Aus dem Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Biochemischer Vergleich von Proteasomen aus Hirngewebe junger und alter Ratten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carolin Giannini

aus München

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. rer. nat. B. Dahlmann

2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. Enenkel

3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. S. Meiners

Datum der Promotion: 22. März 2013

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat		
ATP	Adenosintriphosphat		
Bz-VGR- AMC	Benzoyl-Val-Gly-Arg-7-Amino-4-methylcoumarin		
BrAAP	Branched chain aminoacid preference		
C-terminal	Carboxyterminus		
DEAE	Diethylaminoethyl		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxy ribonucleic acid)		
DRiP	defective ribosomal product		
DTT	Dithiothreitol		
ECL	Enhanced Chemiluminescence		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay		
ER	Endoplasmatisches Reticulum		
FACS	Fluorescence activated cell sorter		
FITC	Flurescein-Isothiocyanat		
FPLC	Fast Protein, Peptide and Polynucleotid Liquid Chromatography		
HECT	homologous to E6-associated protein carboxy terminus		
IgG	Immunglobulin G		
γIFN	γ-Interferon		
kDa	Kilodalton		
LC	Lactacystin		
MCP	Multicatalytic Protease		
MHC	Major Histocompatibility Complex		
NEpHGE	Non-Equilibrium pH Gradient Gel Electrophoresis		
PA28	Proteasomaktivator 28		
PA700	Proteasomaktivator 700		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
PVDF	Polyvinylidendifluorid		
rpm	rounds per minute		
RT	Raumtemperatur		
SDS	Sodium Dodecylsulfat		
Suc-LLVY- AMC	Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr- 7-Amino-4-methylcoumarin		
TCA	Trichloressigsäure		
TEAD	Tris/EDTA/Azid/DTT		
TEMED	Tetramethyl-Ethylendiamin		
TPPII	Tripepdidyl Peptidase II		
Tris	Tri-hydroxymethyl-aminomethan		
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System		
Ub	Ubiquitin		
Z-LLE-AMC	Z-Leu-Leu-Glu- 7-Amino-4-methylcoumarin		

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
Inhaltsverzeichnis	5
1 Einleitung	
1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	
1.2 Das 20S Proteasom	
1.3 Das 26S Proteasom und die Funktion des 19S Regulators	
1.4 Weitere Regulatoren des 20S Proteasoms	
1.5 Das Immunoproteasom	
1.6 Pathologische und physiