufgrund der niedrigen Anzahl an Kontrollzelllinien erfolgte keine statistische Auswertung.

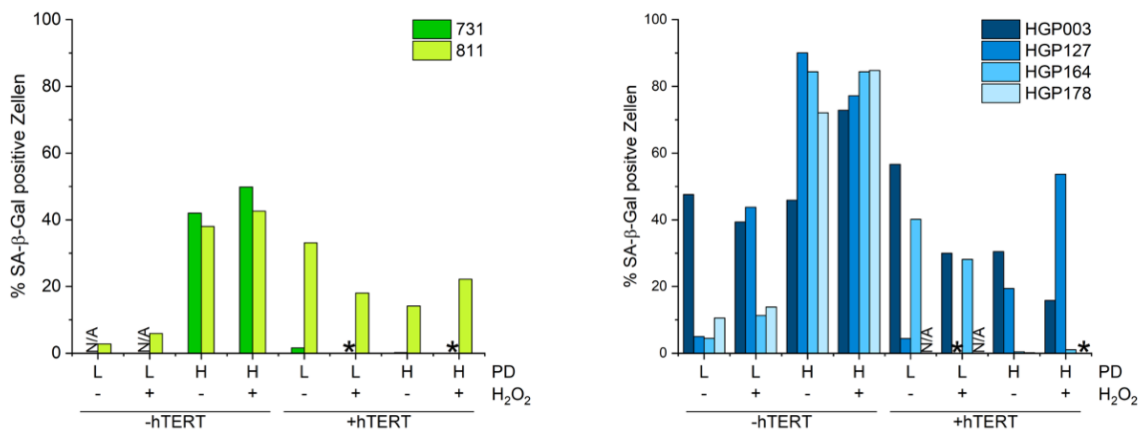


Abb. 6: SA- β -Gal-Färbung der Kontrollzellen (grün) und der Progerie-Zellen (blau).

Die Abbildung stellt den Anteil (in %) seneszenter Zellen in der Kultur dar. Die Analyse erfolgte bei primären (-hTERT) und immortalisierten (+hTERT) Zellen in niedriger (L) und hoher (H) PD in jeweils nicht gestressten (-H₂O₂) und gestressten (+H₂O₂) Zustand. Primäre Progerie-Zellen weisen einen höheren Anteil seneszenter Zellen als primäre Kontrollzellen in der gleichen PD. Die Immortalisierung führt zu einem geringeren Anteil seneszenter Fibroblasten bei Kontroll- und Progerie-Zellen. Kontrollzellen: grün, HGP: Zellen: blau. N/A: keine Zellen vorhanden, *Zellen sind durch die Behandlung mit H₂O₂ abgestorben.

Abb. 6 zeigt die Ergebnisse der SA- β -Galaktosidase-Färbung an Kontroll- und Progerie-Zellen.

Da für diesen Test festgestellt wurde, dass es zu einer vermehrten Expression der Seneszenz-assoziierten- β -Galaktosidase kommt, wenn die Färbung bei konfluenten Zellen durchgeführt wird, wurde eine Konfluenz von 60-80% angestrebt [105]. In diesen Zustand reagierten die Zellen deutlich anfälliger auf die Behandlung mit H₂O₂, sodass in einigen Petrischalen der überwiegende Teil der Zellen abgestorben sind und eine Zählung unmöglich wurde. Diese sind in Abb. 6 mit einem * dargestellt.

Es wurde erwartet, dass mit zunehmender Passage der primären Zellen der Anteil an seneszenten Zellen zunimmt. Dieser Anteil sollte durch die Applikation von oxidativem Stress in Form von H₂O₂-Zugabe noch gesteigert werden können.

Für die Kontrollzelllinie 731 standen keine Zellen in niedriger Passage zur Verfügung. Die Kontrollzelllinie 811 wies erwartungsgemäß mehr seneszente Zellen in der hohen Passage auf (3% vs. 38%). Ein zusätzlicher oxidativer Stress konnte diesen Effekt leicht steigern (auf 43%). Die

Progerie-Zelllinien HGP127, HGP164 und HGP178 zeigten ebenfalls in hohen Passagen eine Zunahme seneszenter Zellen (5-11% vs. 72-90%). Im Vergleich lagen die Anteile der seneszenten Zellen der Progerie somit jeweils über denen der Kontrollzelllinie. In niedrigen Passagen konnte durch oxidativen Stress der Anteil seneszenter Zellen noch weiter gesteigert werden (auf 11-45%). In hohen Passagen wird nur in einer Zelllinie (HGP003) eine weitere Zunahme nach Applikation von H₂O₂ beobachtet. Bei allen anderen Zelllinien ist das Ergebnis inkonsistent und nicht erwartungsgemäß.

HGP003 entsprach in niedriger PD nicht der Erwartung. Die primären Zellen in niedriger Passage wiesen bereits sehr viele seneszente Zellen auf (48%). Nach Applikation von H₂O₂ hingegen fiel der Anteil der seneszenten Zellen auf 39%.

Durch Immortalisierung der Zellen sollte die Zunahme der seneszenten Zellen in hohen Passagen, mit und ohne oxidativen Stress, niedriger ausfallen, da eine Telomerverlängerung durch hTERT möglich ist. Die Daten zeigten einen Abfall der seneszenten Zellen gegenüber den nicht immortalisierten Zellen in hoher Passage in allen Zelllinien bis auf HGP003. Das Ausmaß der Reduktion der seneszenten Zellen fällt bei den einzelnen Zelllinien sehr differenziert aus (siehe Abb. 6). Auffällig war das Verhalten aller immortalisierten Progerie-Zelllinien in niedriger Passage nach Applikation von H₂O₂. Hier kam es zu einer Abnahme, statt wie erwartet zu einer Zunahme der seneszenten Zellen. Dieser Effekt war in höheren Passagen wieder rückläufig.

Die Ergebnisse der SA-β-Galaktosidase-Färbung zeigen, dass es zu einer deutlichen Zunahme der seneszenten Zellen während des replikativen Alterns der Zellen kommt. Die Immortalisierung führt zu einer verminderten Aktivität der SA-β-Galaktosidase und somit zu einem geringeren Anteil seneszenter Fibroblasten. Das Ausmaß ist allerdings sehr heterogen. Zellstress, mit H₂O₂ ausgelöst, führt überwiegend zu erhöhten Anteilen an seneszenten Zellen, wobei besonders immortalisierte Zellen sehr sensibel auf diesen Reiz reagieren.

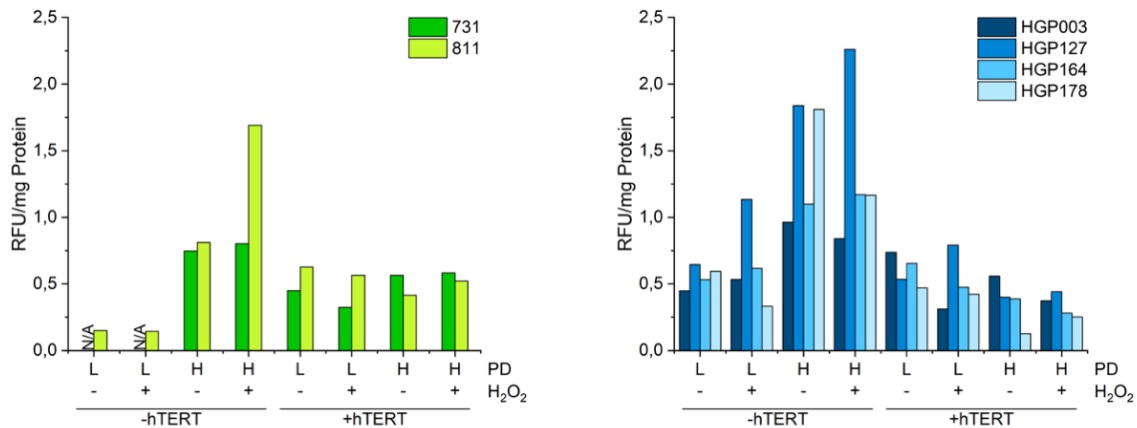


Abb. 7: MUG-Assay der Kontrollzellen (grün) und der Progerie-Zellen (blau).

Die Abbildung stellt die freigewordenen relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) durch den Umsatz von 4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Galaktopyranosid durch die SA- β -Galaktosidase pro mg Protein des verwendeten Zelllysates dar. Die Analyse erfolgte bei primären (-hTERT) und immortalisierten (+hTERT) Zellen in niedriger (L) und hoher (H) PD in jeweils nicht gestressten (-H₂O₂) und gestressten (+H₂O₂) Zustand. Primäre Progerie-Zellen weisen einen höheren Anteil seneszenten Zellen als primäre Kontrollzellen in der gleichen PD. Die Immortalisierung führt zu einem geringeren Anteil seneszenten Fibroblasten bei Kontroll- und Progerie-Zellen und hebt den Unterschied zwischen Kontrollen und Progerie auf. Kontrollzellen: grün, HGP: Zellen: blau. N/A keine Zellen vorhanden

Da die SA- β -Galaktosidase-Färbung sehr untersucherabhängig ist, wurde zur Verifizierung der 4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Galaktopyranosid (MUG)-Assay als objektive, quantitative Methode durchgeführt. Dabei dient das MUG als fluorogenes Substrat für die Bestimmung der SA- β -Galaktosidase-Enzymaktivität. Diese wurde dann auf den Proteingehalt des Zelllysates bezogen. Abb. 7 zeigt die Ergebnisse des MUG-Assays. Es wurde mit der gleichen Erwartungshaltung an dieses Experiment heran gegangen, wie bei der SA- β -Galaktosidase-Färbung.

Auch hier stand die Zelllinie 731 in niedriger Passage nicht zur Verfügung. Gemäß der Erwartung konnte in allen Zelllinien ein Anstieg der SA- β -Galaktosidase-Aktivität in hoher Passage beobachtet werden. Auffällig ist, dass die Progerie-Zelllinien mit 0,45-0,65 RFU/mg Protein bereits in niedriger Passage einen höheren Anteil an SA- β -Galaktosidase-Aktivität aufwiesen als die Zelllinie 811 mit 0,15 RFU/mg Protein. Auch in hohen Passagen zeigte sich eine höhere Enzymaktivität bei den Progerie-Zelllinien (CON 0,75-0,81 RFU/mg Protein vs. HGP 0,96-1,84 RFU/mg Protein). Zusätzlicher oxidativer Stress führte in den Kontrollzellen in hoher Passage zu einer weiteren Erhöhung der SA- β -Galaktosidase-Aktivität, wobei diese bei der Zelllinie 811 deutlich stärker zu sehen war. Bei den Progerie-Zellen führte der oxidative Stress auch hier zu inkonsistenten Ergebnissen.

Die Immortalisierung der Zellen führte in allen Zelllinien zu einem Abfall der SA- β -Galaktosidase-Aktivität gegenüber den nicht immortalisierten Zellen in hoher Passage.

Auch hier kam es bei immortalisierten Zellen in niedriger Passage nach H₂O₂-Applikation überwiegend zu einer Abnahme, statt wie erwartet zu einer Zunahme der seneszenten Zellen. In hohen Passagen fielen die Reaktionen auf den Stress mit H₂O₂ differenziert aus.

Insgesamt lagen die Ergebnisse der HGP-Zellen näher beieinander. Auf jede Zelllinie einzeln bezogen sind die Ergebnisse der SA- β -Galaktosidase-Färbung und der Enzymaktivitätsmessung nicht konsistent. Dabei ist anzumerken, dass die Bestimmungen jeweils aus nur einem Versuchsansatz erfolgten. Im Mittel ergibt sich jedoch eine ähnliche Tendenz.

Zusammenfassung:

Der Anteil der SA- β -Galaktosidase-Aktivität stieg mit der Zellalterung an. Dabei wiesen Progerie-Zellen von vornherein höhere Enzymaktivitäten auf als die Kontrollzellen. Die Immortalisierung reduzierte den Anteil SA- β -Galaktosidase-positiver Zellen wieder. Immortalisierte Progerie-Zellen zeigten dabei ähnlich hohe Enzymaktivitäten auf wie die Kontrollzellen. H₂O₂ führte überwiegend zu einem Anstieg der SA- β -Galaktosidase-Aktivität. Größte Ausnahme bildeten dabei die frisch immortalisierten Zellen.

3.3 Western Blot Analyse

Die Proteinexpressionen wurden vergleichend zu den niedrig passagären, nicht mit H₂O₂ behandelten Zellen betrachtet. Die Semi-Quantifizierung erfolgte in willkürlichen Einheiten (arbitrary units, AU)

Signifikanzen sind nur zwischen primären nicht gestressten Zellen in niedriger Passage und primären nicht gestressten Zellen in hoher Passage ermittelt wurden, sowie signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und Progerie.

3.3.1 Gesamt-Akt und phosphoryliertes Akt

Abb. 8 zeigt die Western-Blot-Analyse des Gesamt-Akts für die Kontroll- und die Progerie-Zellen.

Replikativ gealterte Kontrollzellen wiesen eine Proteinmenge von 0,4 AU (SD 0,23) auf, was einen Rückgang von 60% entspricht. Dieses Ergebnis stellte sich als signifikant dar.

Kurz nach der Immortalisierung zeigten alle Kontrollzelllinien einen Anstieg des Akts auf 1,06 AU (SD 0,55). Die große Standardabweichung beweist große interindividuelle Unterschiede zwischen den frisch-immortalisierten Fibroblasten. Immortalisierte Zellen in hoher

Passage dieser Zelllinien zeigten mit 0,7 AU (SD 0,09) leicht geringere Akt-Proteinkonzentrationen als die primären nicht gestressten Zellen in niedriger Passage. Somit konnte gezeigt werden, dass durch Immortalisierung der Einfluss des Altern erwartungsgemäß reduziert wurde.

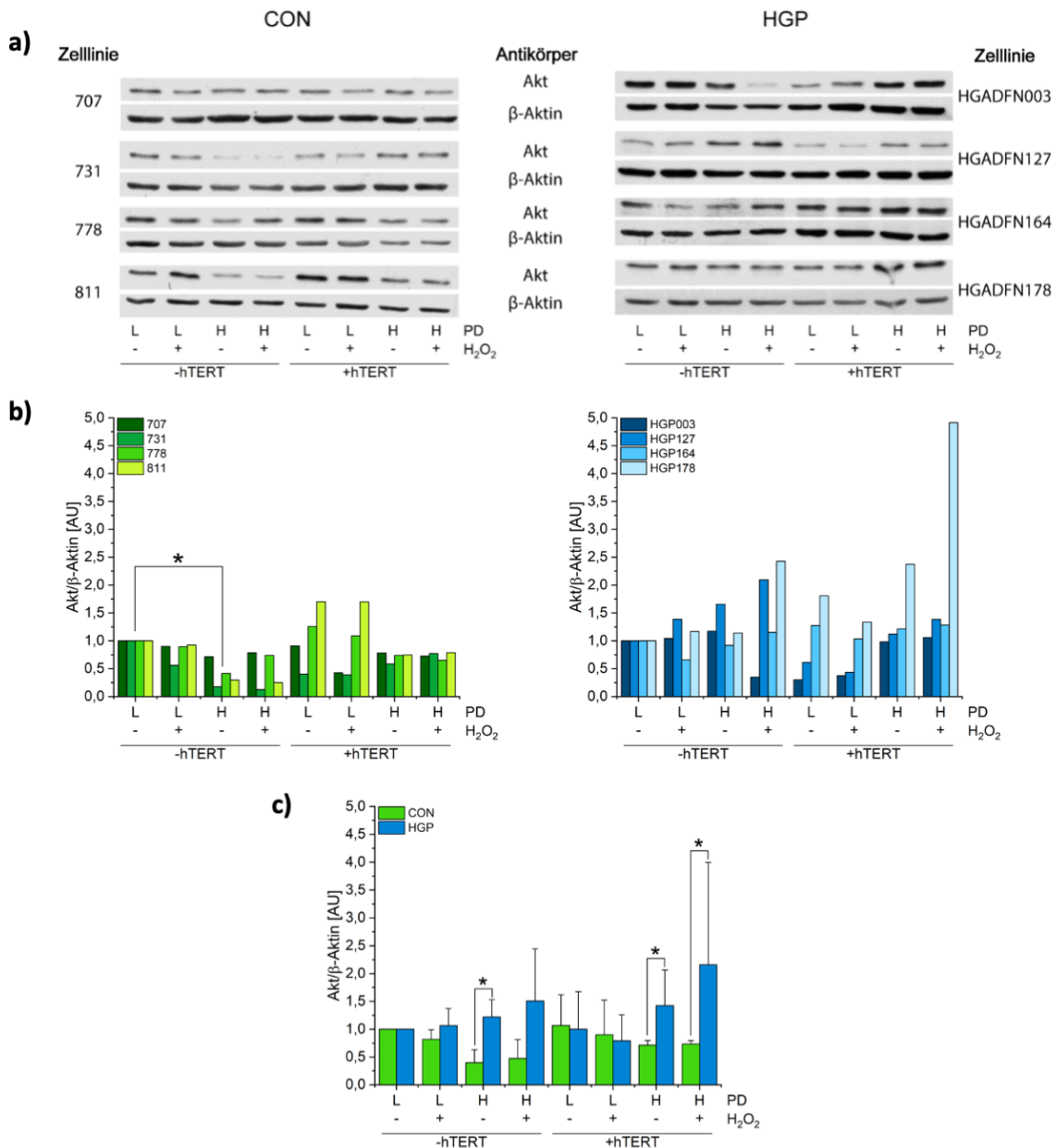


Abb. 8: Western-Blot-Analyse der relativen Gesamt-Akt-Mengen in Kontroll- und Progerie-Fibroblasten.

a) Darstellung der Western Blots mit Normalisierung auf β -Aktin. b) Semi-Quantifizierung der Western-Blot-Analyse der einzelnen Zelllinien. Als Bezugswert gelten die primären, nicht gestressten Zellen in niedriger PD c) Mittelwerte der Semi-Quantifizierung der Kontroll- und Progerie-Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. N=4, * $p < 0,03$, Mann-Whitney-U-Test (exakte 2-seitige Signifikanz). Dargestellt sind nur Signifikanzen zwischen Kontrollen und Progerie. (AU: Arbitrary Unit; grün: Kontrollzelllinien, blau: HGP-Zelllinien; L: niedrige PD, H: hohe PD, -hTERT: primäre Zellen, +hTERT: mit hTERT immortalisierte Zellen)

Im Gegensatz zu den Kontrollzellen konnte bei den Progerie-Zellen mit 1,22 AU (SD 0,31) ein Anstieg der Akt-Konzentration bei primären Zellen in hoher PD nachgewiesen werden. Nach der Immortalisierung reagierten die Zellen sehr heterogen. Bei den frisch immortalisierten Zellen wiesen HGP003 und HGP127 verminderte Proteinmengen auf, HGP164 und HGP178 erhöhte Mengen, sodass ein Mittelwert von 1,0 AU mit einer Standardabweichung von 0,67 erreicht wurde. Mit größerem zeitlichem Abstand zur Immortalisierung zeigten 3 der 4 Zelllinien Akt-Konzentrationen nahe dem Referenzzustand. Die Zelllinie HGP178 wies hingegen einen Anstieg des Gesamt-Akts auf 4,9 AU auf. Der Mittelwert über alle Progerie-Zelllinien lag hier bei 1,42 AU (SD 0,64). Auch hier waren große interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien zu erkennen.

Die Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid gab weder bei Kontrollen noch bei der Progerie einen Hinweis auf eine mögliche einheitliche Wirkung auf Akt.

Abb. 9 stellt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse des phosphorylierten Akts dar. Hier fand sich eine signifikante Reduktion des Phospho-Akts in Kontrollzellen höherer Passagen (0,02 AU (SD 0,02)) im Vergleich zu den Kontrollzellen niedriger Passage (1,0 AU). Nach der Immortalisierung stieg das phosphorylierte Akt in unterschiedlichem Ausmaß wieder an (1,09 AU; SD 1,7). Die immortalisierten Kontrollzellen in hoher PD wiesen dabei eine weitere Zunahme des Phospho-Akts (1,56 AU; SD 0,87) im Vergleich zu den Zellen in niedrigen PDs auf.

Auch in den Progerie-Zellen sank der Proteingehalt des phosphorylierten Akts signifikant auf 0,4 AU (SD 0,2). Dabei ist die Abnahme des phosphorylierten Akts in den Progerie-Zelllinien signifikant geringer als bei den Kontrollzelllinien. Nach der Immortalisierung stieg das Phospho-Akt auch bei den Progerie-Zellen wieder an (niedrige PD 0,78 AU (SD 0,66); hohe PD 1,08 AU (SD 0,77)). Somit zeigte sich auch bei den Progerie-Zelllinien, sodass die Immortalisierung zur Rücknahme der Down-Regulation von phosphoryliertem Akt führte.

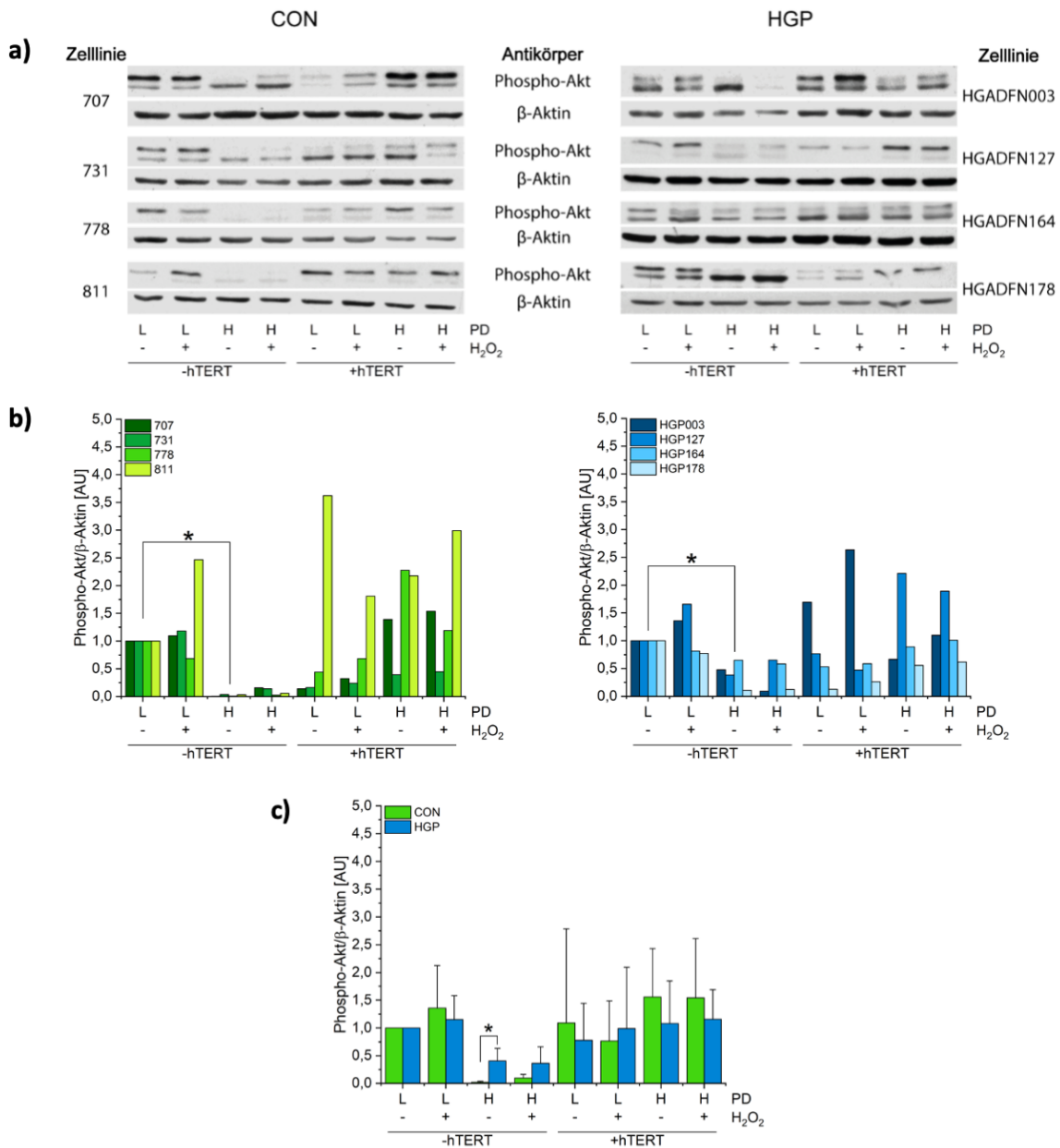


Abb. 9: Western-Blot-Analyse der relativen Phospho-Akt-Mengen in Kontroll- und Progerie-Fibroblasten.

a) Darstellung der Western Blots mit Normalisierung auf β -Aktin. b) Semi-Quantifizierung der Western-Blot-Analyse der einzelnen Zelllinien. Als Bezugswert gelten die primären, nicht gestressten Zellen in niedriger PD c) Mittelwerte der Semi-Quantifizierung der Kontroll- und Progerie-Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. $N=4$, $*p<0,03$, Mann-Whitney-U-Test (exakte 2-seitige Signifikanz). Dargestellt sind nur Signifikanzen zwischen Kontrollen und Progerie. (AU: Arbitrary Unit; grün: Kontrollzelllinien, blau: HGP-Zelllinien; L: niedrige PD, H: hohe PD, -hTERT: primäre Zellen, +hTERT: mit hTERT immortalisierte Zellen)

3.3.2 Gesamt-mTOR und phosphoryliertes mTOR

In Abb. 10 sind die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse des Gesamt-mTOR-Proteins von Kontroll- und Progerie-Zellen dargestellt.

mTOR, als Down-Stream-Protein des Akts, zeigte sich, wie erwartet, bei allen Kontrollzellen in hoher Passage (mit 0,34 AU; SD 0,17) im Vergleich zu denen in niedriger Passage (mit 1,0 AU)

signifikant vermindert. Nach Immortalisierung stieg Gesamt-mTOR in unterschiedlichem Ausmaß wieder an (MW 0,93 AU; SD 0,50). Bei den Langzeit-immortalisierten Kontrollzellen wiesen drei von vier Zelllinien leicht höhere mTOR-Level auf als die jungen primären Kontrollzellen. Im Mittel ergab sich ein Wert von 1,02 AU (SD 0,34).

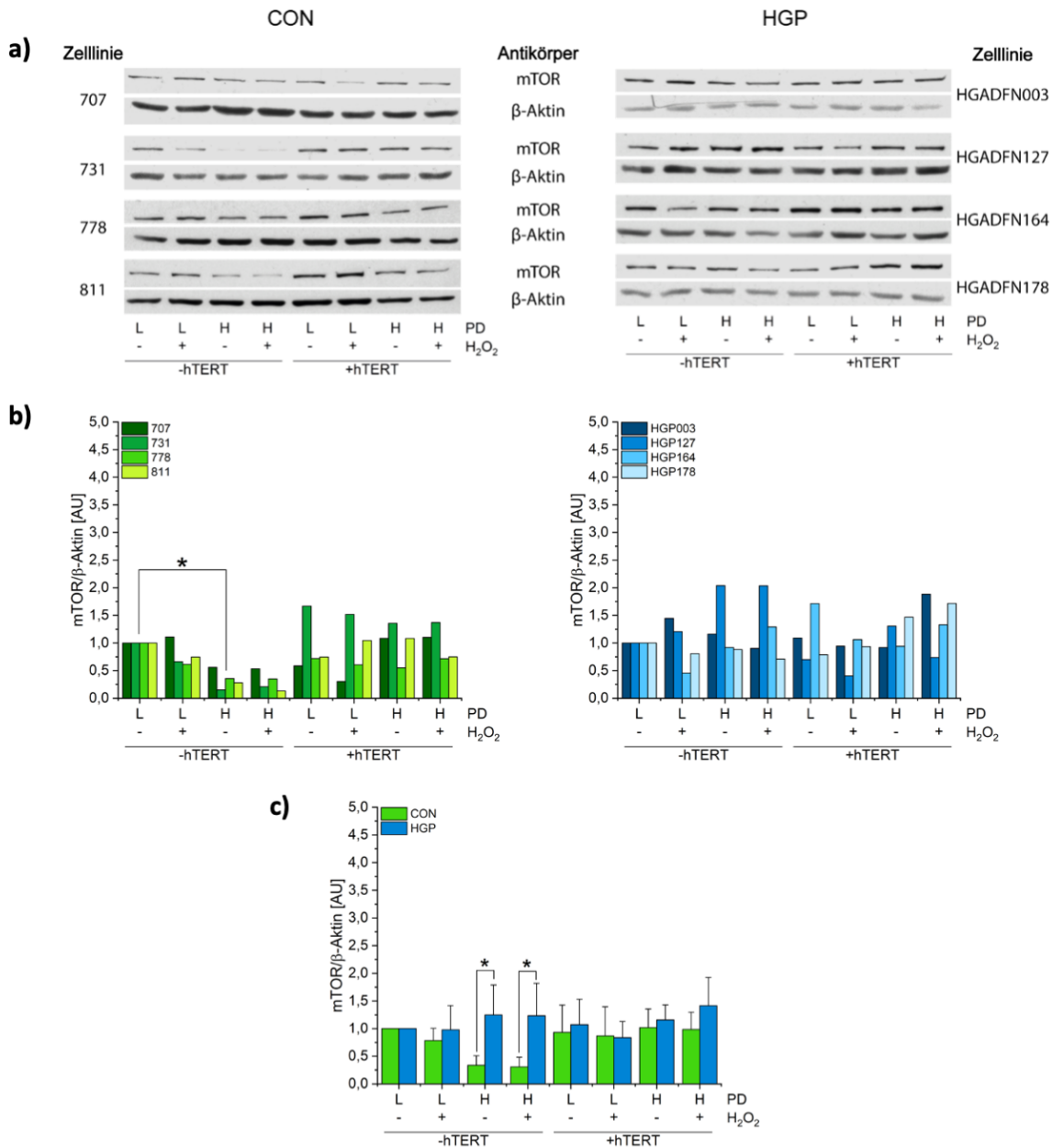


Abb. 10: Western-Blot-Analyse der relativen Gesamt-mTOR-Mengen in Kontroll- und Progerie-Fibroblasten.

a) Darstellung der Western Blots mit Normalisierung auf β -Aktin. b) Semi-Quantifizierung der Western-Blot-Analyse der einzelnen Zelllinien. Als Bezugswert gelten die primären, nicht gestressten Zellen in niedriger PD c) Mittelwerte der Semi-Quantifizierung der Kontroll- und Progerie-Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. N=4, * $p < 0,03$, Mann-Whitney-U-Test (exakte 2-seitige Signifikanz). Dargestellt sind nur Signifikanzen zwischen Kontrollen und Progerie. (AU: Arbitrary Unit; grün: Kontrollzelllinien, blau: HGP-Zelllinien; L: niedrige PD, H: hohe PD, -hTERT: primäre Zellen, +hTERT: mit hTERT immortalisierte Zellen)

Die HGP-Zellen in höherer PD zeigten im Gegensatz zu den Kontrollzellen gleichbleibend bzw. erhöhte Gesamt-mTOR-Level (MW 1,25 AU; SD 0,54), sodass sich hier ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Progerie-Zellen ergab. Die immortalisierten HGP-Zellen stellten sich ähnlich unterschiedlich wie die Kontrollzellen dar. Tendenziell war bei den immortalisierten HGP-Zellen ähnlich viel bzw. etwas mehr Gesamt-mTOR vorhanden als bei jungen primären HGP-Zellen, aber im Mittel weniger als bei primären HGP-Zellen in hoher PD (niedrige Passage nach Immortalisierung MW 1,00 AU, SD 0,67, hohe Passage nach Immortalisierung MW 1,42 AU, SD 0,64)

Ein einheitlicher Effekt von H₂O₂ auf den Gesamt-mTOR-Gehalt ist nicht zu beobachten.

Abb. 11 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse des phosphorylierten mTORs bei Kontrollen und Progerie. Bei den Kontrollzellen in hoher PD war eine deutliche Reduktion des Gehaltes an phosphorylierten mTOR auf einen Wert von 0,26 AU (SD 0,03) zu erkennen. Kurz nach der Immortalisierung war ein Anstieg bei drei von vier Zelllinien zu beobachten, sodass im Mittel ein Wert von 0,68 AU (SD 0,42) erreicht wurde. Lange nach der Immortalisierung wiesen alle Kontrollzelllinien Konzentrationen an phosphoryliertem mTOR auf, die ähnlich der primären Zellen in niedriger PD waren (MW 1,09 AU, SD 0,31).

Bei den Progerie-Zellen in hoher Passage war, wie auch beim Gesamt-mTOR, ein Anstieg bzw. keine Veränderung des phosphorylierten mTORs zu sehen. Es ergab sich ein Mittelwert von 1,41 AU (SD 0,66). Kurz nach der Immortalisierung lag der Gehalt an phosphoryliertem mTOR mit 1,10 AU (SD 0,38) auf ähnlichem Niveau wie die primären Progerie-Zellen in niedriger Passage. Langzeit-immortalisierte HGP-Zellen wiesen mit Ausnahme der Zelllinien HGP164 höhere Konzentrationen an phosphorylierten mTOR auf, sodass sich im Mittel ein Wert von 1,33 AU (SD 0,59) ergab.

Wasserstoffperoxid führte auch beim phosphoryliertem mTOR zu keinen einheitlichen Effekten bezüglich der Proteinmenge.

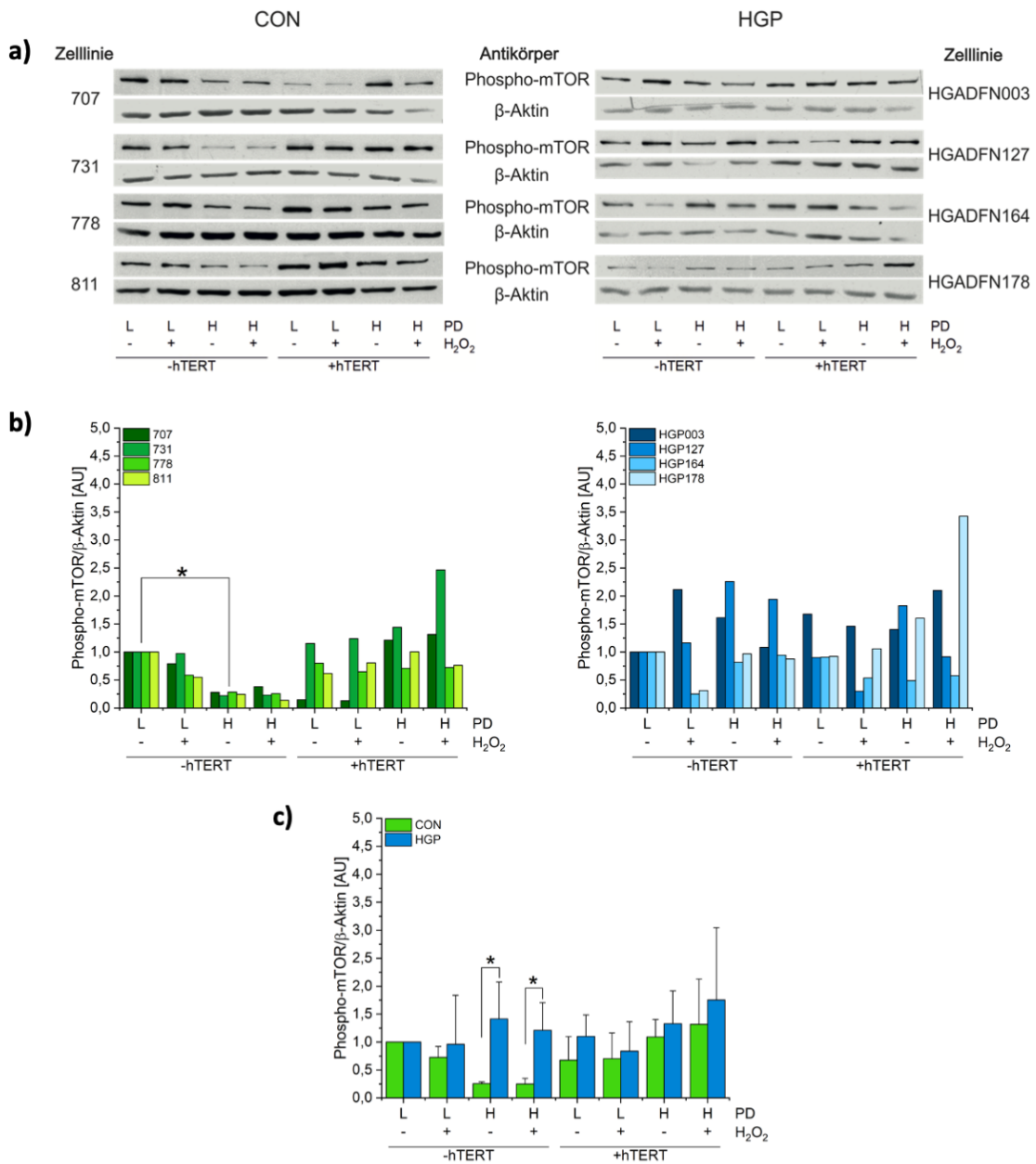


Abb. 11: Western-Blot-Analyse der relativen Phospho-mTOR-Mengen in Kontroll- und Progerie-Fibroblasten.

a) Darstellung der Western Blots mit Normalisierung auf β-Aktin. b) Semi-Quantifizierung der Western-Blot-Analyse der einzelnen Zelllinien. Als Bezugswert gelten die primären, nicht gestressten Zellen in niedriger PD c) Mittelwerte der Semi-Quantifizierung der Kontroll- und Progerie-Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. N=4, *p<0,03, Mann-Whitney-U-Test (exakte 2-seitige Signifikanz). Dargestellt sind nur Signifikanzen zwischen Kontrollen und Progerie. (AU: Arbitrary Unit; grün: Kontrollzelllinien, blau: HGP-Zelllinien; L: niedrige PD, H: hohe PD, -hTERT: primäre Zellen, +hTERT: mit hTERT immortalisierte Zellen)

3.3.3 Gesamt-p70 und phosphoryliertes p70

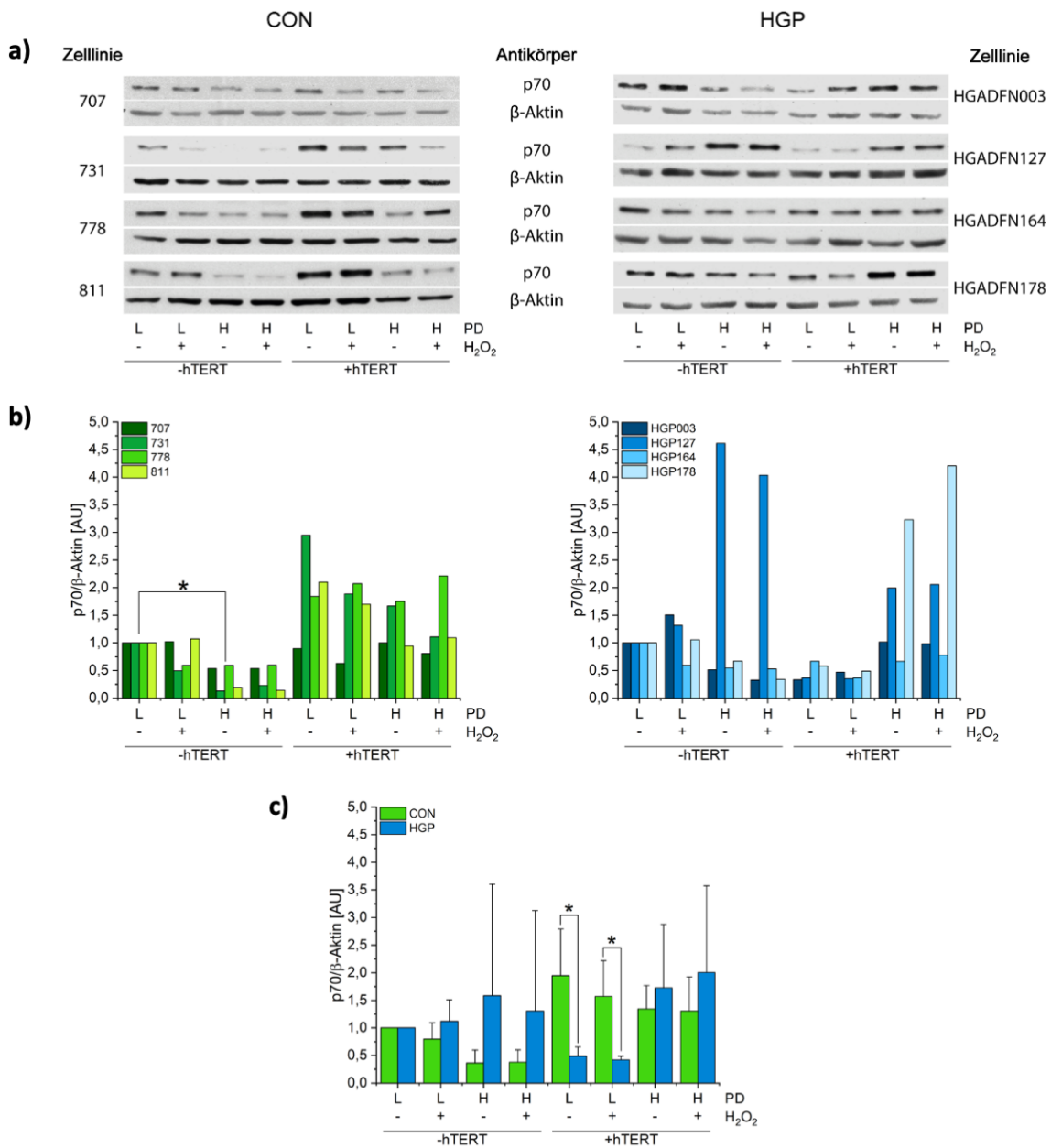


Abb. 12: Western-Blot-Analyse der relativen Gesamt-p70-Mengen in Kontroll- und Progerie-Fibroblasten.

a) Darstellung der Western Blots mit Normalisierung auf β -Aktin. b) Semi-Quantifizierung der Western-Blot-Analyse der einzelnen Zelllinien. Als Bezugswert gelten die primären, nicht gestressten Zellen in niedriger PD c) Mittelwerte der Semi-Quantifizierung der Kontroll- und Progerie-Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. $N=4$, $*p<0,03$, Mann-Whitney-U-Test (exakte 2-seitige Signifikanz). Dargestellt sind nur Signifikanzen zwischen Kontrollen und Progerie. (AU: Arbitrary Unit; grün: Kontrollzelllinien, blau: HGP-Zelllinien; L: niedrige PD, H: hohe PD, -hTERT: primäre Zellen, +hTERT: mit hTERT immortalisierte Zellen)

In Abb. 12 sind die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse für Gesamt-p70 der Kontroll- und Progerie-Zellen abgebildet. Alle primären Kontrollzellen in hoher Passage wiesen mit 0,06 AU (SD 0,06) eine signifikant niedrigere Gesamt-p70-Konzentration auf als ihre entsprechenden primären jungen Kontrollzellen.

Kurz nach der Immortalisierung konnten wieder höhere Mengen an Gesamt-p70 nachgewiesen werden. Diese stellten mit einem Mittelwert von 1,95 AU (SD 0,84) fast eine Verdopplung der Proteinmenge der primären jungen Zellen dar, jedoch mit großen interindividuellen Schwankungen. In hoher PD nach Immortalisierung waren die Unterschiede weniger stark ausgeprägt und näherten sich mit einem Mittelwert von 1,34 AU und einer Standardabweichung von 0,43 dem Wert der primären Kontrollzellen niedriger PD an.

Bei den Progerie-Zellen in hoher Passage zeigten drei von vier Zelllinien eine Reduktion der Gesamt-p70-Konzentrationen an. HGP127 scheint eine Ausnahme mit einem Wert von 4,61 AU zu bilden. Der Mittelwert aller vier HGP-Zelllinien betrug 1,59 (SD 2,02); lässt man HGP127 heraus, ergibt sich ein Mittelwert von 0,57 AU.

Im Gegensatz zu den Kontrollzelllinien blieben die Gesamt-p70-Konzentrationen kurz nach der Immortalisierung mit 0,48 AU (SD 0,16) auf einem ähnlich niedrigen Niveau wie bei den primären alten Zellen. Auch HGP127 verhielt sich hier wie die anderen Zelllinien. Lange nach der Immortalisierung zeigen sich die Progerie-Zelllinien sehr heterogen, wobei alle Zelllinien höhere Gesamt-p70-Konzentrationen aufwiesen als die frisch immortalisierten Zellen der entsprechenden Linie (MW 1,72 AU; SD 1,15). Dabei zeigten sie im Mittel einen höheren Gesamt-p70-Gehalt als die primären Progerie-Zellen in niedriger PD.

Im direkten Vergleich zeigten die frisch immortalisierten Kontrollzelllinien signifikant höhere Werte als die Progerie-Zelllinien.

Die mit H₂O₂ behandelten Zellen verhielten sich bezüglich der Gesamt-p70-Konzentration ähnlich wie ihre nicht gestressten Partner.

Abb. 13 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse des phosphorylierten p70 in Kontroll- und Progerie-Zellen an.

Auch hier zeigte sich ein Abfall der Konzentration bei primären alten Kontrollzellen auf 0,16 AU (SD 0,11). Bei den frisch immortalisierten Zellen wiesen zwei Zelllinien nur eine leichte Veränderung nach oben (707: 0,45 AU) bzw. nach unten (731: 0,04 AU) im Vergleich zu den primären Kontrollen in hoher PD auf, während die anderen zwei Zelllinien einen deutlichen Anstieg der Phospho-p70-Konzentration aufzeigten (778: 2,62 AU; 811: 2,82 AU). Der Mittelwert lag hier bei 1,49 AU mit einer entsprechend großen Standardabweichung von 1,44. Bei der Zelllinie 731 konnten auch bei Langzeit-immortalisierten Zellen nur geringe Konzentrationen von 0,18 AU an phosphoryliertem p70 nachgewiesen werden, während es einen deutlichen Anstieg in der Zelllinie 707 auf 3,25 AU gab. Bei den Zelllinien 778 und 811 ist eine

Reduktion des Phospho-p70-Gehaltes auf 2,51 bzw. 1,93 AU zu beobachten. Somit ergab sich ein Mittelwert von 1,97 AU mit einer Standardabweichung von 1,31.

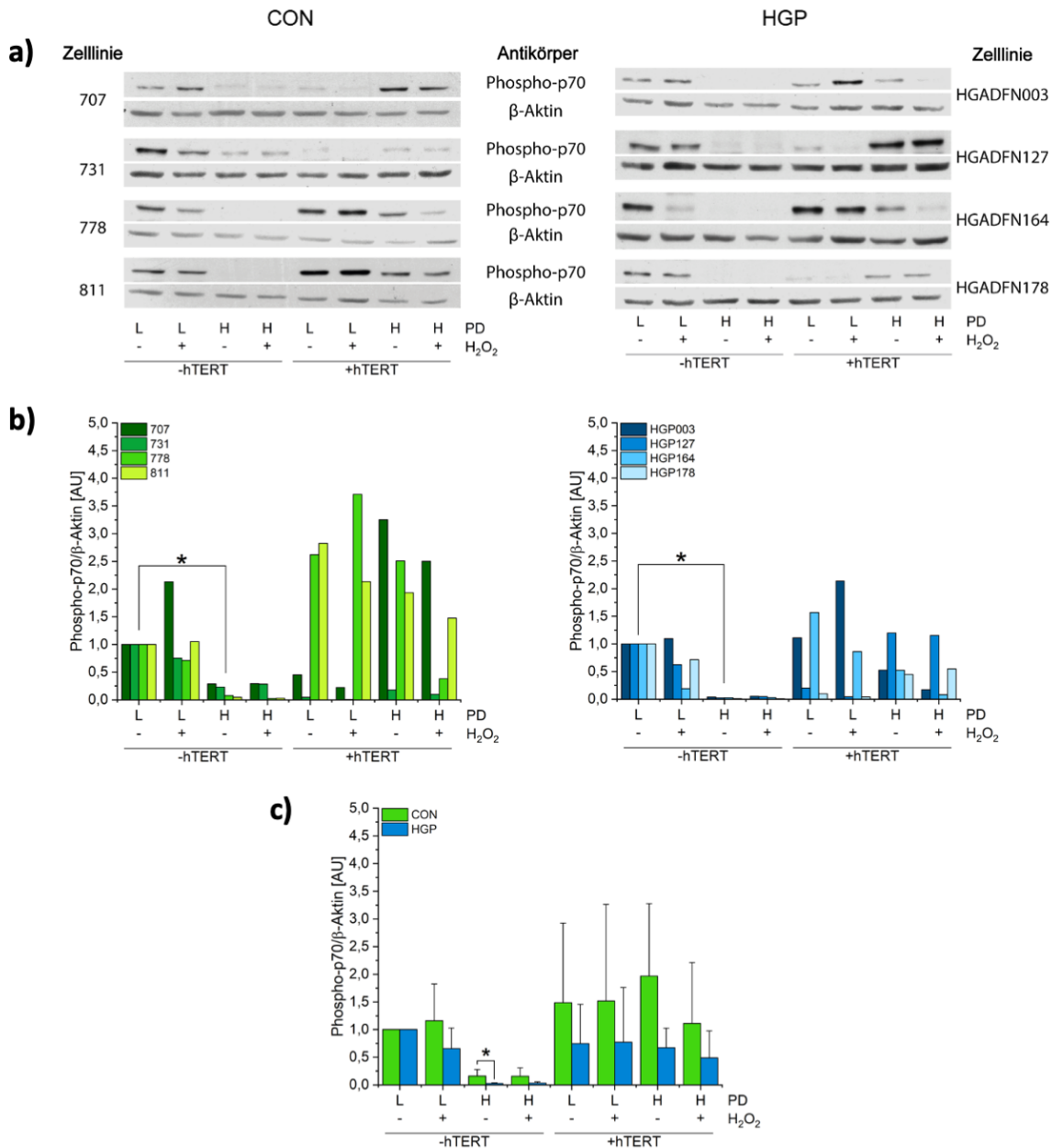


Abb. 13: Western-Blot-Analyse der relativen Phospho-p70-Mengen in Kontroll- und Progerie-Fibroblasten.

a) Darstellung der Western Blots mit Normalisierung auf β -Aktin. b) Semi-Quantifizierung der Western-Blot-Analyse der einzelnen Zelllinien. Als Bezugswert gelten die primären, nicht gestressten Zellen in niedriger PD c) Mittelwerte der Semi-Quantifizierung der Kontroll- und Progerie-Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. N=4, *p<0,03, Mann-Whitney-U-Test (exakte 2-seitige Signifikanz). Dargestellt sind nur Signifikanzen zwischen Kontrollen und Progerie. (AU: Arbitrary Unit; grün: Kontrollzelllinien, blau: HGP-Zelllinien; L: niedrige PD, H: hohe PD, -hTERT: primäre Zellen, +hTERT: mit hTERT immortalisierte Zellen)

Bei den Progerie-Zelllinien war ein signifikanter Abfall der Konzentration an phosphoryliertem p70 auf einen mittleren Wert von 0,02 AU mit einer Standardabweichung von 0,01 zu erkennen, auch bei der Zelllinie HGP127, deren Gesamt-p70-Gehalt deutlich über den anderen Progerie-

Zelllinien lag. Kurz nach der Immortalisierung wiesen alle Progerie-Zelllinien einen Anstieg der Phospho-p70-Proteinkonzentration auf (MW 0,75 AU; SD 0,71), wobei HGP003 mit 1,11 AU und HGP164 mit 1,57 AU bis über das Niveau der primären jungen Zellen stiegen. Bei den Zelllinien HGP127 mit 0,20 AU und HGP178 mit 0,10 AU kam es nur zu einem geringen Anstieg bis unter $\frac{1}{4}$ der Referenzkonzentration der primären jungen Fibroblasten.

Die Unterschiede zwischen den Progerie-Zelllinien waren in einer hohen PD nach der Immortalisierung nicht mehr so stark ausgeprägt. Der Proteingehalt an Phospho-p70 lag hier bei 0,67 AU (SD 0,35).

Im direkten Vergleich fiel die Phospho-p70-Konzentration signifikant stärker bei primären Progerie-Zellen in hoher Passage als bei den entsprechenden Kontrollfibroblasten.

H₂O₂ hatte auch hier keinen einheitlichen Effekt auf die Proteinexpression, allerdings ist eine Tendenz zu leicht verminderten Konzentrationen bei gestressten Zellen zu erkennen.

3.3.4 Gesamt-ULK1 und phosphoryliertes ULK1

In Abb. 14 sind die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse des Gesamt-ULK1 in Kontroll- und Progerie-Zellen dargestellt.

Wie auch in den up-stream-Proteinen mTOR und Akt zeigte sich bei allen primären Kontrollzellen in hoher Passage eine signifikante Reduktion der Gesamt-ULK1-Konzentration auf 0,06 AU (SD 0,06) im Vergleich zu den primären Kontrollzellen in niedriger Passage. Kurz nach der Immortalisierung wiesen alle Kontrolllinien einen Anstieg der Konzentration auf 0,70 AU (SD 0,52) auf, wobei die Zelllinie 707 nur einen sehr geringen Anstieg aufwies (0,19 AU) und die Zelllinie 811 einen deutlichen Anstieg über das Niveau der primären jungen Zellen anzeigte (1,41 AU). In hoher PD nach Immortalisierung verhielt es sich umgekehrt: 707 zeigte mit 1,13 AU einen Anstieg über das Niveau der primären Referenzzellen. 811 lag mit 0,12 AU deutlich unter dem Niveau der primären und frisch-immortalisierten Zellen in niedriger PD. Im Mittel waren die Werte mit 0,66 AU (SD 0,47) vergleichbar mit den frisch-immortalisierten Kontrollen.

Die Konzentrationen an Gesamt-ULK1 bei den Progerie-Zellen waren in allen Messpunkten sehr heterogen. Dabei wiesen primäre Progerie-Zellen in hoher Passage im Vergleich zu den primären Referenzzellen ähnliche (HGP003 und HGP164 mit 0,90 bzw. 0,91 AU) bzw. fast verdreifachte (HGP127 und HGP178 mit 3,16 bzw. 2,89 AU) Proteinmengen auf, sodass es im Mittel zu einer vermehrten Proteinexpression von 1,96 AU (SD 1,23) kam.

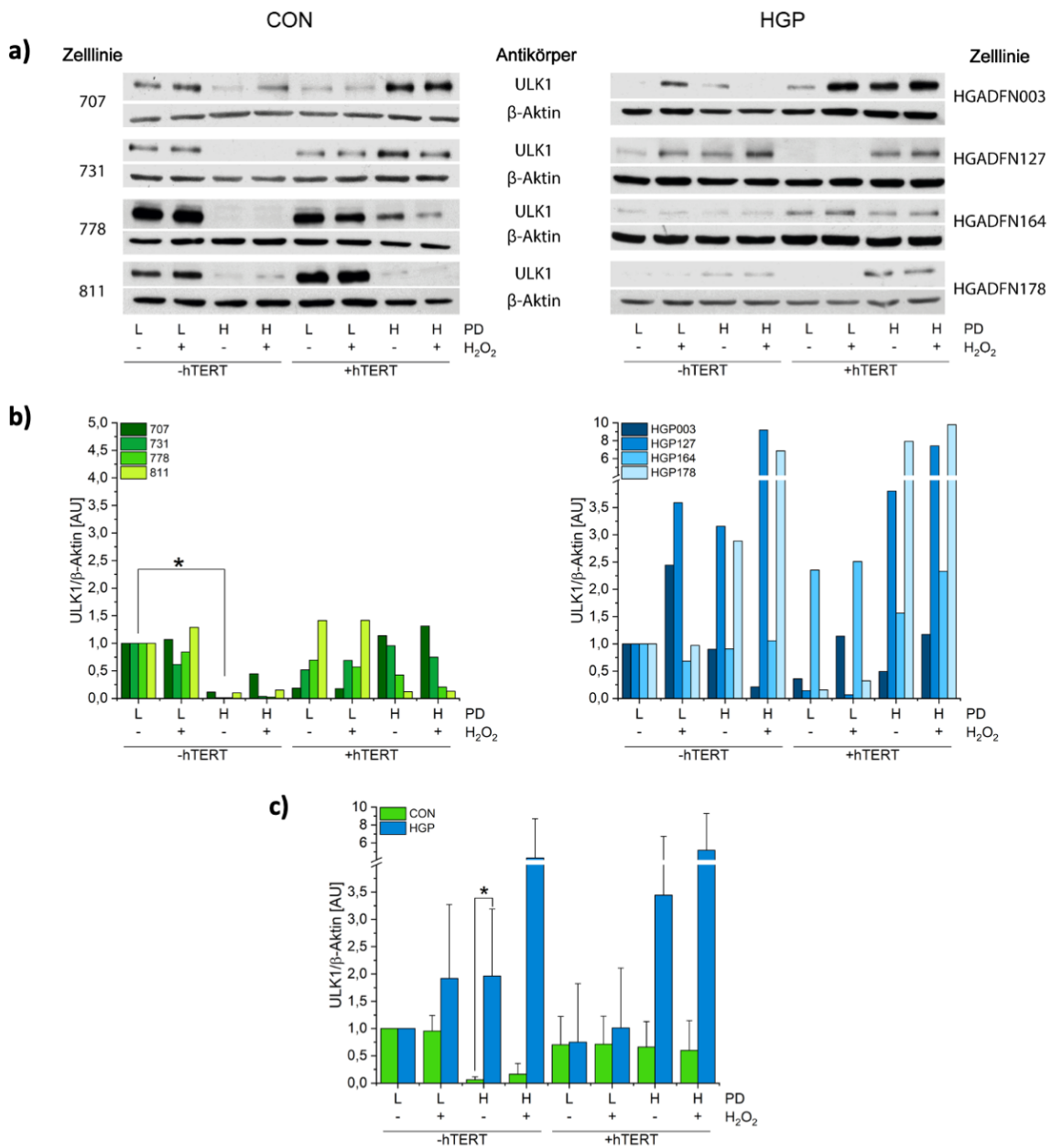


Abb. 14: Western-Blot-Analyse der relativen Gesamt-ULK1-Mengen in Kontroll- und Progerie-Fibroblasten.

a) Darstellung der Western Blots mit Normalisierung auf β -Aktin. b) Semi-Quantifizierung der Western-Blot-Analyse der einzelnen Zelllinien. Als Bezugswert gelten die primären, nicht gestressten Zellen in niedriger PD c) Mittelwerte der Semi-Quantifizierung der Kontroll- und Progerie-Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. $N=4$, $*p<0,03$, Mann-Whitney-U-Test (exakte 2-seitige Signifikanz). Dargestellt sind nur Signifikanzen zwischen Kontrollen und Progerie. (AU: Arbitrary Unit; grün: Kontrollzelllinien, blau: HGP-Zelllinien; L: niedrige PD, H: hohe PD, -hTERT: primäre Zellen, +hTERT: mit hTERT immortalisierte Zellen)

Kurz nach der Immortalisierung wiesen drei der vier Progerie-Zelllinien niedrigere Gesamt-ULK1-Konzentrationen auf als die primären jungen und alten Zellen. Nur bei der Zelllinie HGP164 ist eine Erhöhung der Konzentration an Gesamt-ULK1 auf 2,51 AU im Vergleich zu den primären Zellen zu beobachten. Im Mittel lag die Proteinmenge bei 0,75 AU (SD 1,07).

Während es bei HGP164 in einer hohen PD nach Immortalisierung zu einem leichten Abfall der Gesamt-ULK1-Menge auf 1,56 AU kam, war bei allen anderen Progerie-Zelllinien wiederum ein Anstieg zu erkennen. Die Spannweite lag dabei bei weniger als einer Verdopplung bei der Linie HGP003 (0,49 AU) bis hin zum über 40-fachen der Gesamt-ULK1-Konzentration bei der Linie HGP178 (9,80 AU) im Vergleich zu den frisch immortalisierten Fibroblasten. Damit ergab sich ein Mittelwert von 3,44 AU mit einer Standardabweichung von 3,28.

Aufgrund der großen Heterogenität der Progerie-Zelllinien zeigt sich eine statistisch signifikant höhere Gesamt-ULK1-Konzentration der Progerie-Zellen nur bei den primären alten Zellen.

Auffallend ist, dass die Applikation von H₂O₂ in den allen Messpunkten bei der Progerie im Mittel zu einem Anstieg des Gesamt-ULK1 führte. Eine Reduktion war nur bei HGP164 und HGP178 in niedriger Passage, HGP003 in hoher Passage und HGP127 in niedriger Passage nach Immortalisierung zu sehen. Bei den Kontrollzellen war hingegen keine Tendenz erkennbar.

Abb. 15 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse des phosphorylierten ULK1 in Kontroll- und Progerie-Zellen.

Phospho-ULK1 war im Mittel in den primären Kontrollzellen hoher PD im Vergleich zu den Referenzfibroblasten niedriger PD signifikant erniedrigt mit einem Mittelwert von 0,05 AU (SD 0,07). Dabei waren bei den Fibroblasten der Zelllinien 731 und 778 in hoher Passage nahezu keine Proteinbanden im Blot mehr erkennbar. Kurz nach der Immortalisierung stieg die Konzentration an phosphoryliertem ULK1, abgesehen von der Zelllinie 707, wieder an (MW 0,54 AU; SD 0,67). Wie auch beim Gesamt-ULK1 lag der größte Anstieg nach Immortalisierung bei der Zelllinie 811. Die Proteinkonzentration lag hier über der der primären jungen Referenz (1,45 AU). Lange nach der Immortalisierung lagen die Konzentrationen aller Kontrollen zwischen 20 und 50% der Konzentration der primären Referenzzellen (MW 0,35 AU; SD 0,16).

Die Progerie-Zelllinien wiesen, wie auch beim Gesamt-ULK1, eine große Heterogenität auf. Die primären Progerie-Zellen HGP003, HGP127 und HGP164 in hoher Passage zeigten dabei weniger phosphoryliertes ULK1 als die primären Zellen in niedriger Passage (0,60 AU, 0,98 AU bzw. 0,32 AU). Eine Ausnahme bildete die Zelllinie HGP178 mit einem Anstieg auf 2,65 AU. Die frisch immortalisierten Progerie-Zellen wiesen im Mittel mit 0,37 AU (SD 0,51) die niedrigsten Phospho-ULK1-Konzentrationen auf. Bei den immortalisierten Zellen in hoher PD war bei den Zelllinien HGP127 und HGP178 ein deutlicher Anstieg der Phospho-ULK1-Konzentration auf das Dreifache der primären Zellen in niedriger PD zu erkennen (2,91 bzw. 3,09 AU). Die Zelllinien HGP003 und HGP164 zeigten mit 0,52 bzw. 0,26 AU einen Anstieg im

Vergleich zu den frisch immortalisierten Fibroblasten auf. Im Vergleich zu den primären jungen Referenzzellen lagen sie bei ca. 25-50% des Ausgangswertes.

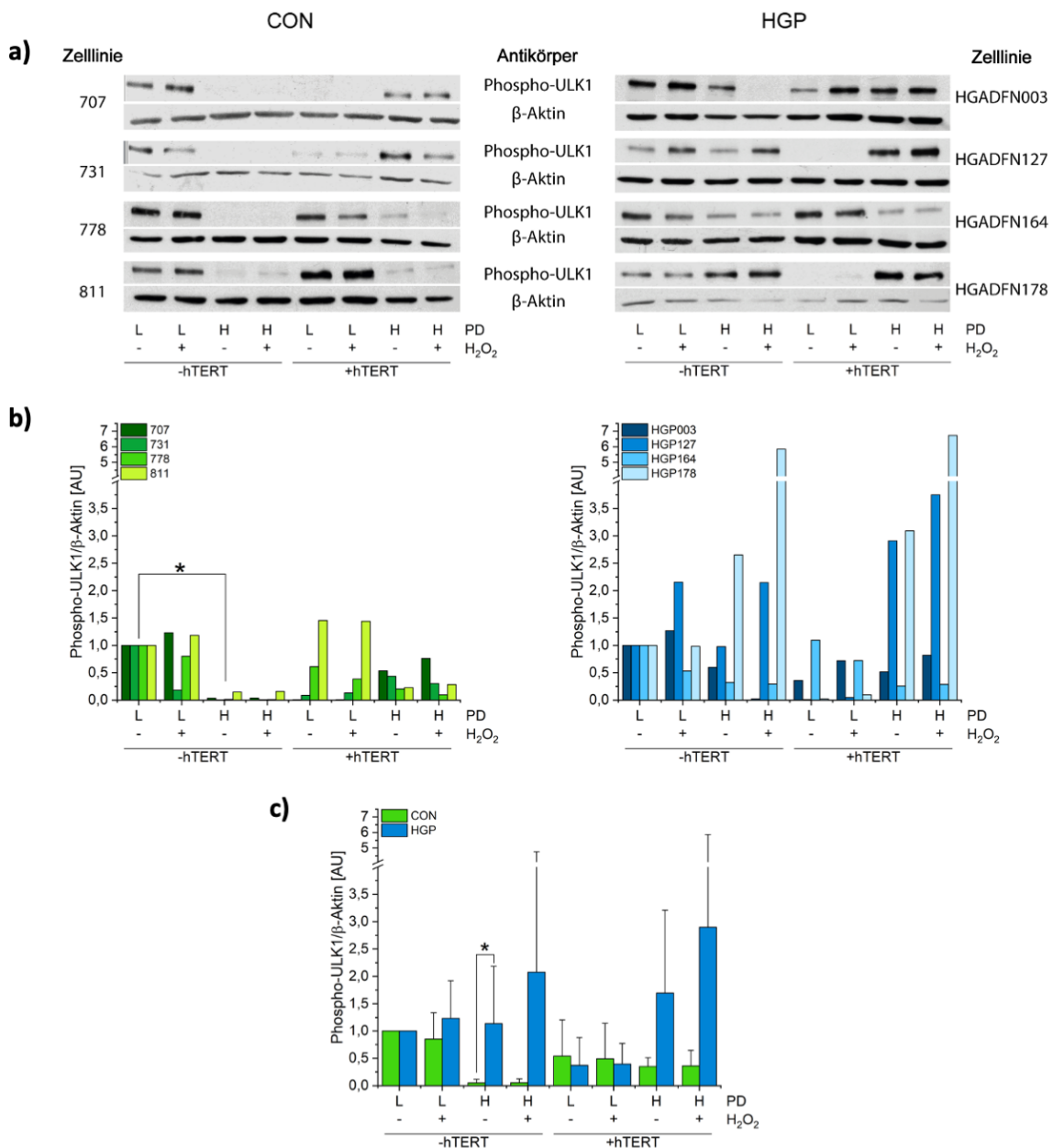


Abb. 15: Western-Blot-Analyse der relativen Phospho-ULK1-Mengen in Kontroll- und Progerie-Fibroblasten.

a) Darstellung der Western Blots mit Normalisierung auf β -Aktin. b) Semi-Quantifizierung der Western-Blot-Analyse der einzelnen Zelllinien. Als Bezugswert gelten die primären, nicht gestressten Zellen in niedriger PD c) Mittelwerte der Semi-Quantifizierung der Kontroll- und Progerie-Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. N=4, * $p < 0,03$, Mann-Whitney-U-Test (exakte 2-seitige Signifikanz). Dargestellt sind nur Signifikanzen zwischen Kontrollen und Progerie. (AU: Arbitrary Unit; grün: Kontrollzelllinien, blau: HGP-Zelllinien; L: niedrige PD, H: hohe PD, -hTERT: primäre Zellen, +hTERT: mit hTERT immortalisierte Zellen)

Während es bei den Kontrollzellen zu einem starken Abfall der Phospho-ULK1-Konzentration in hoher Passage der primären Zellen kam, gab es bei den Progerie-Zellen kaum Veränderungen

bzw. eine deutliche Erhöhung der Proteinmenge, sodass sich hier ein signifikanter Unterschied im Alterungsprozess der beiden Gruppen zeigt.

Wasserstoffperoxid wies auch hier bei den Progerie-Zellen überwiegend einen Anstieg der Phospho-ULK1-Konzentration auf. Bei den Kontrollzellen kommt es eher zu einer geringen Reduktion des ULK1, wobei die Effekte zwischen den Zelllinien heterogen sind.

3.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Western-Blot-Analyse

Bei den Kontrollzellen zeigten sich alle untersuchten Proteine des mTOR-Signalweges im Alter signifikant vermindert exprimiert. Die Immortalisierung dieser Zellen führte im Mittel bei allen untersuchten Proteinen wieder zu einem Anstieg des Proteingehaltes im Vergleich zu den primären Zellen in hoher Passage, wobei das Ausmaß des Anstieges bei den einzelnen Proteinen unterschiedlich war. Auch waren nach der Immortalisierung große interindividuelle Unterschiede zu erkennen. Die Behandlung mit H₂O₂ hatte auf den mTOR-Signalweg hinsichtlich Proteinexpression und Phosphorylierung keinen einheitlichen Einfluss.

Die HGP-Zelllinien zeigten kein einheitliches Bild wie die Kontrollzellen. In den primären Zellen hoher Passage ist das Gesamt-Akt kaum verändert bzw. sogar vermehrt exprimiert, während die für den mTOR-Signalweg relevante aktive Form des Akts vermindert nachgewiesen werden konnte. Gesamt-mTOR und das phosphorylierte mTOR waren in hoher Passage hingegen gleich bzw. stärker vertreten als bei den primären HGP-Zellen in niedriger Passage. Als down-stream-Protein des mTORs war das Gesamt-p70 in primären alten Zellen überwiegend herunterreguliert. Das Phospho-p70 war kaum noch nachweisbar. Als weiteres down-stream-Protein war Gesamt-ULK1 in hoher Passage gleichbleibend bzw. vermehrt nachweisbar, während das phosphorylierte ULK1 eher vermindert nachgewiesen werden konnte, wobei es deutliche Unterschiede zwischen den Progerie-Zellen gab. Die Immortalisierung der Progerie-Zellen zeigte bei den AKT- und mTOR-Proteinen wenig Effekte. Beim Gesamt-p70 wiesen erst die Langzeit-immortalisierten Zellen ein Anstieg der Proteinmenge auf. Das phosphorylierte p70 hingegen konnte nach Immortalisierung sofort wieder vermehrt nachgewiesen werden. Beim Gesamt-ULK1 und Phospho-ULK1 wiesen die frisch immortalisierten Zellen die niedrigsten Proteinmengen auf. Mit größerem Abstand zu Immortalisierung nahmen die ULK1-Proteine wieder zu.

Auch bei den Progerie-Zellen hatte die Behandlung mit H₂O₂ auf den mTOR-Signalweg hinsichtlich Proteinexpression und Phosphorylierung keinen signifikanten oder einheitlichen Einfluss.

3.3.6 Western Blot Analyse der Erwachsenen-Kontrollzelllinie

Die Erwachsenen-Kontrollzelllinie 168 unterschied sich von allen anderen untersuchten Zelllinien. Aufgrund geringer Mengen an Versuchszellen wurde lediglich die Western-Blot-Analyse durchgeführt. Die Zelllinie hat nur eine begrenzte Aussagekraft und soll in dieser Arbeit nur als möglicher Ausblick für zukünftige Projekte dienen.

Abb. 16 zeigt die Western-Blot-Analyse der Erwachsenen-Kontrollzelllinie 168.

Das Gesamt-Akt steigt in primären alten Zellen deutlich an, das phosphorylierte Akt ist vergleichbar mit dem der primären jungen Zellen. Das phosphorylierte mTOR und das Gesamt-mTOR sind in hoher PD ebenfalls stärker exprimiert als in den primären jungen Zellen. Die Down-Stream-Proteine des mTORs sind sowohl im phosphorylierten Zustand als auch als Gesamt-Protein in primären alten Zellen hochreguliert. Die Immortalisierung weist wieder ein Angleichen an den Zustand der primären jungen Zellen auf, mit Ausnahme des Phospho- und Gesamt-ULK1 in Langzeit-immortalisierten Zellen.

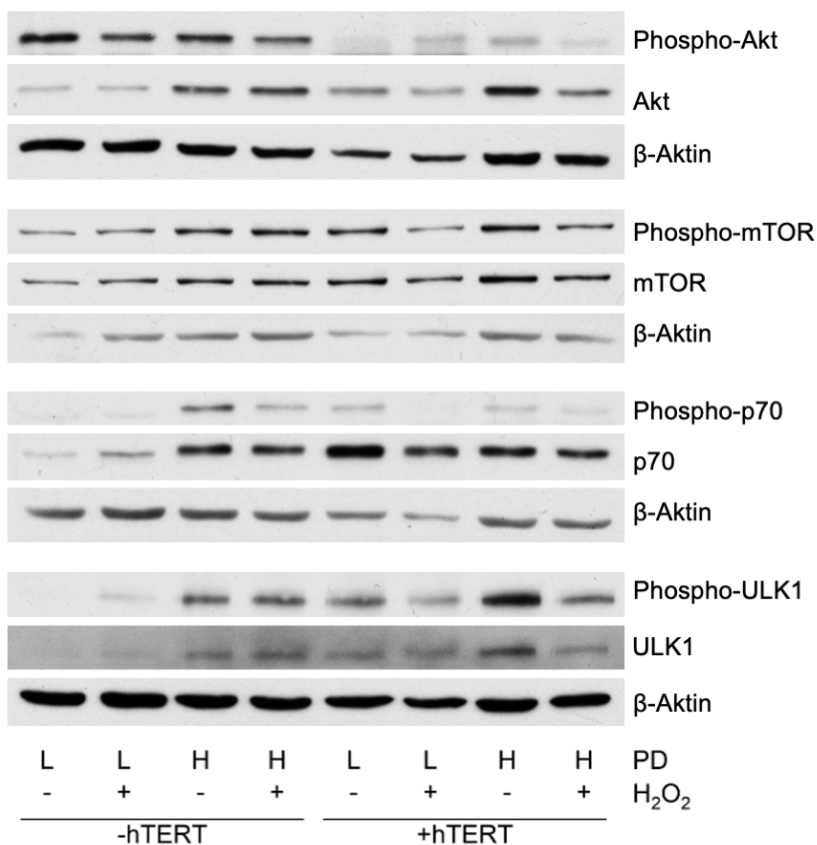


Abb. 16: Western-Blot-Analyse der Erwachsenen-Kontrollzelllinie 168.

Darstellung der Western Blots mit dem entsprechenden β -Aktin. L: niedrige PD, H: hohe PD, - hTERT: primäre Zellen, + hTERT: mit hTERT immortalisierte Zellen

4 Diskussion

Altern ist ein natürlicher Prozess, der durch viele verschiedene Einflussfaktoren bestimmt wird. Die Hutchinson-Gilford-Progerie zeichnet sich durch einen deutlich beschleunigten Alternsprozess aus. Aus diesem Grund dient sie oft als Modell für Untersuchungen des Alterns. Dabei stellt sich die Frage, inwiefern normales Altern und das beschleunigte Altern bei der Progerie Gemeinsamkeiten und Unterschiede aufweisen. In dieser Arbeit wurden dabei einzelne Faktoren des Alterns genauer untersucht: Das Wachstumsverhalten der Zellen in Kultur, die Anzahl der seneszenten Zellen und der mTOR-Signalweg zu unterschiedlichen Zeitpunkten und unter verschiedenen Bedingungen.

4.1 Diskussion der Methodik

Die Untersuchungen erfolgten an Fibroblasten von Kindern ohne bekannte genetische Erkrankungen als Kontrollgruppe und an Fibroblasten von an Hutchinson-Gilford-Progerie erkrankten Kindern. Um Alternseffekte, die während des Alterns des Organismus auftreten, zu vermeiden, wurden Kinderzellen aus der gleichen Altersgruppe <10 Jahre verwendet. Untersucht wurden Zellen, die ohne zusätzliche Beeinflussung in Kultur gebracht wurden und sich immer weiter teilen konnten bis zum Stadium der replikativen Seneszenz.

Mit jeder Zellteilung kommt es zu einer Verkürzung der Telomere [15,17]. Somit dienen die Zellen in niedriger PD nicht nur als Gruppe der jungen Zellen, sondern gleichzeitig auch als Vergleichsgruppe mit langen Telomeren. Die Zellen in einer hohen PD entsprachen alten Zellen und waren somit die Vergleichsgruppe mit kurzen Telomeren. Um den Einfluss der Telomere noch genauer zu untersuchen, wurden alle Zelllinien mithilfe von hTERT künstlich immortalisiert und gleichzeitig deren Telomere stabilisiert und damit theoretisch verlängert. Eine genaue Messung der Telomerlänge ist im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht erfolgt.

Um Unterschiede zwischen replikativer und stress-induzierter Seneszenz herauszuarbeiten, wurden alle Kulturen zusätzlich mit Wasserstoffperoxid gestresst. Die Heterogenität der in diesem Versuch generierten Daten spricht unter anderem dafür, dass das Versuchsprotokoll besser standardisiert werden muss. Dies ist allerdings bei H_2O_2 als Induktor für oxidativen Stress nur schwer umsetzbar. Zum einen ist H_2O_2 bei Raumtemperatur bzw. $37^\circ C$ nicht sehr stabil, zum anderen hängt die schädigende Wirkung des H_2O_2 als oxidativer Stressor vom Stoffwechselvermögen der Zellen ab. Die Fähigkeit, Sauerstoffradikale zu neutralisieren, scheint in den untersuchten Zellen nicht zu jedem Beobachtungszeitraum vergleichbar zu sein.

Für die zelluläre Seneszenz ist die Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase der am häufigsten verwendete Biomarker. Basis dieser Technik ist, dass seneszente Zellen auf Grundlage eines erhöhten intrazellulären lysosomalen Anteils bei einem pH-Wert von 6 das Substrat X-Gal umsetzen, während normale Zellen nur bei einem pH-Wert von 4,0 – 4,5 diese Enzymaktivität aufweisen [18]. Dabei entsteht aus gelben X-Gal Galaktose und das blaue 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo. Somit steht eine einfache Zellfärbung zur Verfügung [105,106]. Die gefärbten Zellen wurden am Mikroskop ausgewertet. In dieser Arbeit wurden die Zellzählungen von zwei Personen verblindet durchgeführt, die an vorangegangenen Schritten nicht beteiligt waren. Damit verbunden war eine interindividuelle Schwankung der Zählergebnisse zwischen den Untersuchern. Um die Untersuchung zu objektivieren, wurde zusätzlich eine quantitative Methode nach dem Protokoll von Gary und Kindell [105] durchgeführt. Beide Methoden ergeben ähnliche Aussagen. Beim MUG-Assay liegen die Ergebnisse der Zelllinien näher beieinander als bei der manuellen Zellbeurteilung und -zählung. Für die SA- β -Galaktosidase-Färbung wurden sehr kleine Kulturgefäße verwendet, sodass zum Teil nur sehr wenige Zellen für die Bestimmung des Anteils seneszenter Zellen zur Verfügung standen. Das MUG-Assay erfolgte in größeren Petrischalen und damit mit einer größeren Menge an Zellen. In der Färbung zeigten sich die gestressten Zellen häufig kugelförmig. Damit war die Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen in der Mikroskopie deutlich erschwert. Externer Stress mit H_2O_2 zeigte zum Teil gegensätzliche Ergebnisse. Besonders bei den frisch immortalisierten Zellen ist weniger SA- β -Galaktosidase-Aktivität nach Applikation von oxidativem Stress zu beobachten. Dies kann daran liegen, dass die Zellen durch die Immortalisierung insgesamt empfindlicher waren und mehr Zellen direkt in die Apoptose bzw. Nekrose übergegangen sind. Um eine beweiskräftigere Aussage im Methodenvergleich zum Verhalten der Zellen und zu Unterschieden zwischen replikativer und Stress-induzierter Seneszenz zu erhalten, müssen weitere Experimente angeschlossen werden und mit einer Bestimmung des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen ergänzt werden.

Da die Fibroblasten in Kultur insgesamt langsam gewachsen sind, stand nur eine begrenzte Menge an Zellen zur Verfügung. Daher konnte bei der Western-Blot-Analyse für die phosphorylierten Proteine jeweils nur ein Blot ohne Replikate durchgeführt werden. Alle anderen Proteine wurden in 1-3 Western-Blot-Experimenten untersucht. Allen Blots lagen jeweils Aliquots eines Zelllysates aus einem einzelnen Ansatz zu Grunde. Jede Membran mit Nachweis eines phosphorylierten Proteins wurde gestrippt und weiter mit einem Antikörpergemisch inkubiert, sodass bei den Analysen der Proteine des mTOR-Signalweges

mehrere Blots zur Auswertung zur aus dem Zellysats generiert werden konnten. Aus den Daten der Aliquots wurde jeweils ein Mittelwert gebildet. Aus den Daten der Kontroll- und Progerie-Zellen wurde je ein Mittelwert über alle Zelllinien inklusive Standardabweichung gebildet. Da aufgrund der kleinen Gruppengrößen viele statistische Tests nicht anzuwenden waren, wurde für die Auswertung der Mann-Whitney-U-Test als nicht parametrischer Test ohne Normalverteilung als statistisches Testverfahren angewandt. Für den Ergebnisbericht wurde die exakte 2-seitige Signifikanz verwendet.

Nachteil dieser Arbeit ist, dass ein direkter Vergleich der Proteinmengen zwischen Kontrollen und Progerie nicht durchgeführt wurde und die Ergebnisse somit nur bedingt mit anderen Arbeiten im Rahmen von Metaanalysen vergleichbar sind.

Alle Experimente wurden ausschließlich modellhaft *in vitro* durchgeführt und lassen sich somit nur eingeschränkt auf den Organismus übertragen.

4.2 Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten mit gesteigerter Proliferation und verfrühter replikativer Seneszenz

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proliferation der Progerie-Zellen in Kultur gestört ist. Nach 50 Tagen in Kultur war das Wachstum der Progerie-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen um rund 53% ($\pm 35\%$) beschleunigt. Nach 150 Tagen lag der Anstieg der Wachstumskurven nur noch bei 30% ($\pm 31\%$) im Vergleich zu den Kontrollen. Der Wachstumsstopp der Kulturen wurde von den Progerie-Zellen deutlich eher nach im Mittel 37,9 ($\pm 3,9$) PDs und 177 (± 26) Tagen erreicht (CON 51,6 $\pm 10,8$ PDs und 403 (± 129) Tage). Die Ergebnisse decken sich mit der Arbeit von Bridger und Kill, 2004 [107]. Als Grund für die gesteigerte Proliferationsrate bei der Progerie wurde dort die gestörte Interaktion von Lamin A und LAP2 α mit Rb durch das Progerin diskutiert. Lamin A und LAP2 α dienen als Verankerung für das Rb. Bei Fehlen eines oder beider dieser Proteine werde die hemmende Funktion des Rb auf das Zellwachstum unterdrückt und es komme zur gesteigerten Proliferation. [107,108].

Auffallend ist, dass bei den Progerie-Zellen schon in niedrigen PDs ein höherer Anteil seneszenten Zellen nachzuweisen ist (Abb. 6 und Abb. 7). Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass Progerin, einhergehend mit irregulären Zellkernen, Verlust an Heterochromatin und vermehrten Schäden an der DNA, besonders auch an den Telomeren, frühzeitig Seneszenz induziert [54,57,99,100,109,110]. Da HGP-Fibroblasten aufgrund des genetischen Defekts

Progerin exprimieren, genauso wie die Vergleichszellen in hoher Passage [11,98], unterstützen die Ergebnisse der SA- β -Galaktosidase-Färbung und des MUG-Assays dieser Arbeit die Ergebnisse anderer Forscher.

Weiterhin konnte in anderen Studien nachgewiesen werden, dass Zellen von Progerie-Patienten insgesamt kürzere Telomere aufweisen als Kontrollzellen. Der genaue Grund dafür ist noch nicht vollständig geklärt. Die Forscher diskutieren zum einen, dass es in der Situation der Progerie durch den erhöhten Anteil an seneszenten Zellen zu einer Proliferationssteigerung der verbleibenden, nicht seneszenten Zellen kommt, um die Anzahl der seneszenten Zellen zu kompensieren. Somit wird der Prozess der Telomerlängenverkürzung in allen Zellen beschleunigt. Zum anderen wären kürzere Telomere aufgrund vermehrter DNA-Schäden durch Progerin denkbar. Die insgesamt verkürzten Telomere können als Erklärung dafür dienen, dass die Progerie-Zellen so viel früher als die Kinderkontrollzellen in das Stadium der replikativen Seneszenz eintreten [100,111]. Der Zusammenhang zwischen verkürzten Telomeren und verfrühter Seneszenz der Progerie-Zellen wird durch die Ergebnisse aus den Wachstumskurven und der SA- β -Galaktosidase-Bestimmungen dieser Arbeit bestärkt. So konnte die Immortalisierung mit hTERT zu einer deutlichen Steigerung des Überlebens der Zellkulturen sowohl von Kontrollzellen als auch von Progerie-Zellen beitragen. Dies wurde bereits in vorherigen Arbeiten anderer Forscher gezeigt [112,113]. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass durch Immortalisierung der Progerie-Zellen mit hTERT Signalwege, die durch Progerin-induzierte DNA-Schäden ausgelöst wurden und die ansonsten den Eintritt in die Seneszenz auslösten, reduziert wurden [99]. Die Bestimmung des Anteils an seneszenten Zellen nach Immortalisierung, welche eine Reduktion der seneszenten Zellen von 73% auf 34% bei der Progerie und von 40% auf 17% bei den Kontrollen zeigte, fördern den Zusammenhang zwischen Telomeren und der Pathogenese der Hutchinson-Gilford-Progerie.

4.3 Unterschiedliche Regulation des mTOR-Signalweges zwischen Hutchinson-Gilford-Progerie und gesunden Fibroblasten während des replikativen Alterns

mTOR ist eine Proteinkinase, die an vielen Prozessen innerhalb der Zellen beteiligt ist. Eine Aktivierung des mTOR-Signalweges führt zur Proteinbiosynthese, Zellwachstum und Hemmung der Autophagie [28,31]. Viele Studien deuten darauf hin, dass mTOR am Überleben und am Altern des Organismus beteiligt ist [29,52,114–116]. Deswegen wurde der mTOR-Signalweg unter dem Aspekt der replikativen Zellalterung untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es während des replikativen Alterns von Kinderkontrollzellen zu einer signifikant verminderten Proteinexpression aller untersuchten Proteine des mTOR-Signalweges im Vergleich zu Zellen in niedriger PD kam. Am wenigsten Veränderung gab es beim Gesamt-Akt, während das phosphorylierte Akt (Ser473) deutlich vermindert war. Die Phosphorylierung an dieser Stelle wird unter anderem durch den mTORC2 katalysiert [89], sodass dies ein Hinweis darauf ist, dass dieser bei den alten Zellen kaum mehr aktiv ist. Dies gilt es, in weiteren Untersuchungen zu bestätigen, da der verwendete Antikörper nicht zwischen mTORC1 und mTORC2 differenziert. mTOR selbst ist in alten Zellen im Mittel um ca. 70% reduziert, der phosphorylierte Anteil noch etwas mehr (Abb. 10 und Abb. 11). p70 stellte sich genauso dar. Dies passt zu dem Bild der deutlich abgeflachten Wachstumskurve bei primären alten Zellen. Auch unterstützt es die Theorie, dass sich seneszente Zellen im Zellzyklusarrest befinden. Diese Zellen benötigen weniger Ressourcen, denn Zellteilungen und für die damit einhergehende Proteinbiosynthese finden nicht mehr statt [18,20]. Das herunterregulierte Gesamt- und phosphorylierte ULK1 unterstützt die These, dass im Alter die Autophagie-Mechanismen nicht mehr richtig funktionieren und es zur Akkumulation von alten, defekten Proteinen kommt, welche die Zellfunktionen stören können [117].

Die Progerie zeigte keine einheitlich verminderte Aktivität des m-TOR-Signalweges während des Alterns der Zellkultur. Das Gesamt-Akt ist bei Progerie-Zellen in hoher Passage leicht erhöht, während das phosphorylierte Akt (Ser473) auf die Hälfte der jungen Zellen reduziert ist (Abb. 8 und Abb. 9). Hier lässt sich somit auch eine verminderte Aktivität des mTORC2 bei Zellen in einer hohen PD vermuten. Auch das Gesamt- und das phosphorylierte mTOR sind im Gegensatz zu den Kontrollzellen eher erhöht (Abb. 10 und Abb. 11). Im Gegensatz zum mTOR war p70 überwiegend vermindert nachzuweisen. Besonders das phosphorylierte p70 war stark vermindert exprimiert und korreliert auch hier mit einer abgeflachten Wachstumskurve. Die große Diskrepanz zwischen aktiviertem mTOR und nahezu komplett unterdrücktem Phospho-p70 gibt Hinweise darauf, dass p70 durch weitere Prozesse innerhalb der Zelle stark reguliert wird. Gesamt-ULK1 ist bei Progerie-Zellen in hoher PD tendenziell erhöht, während das phosphorylierte ULK1 eher vermindert war im Gegensatz zu den jungen HGP-Zellen (Abb. 14 und Abb. 15). Dies lässt darauf schließen, dass mehr aktives (dephosphoryliertes) ULK1 in den alten Zellen vorhanden war und es somit zu einer erhöhten Autophagie-Aktivität kam. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem der Kontrollzellen, sodass hier diskutiert werden kann, ob eine Art Rescue-Mechanismus bei der Progerie angeschaltet wird.

4.4 Beeinflusst die Telomerlänge den mTOR-Signalweg?

Eine verminderte Aktivität des mTOR-Signalweges in replikativ gealterten Zellen mit kurzen Telomeren ist der Theorie nach sinnvoll, da zu kurze Telomere ihre Funktion als Kappenschutz der DNA bei aktiver Proliferation nicht mehr ausführen können und es zu Informationsverlust bei weiteren Zellteilungen kommen würde [14,15]. Hauptaufgabe des mTOR-Signalweges ist unter anderem die Steuerung von Zellwachstum und Proliferation in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot [28,31]. Durch die Ergebnisse der Kontrollzellen konnte gezeigt werden, dass weitere Mechanismen während des Alterns der Zellkultur in den Signalweg eingreifen, da für alle Zellen in den Experimenten dieser Arbeit permanent ein Überangebot an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren zur Verfügung gestellt wurde. Mit den durchgeführten Experimenten lässt sich ein direkter Einfluss von replikativ verkürzten Telomeren auf den mTOR-Signalweg vermuten. Ein einfacher, linearer Zusammenhang zwischen Telomerlänge und mTOR hingegen ist eher unwahrscheinlich, denn die Immortalisierung mit hTERT führte bei Gesamt-Akt, Gesamt- und Phospho-p70 sowie Phospho-ULK1 zu erhöhten Proteinmengen als bei Langzeit-immortalisierten Zellen mit vermeintlich längeren Telomeren.

Bei der Progerie hingegen war mTOR kaum verändert. Ein direkter Zusammenhang zwischen Telomerlänge und mTOR-Proteinexpression war nicht zu erkennen. Auch beim ULK1 lässt sich kein Zusammenhang zwischen Telomerlänge und Proteinmenge erkennen. Auch waren die Unterschiede hier bei den einzelnen Zelllinien besonders groß. Die replikativ gealterten primären HGP-Zellen mit kurzen Telomeren und die Langzeit-Immortalisierten Zellen mit langen Telomeren zeigten jeweils höhere Proteinmengen an als primäre junge Zellen mit langen Telomeren und frisch immortalisierte Zellen mit im mindesten stabilisierten Telomere. Dies ist ein Hinweis darauf, dass besonders bei Progerie-Zellen Mechanismen auf mTOR einwirken, die einen größeren Einfluss haben als die Telomerlänge. Die Immortalisierung mit hTERT konnte aber den Effekten des replikativen Alterns, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, entgegenwirken.

4.5 Wasserstoffperoxid hat im Vergleich zum replikativen Altern kaum einen Einfluss auf den mTOR-Signalweg.

Über den gesamten mTOR-Signalweg hinweg gab es keine richtungsweisenden Änderungen der Proteinkonzentrationen nach oxidativem Stimulus mit Wasserstoffperoxid, außer bei ULK1 bei Progerie.Zellen. Das kann darauf hindeuten, dass replikative Seneszenz und stress-induzierte Seneszenz nicht gleichsam auf den kompletten mTOR-Signalweg einwirken. Es ist bekannt, dass

unterschiedliche Arten der Seneszenz zu unterschiedlichen Reaktionen in den Zellen führen [18]. Inwieweit mTOR daran beteiligt ist, ist noch Gegenstand der Forschung. Das oxidativer Stress vor allem die Genregulation der Autophagie in vorgeschädigten Zellen beeinflusst, scheint dagegen plausibel.

Im Allgemeinen zeigen seneszente Zellen einen erhöhten Anteil an lysosomalen Inhalten, nachweisbar durch die SA- β -Galaktosidase-Färbung. Diskutiert wird, wie die Ergebnisse der SA- β -Galaktosidase-Aktivität mit der Autophagie-Aktivität korrelieren [18,118].

Die Western-Blot-Analyse des ULK1 von Kontrollen und Progerie zeigen gegenläufige Ergebnisse in der Regulation während des Alterns bei primären Zellen in hoher Passage.

Während die Autophagie (ausgedrückt in der Regulation von ULK1) in Kontrollzellen höherer Passage abnimmt, steigt der Anteil an seneszenten Zellen (nachgewiesen in der SA- β -Galaktosidase-Färbung). In den Progerie-Zellen höherer Passage war dagegen eine Zunahme der SA- β -Galaktosidase als Maß für die Zunahme der Seneszenz ebenfalls assoziiert mit einer gesteigerten ULK1-Expression als Maß für die Zunahme der Autophagie. Hier wäre in weiteren Experimenten zu prüfen, ob Progerie-Zellen durch gesteigerte Autophagie versuchen, dem Alterungsprozess entgegenzuwirken.

4.6 Ist die Alterung von Kinderzellen gleichzusetzen mit der Alterung von Zellen von Erwachsenen?

In der Literatur wird mehrheitlich über eine Hochregulierung des mTOR-Signalweges bei seneszenten Zellen im Alter und bei der Hutchinson-Gilford-Progerie berichtet [29,42,53,114,115,119]. Vereinzelt gibt es aber auch Hinweise über eine Herunterregulierung bei Progerie [86,102,120].

Die Ergebnisse der alternden Zellkultur bei den Kinderkontrollen stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen des erhöhten mTORs während des natürlichen Alterns in den zuvor genannten Arbeiten. Während in dieser Arbeit Fibroblasten von genetisch unauffälligen Kindern genutzt wurden, die dann in Kultur gealtert sind, haben andere Gruppen die Untersuchungen an Zellen durchgeführt, die aus einem bereits gealterten Individuum bzw. aus Modellorganismen entnommen wurden [114,115]. Als Tiermodell der Progerie werden häufig gentechnisch veränderte ZMPSTE24^{-/-}-Mäuse verwendet. Dabei ist die Maus als Modell für das Altern kritisch zu sehen, da Mäuse nicht replikativ altern [121].

Um den Aspekt der in Erwachsenen bereits vorgealterten Zellen nicht ganz außer Acht zu lassen, wurde der mTOR-Signalweg bei einer Erwachsenenzelllinie untersucht. Aufgrund begrenzter Verfügbarkeit dieser Fibroblasten konnte als Experiment nur die Western-Blot-Analyse an der Erwachsenenzelllinie 168 durchgeführt werden und ist deswegen in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Diese zeigt, im kompletten Gegensatz zu den Kinderkontrollzellen, den hochregulierten mTOR-Signalweg in der gealterten primären Zellkultur. Besonders das erhöhte Phospho-p70 sticht heraus, da dies sowohl bei den Kinderkontrollzellen als auch den Progerie-Zellen vermindert nachzuweisen war. Die Progerie ordnet sich demnach mit ihrem teilweise erhöhtem mTOR-Signalweg in replikativ gealterten Fibroblasten zwischen den gesunden Kinderkontrollzellen mit komplett verminderten mTOR-Signalweg und Erwachsenenkontrollzellen mit komplett erhöhtem mTOR-Signalweg ein.

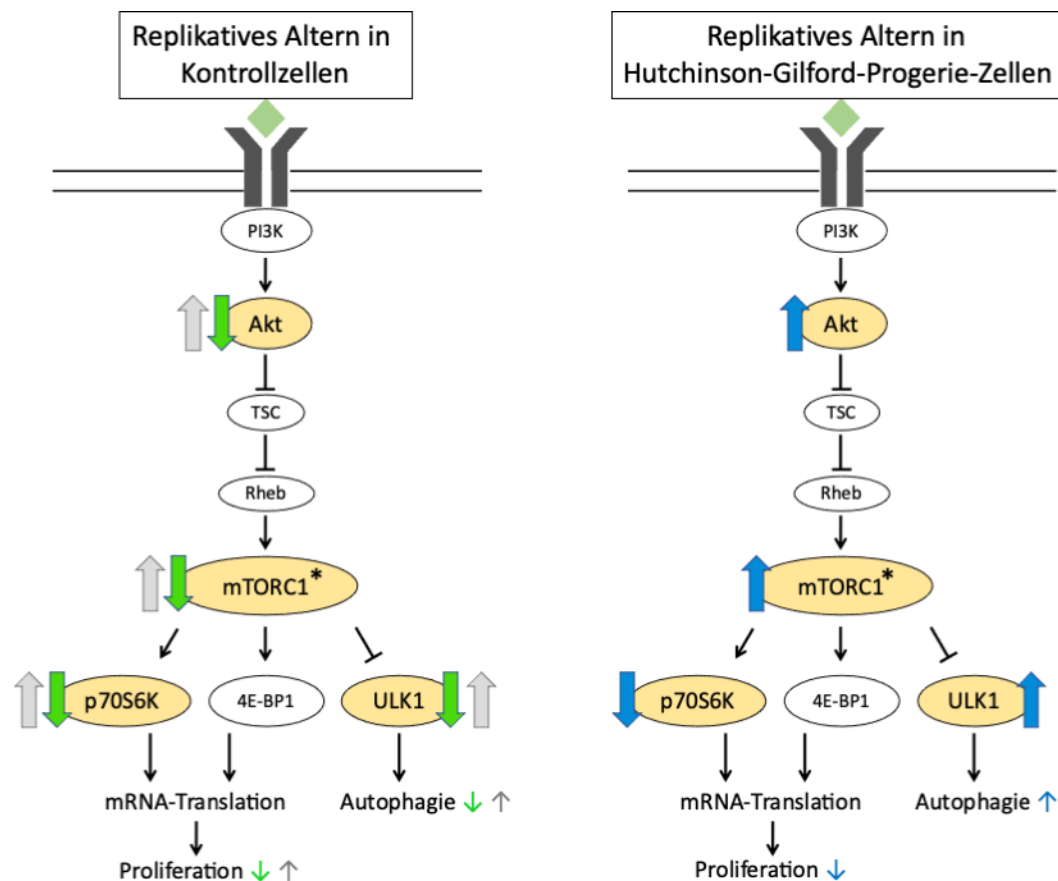


Abb. 17: Regelung des mTOR-Signalweges in replikativ gealterten Kontroll- und Progerie-Zellen.

In gesunden Kontrollzellen kommt es zu einer verminderten Proteinexpression in replikativ gealterten Fibroblasten (grüne Pfeile). In HGP-Zellen konnten Akt, mTOR und ULK1 vermehrt nachgewiesen werden, p70S6K war hingegen vermindert (blaue Pfeile). Eine erste Untersuchung zeigte, dass es bei replikativ gealterten Zellen, die aus einem zuvor gealterten Probanden entnommen wurden, zu einer erhöhten Bildung aller untersuchten Proteine des mTOR-Signalweges kam (graue Pfeile). Die genauen Auswirkungen der Proteinregulation auf Zellwachstum, Proliferation und Autophagie können an dieser Stelle nur impliziert werden (kleine Pfeile). *In dieser Arbeit wurde nur Gesamt-mTOR und das im mTORC1 phosphorylierte mTOR (Ser2448) nachgewiesen. mTORC1 dient an dieser Stelle als Stellvertreter.

Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die vermehrte Expression von Proteinen des mTOR-Signalweges im Alternsprozess des Organismus eine gezielte Regulation darstellt oder als Pathobiochemie zu verstehen ist. Sie deuten darauf hin, dass übergeordnete Prozesse im Körper während des Lebens einen Einfluss auf die Regulation des mTOR-Signalweges haben. Als Ansatzpunkt könnten epigenetische Mechanismen wie zum Beispiel DNA-Methylierungen dienen.

4.7 mTOR-Inhibition und verlängertes Leben?

Wie zuvor beschrieben, konnte eine Behandlung mit Rapamycin, einem mTOR-Inhibitor, das Überleben verschiedener Lebewesen verlängern [28,93–97].

Die Ergebnisse der Erwachsenenzelllinie lassen eine fehlgeleitete Regulation des mTOR-Signalweges vermuten, was erneut die Frage aufwirft, inwiefern sich Altern durch eine Therapie mit mTOR-Inhibitoren aufhalten oder verlangsamen lässt.

In einer Studie von Ferrara-Romeo et al. an Mäusen, in denen die Telomerase gentechnisch ausgeschaltet wurde, wurde beobachtet, dass eine Therapie mit Rapamycin unerwartet zu einem verkürzten Überleben führte. Die Telomere dieser Mäuse waren deutlich verkürzt; der mTOR-Signalweg, darunter auch p70, war hochreguliert, sodass der Rückschluss gezogen wurde, dass mTOR in diesem Fall als Pro-Survival-Pathway diene. Weiterhin konnten sie in einem Experiment zeigen, dass die Telomere von Wild-Typ-Mäusen unter Rapamycin-Therapie fragiler waren als in nicht-behandelten Mäusen, was auf erhöhten replikativen Stress hindeuten könnte [122]. Somit sollte eine grundsätzliche Therapie mit einem mTOR-Inhibitor in diesem Zusammenhang kritisch hinterfragt werden. Ob die Ergebnisse dieser Experimente auf den Menschen übertragen werden können, sollte an weiteren Experimenten erforscht werden, denn es wurde gezeigt, dass Mäuse im Gegensatz zum Menschen nicht replikativ altern [121].

4.8 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit gibt einen Überblick über das Wachstumsverhalten und den mTOR-Signalweg während des replikativen Alterns der Zellkulturen von Kinderkontroll- und Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten.

- 1) Progerie-Fibroblasten wachsen schneller, erreichen eher den Wachstumsstopp der Kultur und weisen bereits in niedrigen PDs eine höhere Anzahl senescenter Zellen auf als die Kinderkontrollzellen. Die Proteine des mTOR-Signalweges sind in replikativ gealterten Kontrollzellen auf allen untersuchten Ebenen (AKT, mTOR, p70, ULK1) signifikant

vermindert exprimiert. Bei den Progerie-Zellen sind mTOR, ULK1 und das Gesamt-Akt kaum verändert bis verstärkt exprimiert, p70 und das phosphorylierte Akt zeigen verringerte Proteinmengen an.

- 2) Die Immortalisierung mit hTERT wirkt den Effekten des replikativen Alterns bei Kontrollen und Progerie in unterschiedlichem Ausmaß entgegen. Die Wachstumsgeschwindigkeiten und die Anzahl seneszenten Zellen sind zwischen beiden Gruppen vergleichbar. Alle Zellkulturen konnten nach Immortalisierung deutlich länger kultiviert werden. Die untersuchten Proteine des mTOR-Signalweges in immortalisierten Zellen wurden in die entgegengesetzte Richtung der primären alten Zellen reguliert. Das Ausmaß dieser Reaktion ist dabei sowohl zwischen den untersuchten Proteinen als auch den einzelnen Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt. Die Immortalisierung für sich hat somit nicht kalkulierbare Effekte auf den mTOR-Signalweg. Als oxidativer Stressor hat H₂O₂ in der angewandten Dauer und Intensität keinen einheitlichen Effekt auf den mTOR-Signalweg. Auch können Effekte des replikativen Alterns so nicht imitiert werden.

Die Beobachtungen an den Fibroblasten der Erwachsenenzelllinie müssen durch weitere Untersuchungen bestätigt und ausgeweitet werden. Sie bilden aber eine mögliche Erklärung, warum in anderen Studien Altern mit einem erhöhten mTOR-Signalweg einhergeht. Da sich deutliche Unterschiede während des replikativen Alterns der Zellkulturen aufzeigen, sollte bei der Planung weiterer Untersuchungen explizit darauf geachtet werden, genaue Angaben zum Alter sowohl bei Entnahme einer Probe aus dem Organismus als auch zur Passage in der Zellkultur zu machen, um die Ergebnisse besser in den Kontext des Alterns einzuordnen.

Die Diskrepanz der Ergebnisse in einigen Punkten in Bezug auf den mTOR-Signalweg im Vergleich zu Studien anderer Forscher fordert weitere Untersuchungen zum mTOR-Signalweg sowohl bei Gesunden als auch bei der HGP.

Dabei muss nun geklärt werden, welche Mechanismen auf den mTOR-Signalweg im Alter und bei der Progerie einwirken. Mögliche Fragen, die dafür gestellt werden könnten, sind: Haben die mTOR-Komplexe an unterschiedlichen Lokalisationen in der Zelle unterschiedliche Funktionen und Regulationen? Haben epigenetische Modifikationen einen Einfluss auf den mTOR-Signalweg?

5 Literaturverzeichnis

1. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013 Jun;153(6):1194–217.
2. Nicita-Mauro V, Lo Balbo C, Mento A, Nicita-Mauro C, Maltese G, Basile G. Smoking, aging and the centenarians. *Exp Gerontol*. 2008 Feb;43(2):95–101.
3. Simpson SJ, Le Couteur DG, Raubenheimer D, Solon-Biet SM, Cooney GJ, Cogger VC, Fontana L. Dietary protein, aging and nutritional geometry. *Ageing Res Rev*. 2017 Oct;39:78–86.
4. Shammass MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011 Jan;14(1):28–34.
5. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Arch Dermatol*. 2002 Nov 1;138(11).
6. Foo MXR, Ong PF, Dreesen O. Premature aging syndromes: From patients to mechanism. *J Dermatol Sci*. 2019 Nov;96(2):58–65.
7. Brunet A, Berger SL. Epigenetics of Aging and Aging-related Disease. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci*. 2014 Jun 1;69(Suppl 1):S17–20.
8. Park CB, Larsson N-G. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol*. 2011 May 30;193(5):809–18.
9. Moskalev AA, Shaposhnikov M V., Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, Fraifeld VE. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. Vol. 12, *Ageing Research Reviews*. 2013. p. 661–84.
10. Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, Goldman RD. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev*. 2008 Apr 1;22(7):832–53.
11. Cao K, Blair CD, Faddah DA, Kieckhafer JE, Olive M, Erdos MR, Nabel EG, Collins FS. Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *J Clin Invest*. 2011 Jul 1;121(7):2833–44.
12. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature*. 2003 May 25;423(6937):293–8.
13. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff

-
- RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci.* 1988 Sep 1;85(18):6622–6.
14. Wu P, Takai H, de Lange T. Telomeric 3' Overhangs Derive from Resection by Exo1 and Apollo and Fill-In by POT1b-Associated CST. *Cell.* 2012 Jul;150(1):39–52.
 15. Olovnikov AM. A theory of marginotomy. *J Theor Biol.* 1973 Sep;41(1):181–90.
 16. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961 Dec;25(3):585–621.
 17. Liu J-P, Wang L, Wang Z, Liu J-P. Roles of Telomere Biology in Cell Senescence, Replicative and Chronological Ageing. *Cells.* 2019 Jan 15;8(1):54.
 18. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest.* 2018 Apr 2;128(4):1238–46.
 19. Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer.* 2010 Jan;10(1):51–7.
 20. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010 Nov 15;24(22):2463–79.
 21. Han S, Brunet A. Histone methylation makes its mark on longevity. *Trends Cell Biol.* 2012 Jan;22(1):42–9.
 22. Maegawa S, Hinkal G, Kim HS, Shen L, Zhang L, Zhang J, Zhang N, Liang S, Donehower LA, Issa J-PJ. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res.* 2010 Mar 1;20(3):332–40.
 23. Sen P, Shah PP, Nativio R, Berger SL. Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell.* 2016 Aug;166(4):822–39.
 24. Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev.* 2011 Apr;10(2):205–15.
 25. Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, Ono A, Ohara J, Baba T, Murata S, Tanaka K, Kasahara M. Decreased Proteasomal Activity Causes Age-Related Phenotypes and Promotes the Development of Metabolic Abnormalities. *Am J Pathol.* 2012 Mar;180(3):963–72.
 26. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010 May;221(1):3–12.
 27. Shirakabe A, Ikeda Y, Sciarretta S, Zablocki DK, Sadoshima J. Aging and Autophagy in the Heart. *Circ Res.* 2016 May 13;118(10):1563–76.
 28. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. Vol. 168, *Cell.* Cell Press; 2017. p. 960–76.

29. Aliper AM, Csoka AB, Buzdin A, Jetka T, Roumiantsev S, Moskalev A, Zhavoronkov A. Signaling pathway activation drift during aging: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome fibroblasts are comparable to normal middle-age and old-age cells. *Aging (Albany NY)*. 2015 Jan 9;7(1):26–37.
30. Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A. The Critical Role of Metabolic Pathways in Aging. *Diabetes*. 2012 Jun 1;61(6):1315–22.
31. Weichhart T. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. Vol. 64, *Gerontology*. S. Karger AG; 2018. p. 127–34.
32. Kujoth GC. Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging. *Science (80-)*. 2005 Jul 15;309(5733):481–4.
33. Vermulst M, Bielas JH, Loeb LA. Quantification of random mutations in the mitochondrial genome. *Methods*. 2008 Dec;46(4):263–8.
34. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the Autophagy-Inflammation-Cell Death Axis in Organismal Aging. *Science (80-)*. 2011 Aug 26;333(6046):1109–12.
35. Marzetti E, Calvani R, Cesari M, Buford TW, Lorenzi M, Behnke BJ, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: From signaling pathways to clinical trials. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Oct;45(10):2288–301.
36. Schultz MB, Sinclair DA. When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development*. 2016 Jan 1;143(1):3–14.
37. Sharpless NE, DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep;8(9):703–13.
38. de Magalhães JP, Curado J, Church GM. Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics*. 2009 Apr 1;25(7):875–81.
39. Franceschi C, Campisi J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci*. 2014 Jun 1;69(Suppl 1):S4–9.
40. Lefebvre JS, Maue AC, Eaton SM, Lanthier PA, Tighe M, Haynes L. The aged microenvironment contributes to the age-related functional defects of CD4 T cells in mice. *Aging Cell*. 2012 Oct;11(5):732–40.
41. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culeton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW. Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease. Hypertension. 2003 Nov;42(5):1050–65.
42. Ashapkin V V., Kutueva LI, Kurchashova SY, Kireev II. Are There Common

- Mechanisms Between the Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome and Natural Aging? *Front Genet.* 2019 May 15;10(MAY):1–14.
43. Gilford H, Hutchinson J. On a Condition of Mixed Premature and Immature Development. *J R Soc Med.* 1897 Jan 1;MCT-80(1):17–45.
 44. Hutchinson J. Congenital Absence of Hair and Mammary Glands with Atrophic Condition of the Skin and its Appendages in a Boy Whose Mother Had Been Almost Wholly Bald from Alopecia Areata from the Age of Six. *J R Soc Med.* 1886 Jan 1;MCT-69(1):473–7.
 45. Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, Sachdev V, Smith ACM, Perry MB, Brewer CC, Zalewski C, Kim HJ, Solomon B, Brooks BP, Gerber LH, Turner ML, Domingo DL, Hart TC, Graf J, Reynolds JC, Gropman A, Yanovski JA, Gerhard-Herman M, Collins FS, Nabel EG, Cannon RO, Gahl WA, Inrone WJ. Phenotype and Course of Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. *N Engl J Med.* 2008 Feb 7;358(6):592–604.
 46. Ullrich NJ, Gordon LB. Hutchinson–Gilford progeria syndrome. In: *Handbook of Clinical Neurology.* 1st ed. Elsevier B.V.; 2015. p. 249–64.
 47. Piekarowicz K, Machowska M, Dzianisava V, Rzepecki R. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome—Current Status and Prospects for Gene Therapy Treatment. *Cells.* 2019 Jan 25;8(2):88.
 48. Worman HJ, Fong LG, Muchir A, Young SG. Laminopathies and the long strange trip from basic cell biology to therapy. Vol. 119, *Journal of Clinical Investigation.* 2009. p. 1825–36.
 49. Lopez-Mejia IC, Vautrot V, De Toledo M, Behm-Ansmant I, Bourgeois CF, Navarro CL, Osorio FG, Freije JMP, Stévenin J, De Sandre-Giovannoli A, Lopez-Otin C, Lévy N, Branlant C, Tazi J. A conserved splicing mechanism of the LMNA gene controls premature aging. *Hum Mol Genet.* 2011 Dec 1;20(23):4540–55.
 50. Zhironkina OA, Kurchashova SY, Pozharskaia VA, Cherepanynets VD, Strelkova OS, Hozak P, Kireev II. Mechanisms of nuclear lamina growth in interphase. *Histochem Cell Biol.* 2016 Apr 16;145(4):419–32.
 51. Young SG, Fong LG, Michaelis S. Prelamin A, Zmpste24, misshapen cell nuclei, and progeria - New evidence suggesting that protein farnesylation could be important for disease pathogenesis. Vol. 46, *Journal of Lipid Research.* 2005. p. 2531–58.
 52. Pendás AM, Zhou Z, Cadiñanos J, Freije JMP, Wang J, Hultenby K, Astudillo A, Wernerson A, Rodríguez F, Tryggvason K, López-Otín C. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet.* 2002 May 1;31(1):94–9.

53. Pan X, Jiang B, Wu X, Xu H, Cao S, Bai N, Li X, Yi F, Guo Q, Guo W, Song X, Meng F, Li X, Liu Y, Cao L. Accumulation of prelamin A induces premature aging through mTOR overactivation. *FASEB J.* 2020 Jun 13;34(6):7905–14.
54. Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R, Collins FS. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci.* 2004 Jun 15;101(24):8963–8.
55. Gonzalo S, Kreienkamp R. DNA repair defects and genome instability in Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. Vol. 34, *Current Opinion in Cell Biology.* 2015. p. 75–83.
56. McCord RP, Nazario-Toole A, Zhang H, Chines PS, Zhan Y, Erdos MR, Collins FS, Dekker J, Cao K. Correlated alterations in genome organization, histone methylation, and DNA-lamin A/C interactions in Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Genome Res.* 2013;23(2):260–9.
57. Shumaker DK, Dechat T, Kohlmaier A, Adam SA, Bozovsky MR, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Khuon S, Collins FS, Jenuwein T, Goldman RD. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(23):8703–8.
58. Gordon LB, Shappell H, Massaro J, D’Agostino RB, Brazier J, Campbell SE, Kleinman ME, Kieran MW. Association of Lonafarnib Treatment vs No Treatment With Mortality Rate in Patients With Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. *JAMA.* 2018 Apr 24;319(16):1687.
59. Pellegrini C, Columbaro M, Capanni C, D’Apice MR, Cavallo C, Murdocca M, Lattanzi G, Squarzone S. All-trans retinoic acid and rapamycin normalize Hutchinson Gilford progeria fibroblast phenotype. *Oncotarget.* 2015 Oct 6;6(30):29914–28.
60. Gabriel D, Shafry DD, Gordon LB, Djabali K. Intermittent treatment with farnesyltransferase inhibitor and sulforaphane improves cellular homeostasis in Hutchinson–Gilford progeria fibroblasts. *Oncotarget.* 2017 Sep 12;8(39):64809–26.
61. Kreienkamp R, Croke M, Neumann MA, Bedia-Diaz G, Graziano S, Dusso A, Dorsett D, Carlberg C, Gonzalo S. Vitamin D receptor signaling improves Hutchinson–Gilford progeria syndrome cellular phenotypes. *Oncotarget.* 2016 May 24;7(21):30018–31.
62. Kreienkamp R, Gonzalo S. Metabolic Dysfunction in Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. *Cells.* 2020 Feb 8;9(2):395.
63. Beyret E, Liao H-K, Yamamoto M, Hernandez-Benitez R, Fu Y, Erikson G, Reddy P, Izpisua Belmonte JC. Single-dose CRISPR–Cas9 therapy extends lifespan of mice with

-
- Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nat Med.* 2019 Mar 18;25(3):419–22.
64. Santiago-Fernández O, Osorio FG, Quesada V, Rodríguez F, Basso S, Maeso D, Rolas L, Barkaway A, Nourshargh S, Folgueras AR, Freije JMP, López-Otín C. Development of a CRISPR/Cas9-based therapy for Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nat Med.* 2019 Mar 18;25(3):423–6.
65. Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell.* 2002 Jul;110(2):163–75.
66. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K ichi, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell.* 2002;110(2):177–89.
67. Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV., Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. GβL, a Positive Regulator of the Rapamycin-Sensitive Pathway Required for the Nutrient-Sensitive Interaction between Raptor and mTOR. *Mol Cell.* 2003 Apr;11(4):895–904.
68. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival. *Cell.* 2009 May 29;137(5):873–86.
69. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Mol Cell.* 2007 Mar 23;25(6):903–15.
70. Betz C, Hall MN. Where is mTOR and what is it doing there? *J Cell Biol.* 2013 Nov 25;203(4):563–74.
71. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan K-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep 12;4(9):648–57.
72. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell.* 2002 Jul;10(1):151–62.
73. Tee AR, Anjum R, Blenis J. Inactivation of the Tuberous Sclerosis Complex-1 and -2 Gene Products Occurs by Phosphoinositide 3-Kinase/Akt-dependent and -independent Phosphorylation of Tuberlin. *J Biol Chem.* 2003 Sep;278(39):37288–96.
74. Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 14;101(37):13489–94.

-
75. Lee DF, Kuo HP, Chen C Te, Hsu JM, Chou CK, Wei Y, Sun HL, Li LY, Ping B, Huang WC, He X, Hung JY, Lai CC, Ding Q, Su JL, Yang JY, Sahin AA, Hortobagyi GN, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. IKK β Suppression of TSC1 Links Inflammation and Tumor Angiogenesis via the mTOR Pathway. *Cell*. 2007 Aug 10;130(3):440–55.
 76. Dibble CC, Elis W, Menon S, Qin W, Klekota J, Asara JM, Finan PM, Kwiatkowski DJ, Murphy LO, Manning BD. TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. *Mol Cell*. 2012 Aug 24;47(4):535–46.
 77. Iwata J, Ezaki J, Komatsu M, Yokota S, Ueno T, Tanida I, Chiba T, Tanaka K, Kominami E. Excess Peroxisomes Are Degraded by Autophagic Machinery in Mammals. *J Biol Chem*. 2006 Feb;281(7):4035–41.
 78. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007 Nov 15;21(22):2861–73.
 79. Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu Rev Biochem*. 2016 Jun 2;85(1):685–713.
 80. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011 Feb 23;13(2):132–41.
 81. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*. 2004 Nov 3;6(11):1122–8.
 82. Dos DS, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004 Jul;14(14):1296–302.
 83. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, Sabatini DM. mSin1 Is Necessary for Akt/PKB Phosphorylation, and Its Isoforms Define Three Distinct mTORC2s. *Curr Biol*. 2006 Sep 19;16(18):1865–70.
 84. Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan KL. Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev*. 2006 Oct 15;20(20):2820–32.
 85. Pearce LR, Huang X, Boudeau J, Pawłowski R, Wullschleger S, Deak M, Ibrahim AFM, Gourlay R, Magnuson MA, Alessi DR. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J*. 2007 Aug 1;405(3):513–22.
 86. Chiarini F, Evangelisti C, Cenni V, Fazio A, Paganelli F, Martelli A, Lattanzi G. The

-
- Cutting Edge: The Role of mTOR Signaling in Laminopathies. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 15;20(4):847.
87. Sarbassov DD. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science (80-)*. 2005 Feb 18;307(5712):1098–101.
88. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM. Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1. *Dev Cell.* 2006 Dec;11(6):859–71.
89. Liu P, Gan W, Chin YR, Ogura K, Guo J, Zhang J, Wang B, Blenis J, Cantley LC, Toker A, Su B, Wei W. PtdIns(3,4,5) P₃-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. *Cancer Discov.* 2015 Nov;5(11):1194–209.
90. Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, James DE. A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep.* 2015 Aug;12(6):937–43.
91. Eng CP, Sehgal SN, Vezina C. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo).* 1984;37(10):1231–7.
92. Martel RR, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol.* 1977 Feb 1;55(1):48–51.
93. Jia K, Chen D, Riddle DL. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development.* 2004 Aug 15;131(16):3897–906.
94. Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, Müller F. Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature.* 2003 Dec;426(6967):620–620.
95. Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S. Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway. *Curr Biol.* 2004 May;14(10):885–90.
96. Kaeberlein M, Powers RW, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, Kerr EO, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK. Regulation of Yeast Replicative Life Span by TOR and Sch9 in Response to Nutrients. *Science (80-)*. 2005 Nov 18;310(5751):1193–6.
97. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, Davis JG, Salmon AB, Richardson A, Ahima RS, Guertin DA, Sabatini DM, Baur JA. Rapamycin-Induced Insulin Resistance Is Mediated by mTORC2 Loss and Uncoupled from Longevity. *Science (80-)*. 2012 Mar 30;335(6076):1638–43.
98. McClintock D, Ratner D, Lokuge M, Owens DM, Gordon LB, Collins FS, Djabali K. The Mutant Form of Lamin A that Causes Hutchinson-Gilford Progeria Is a Biomarker of

- Cellular Aging in Human Skin. Lewin A, editor. PLoS One. 2007 Dec 5;2(12):e1269.
99. Benson EK, Lee SW, Aaronson SA. Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. *J Cell Sci.* 2010 Aug 1;123(15):2605–12.
 100. Decker ML, Chavez E, Vulto I, Lansdorp PM. Telomere length in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Mech Ageing Dev.* 2009 Jun;130(6):377–83.
 101. Clements CS, Bikkul MU, Ofosu W, Eskiw C, Tree D, Makarov E, Kill IR, Bridger JM. Presence and distribution of progerin in HGPS cells is ameliorated by drugs that impact on the mevalonate and mTOR pathways. *Biogerontology.* 2019 Jun 30;20(3):337–58.
 102. Nacarelli T, Azar A, Sell C. Aberrant mTOR activation in senescence and aging: A mitochondrial stress response? *Exp Gerontol.* 2015 Aug;68:66–70.
 103. Evangelisti C, Cenni V, Lattanzi G. Potential therapeutic effects of the MTOR inhibitors for preventing ageing and progeria-related disorders. *Br J Clin Pharmacol.* 2016 Nov 18;82(5):1229–44.
 104. Cenni V, Capanni C, Columbaro M, Ortolani M, D'Apice MR, Novelli G, Fini M, Marmioli S, Scarano E, Maraldi NM, Squarzoni S, Prencipe S, Lattanzi G. Autophagic degradation of farnesylated prelamin A as a therapeutic approach to lamin-linked progeria. *Eur J Histochem.* 2011 Oct 19;55(4):200–5.
 105. Gary RK, Kindell SM. Quantitative assay of senescence-associated β -galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Anal Biochem.* 2005 Aug;343(2):329–34.
 106. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 1995 Sep 26;92(20):9363–7.
 107. Bridger JM, Kill IR. Aging of Hutchinson – Gilford progeria syndrome fibroblasts is characterised by hyperproliferation and increased apoptosis. 2004;39:717–24.
 108. Markiewicz E, Dechat T, Foisner R, Quinlan RA, Hutchison CJ. Lamin A/C Binding Protein LAP2 α Is Required for Nuclear Anchorage of Retinoblastoma Protein. Lippincott-Schwartz J, editor. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4401–13.
 109. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai E V., Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci.* 1992 Nov 1;89(21):10114–8.
 110. Li Y, Zhou G, Bruno IG, Zhang N, Sho S, Tedone E, Lai T, Cooke JP, Shay JW. Transient introduction of human telomerase mRNA improves hallmarks of progeria cells. *Aging Cell.* 2019 Aug 31;18(4):1–12.
 111. Turner R. Relationships between nuclear lamins and telomere biology in progeroid

-
- laminopathies and cancer. University of Leicester; 2014.
112. Kudlow BA, Stanfel MN, Burtner CR, Johnston ED, Kennedy BK. Suppression of Proliferative Defects Associated with Processing-defective Lamin A Mutants by hTERT or Inactivation of p53. Bickmore W, editor. *Mol Biol Cell*. 2008 Dec;19(12):5238–48.
 113. Ouellette MM. The establishment of telomerase-immortalized cell lines representing human chromosome instability syndromes. *Hum Mol Genet*. 2000 Feb 12;9(3):403–11.
 114. Sandri M, Barberi L, Bijlsma AY, Blaauw B, Dyar KA, Milan G, Mammucari C, Meskers CGM, Pallafacchina G, Paoli A, Pion D, Roceri M, Romanello V, Serrano AL, Toniolo L, Larsson L, Maier AB, Muñoz-Cánoves P, Musarò A, Pende M, Reggiani C, Rizzuto R, Schiaffino S. Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle. The role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. *Biogerontology*. 2013 Jun 19;14(3):303–23.
 115. Ramos FJ, Chen SC, Garelick MG, Dai D-F, Liao C-Y, Schreiber KH, MacKay VL, An EH, Strong R, Ladiges WC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M, Kennedy BK. Rapamycin Reverses Elevated mTORC1 Signaling in Lamin A/C-Deficient Mice, Rescues Cardiac and Skeletal Muscle Function, and Extends Survival. *Sci Transl Med*. 2012 Jul 25;4(144):144ra103-144ra103.
 116. Rajendran P, Alzahrani AM, Hanieh HN, Kumar SA, Ben Ammar R, Rengarajan T, Alhoot MA. Autophagy and senescence: A new insight in selected human diseases. Vol. 234, *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc.; 2019. p. 21485–92.
 117. Mariño G, Ugalde AP, Salvador-Montoliu N, Varela I, Quirós PM, Cadiñanos J, van der Pluijm I, Freije JMP, López-Otín C. Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction. *Hum Mol Genet*. 2008 Jul 15;17(14):2196–211.
 118. Young ARJ, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JFJ, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev*. 2009 Apr 1;23(7):798–803.
 119. Carroll B, Nelson G, Rabanal-Ruiz Y, Kucheryavenko O, Dunhill-Turner NA, Chesterman CC, Zahari Q, Zhang T, Conduit SE, Mitchell CA, Maddocks ODK, Lovat P, von Zglinicki T, Korolchuk VI. Persistent mTORC1 signaling in cell senescence results from defects in amino acid and growth factor sensing. *J Cell Biol*. 2017 Jul 3;216(7):1949–57.
 120. Ibrahim MX, Sayin VI, Akula MK, Liu M, Fong LG, Young SG, Bergo MO. Targeting Isoprenylcysteine Methylation Ameliorates Disease in a Mouse Model of Progeria. *Science* (80-). 2013 Jun 14;340(6138):1330–3.

-
121. Wright WE, Shay JW. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med.* 2000 Aug;6(8):849–51.
 122. Ferrara-Romeo I, Martinez P, Saraswati S, Whittemore K, Graña-Castro O, Thelma Poluha L, Serrano R, Hernandez-Encinas E, Blanco-Aparicio C, Maria Flores J, Blasco MA. The mTOR pathway is necessary for survival of mice with short telomeres. *Nat Commun.* 2020 Dec 3;11(1):1168.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Juliane Mensch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zum mTOR-Signalweg in humanen Kontroll- und Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten/ Investigations on the mTOR Signaling Pathway in Human Control and Hutchinson-Gilford-Progeria-Fibroblasts“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Klinische Chemie, Pathobiochemie und Laboratoriumsmedizin der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Michael Walter für die Bereitstellung des interessanten Themas und die konstruktive Unterstützung während der Umsetzung.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Kathrin Jäger bedanken, die während der gesamten Zeit ein Auge auf das Labor der Arbeitsgruppe hatte, ständige Ansprechpartnerin bei Problemen war und zu einer festen Freundin wurde.

Ebenfalls möchte ich mich bei Brigitte Köttgen für die Einarbeitung in die Laborarbeit und die ein oder anderen angesetzten Puffer oder vorbereiteten Gele bedanken. Katharina Binder danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Seneszenzmarker-Experimente. Ich danke Sebastian Kirsch, der mir immer mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite stand. Dr. Bruno Neuner danke ich für die Einarbeitung in SPSS und die Hilfestellung bei Fragen zur Statistik. Auch der weiteren AG Walter danke ich für die lustigen Stunden im Labor, bei den Lab-Meetings und zu den Laborteam-Abenden. Dr. Birgit Holdt-Lehmann und Dr. Alexander Hartmann danke ich für die aufmunternden Worte, den Kaffee-Support und die vielen Ratschläge.

Ich möchte mich ebenfalls besonders bei Dr. Manuela Bastian bedanken, von der ich viel über das Erstellen einer Dissertation, Feinheiten in der Labordiagnostik und auch viel von außerhalb des Labors gelernt habe. Zusätzlich bedanke ich mich für das Durchhaltevermögen und die konstruktiven Hinweise beim Korrekturlesen.

Ich bedanke mich bei Laura Herzer für die konstruktiven Diskussionen über statistische Methoden und die motivierende Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die bei technischen Problemen, Fragen zur Mathematik oder für den emotionalen Support immer an meiner Seite standen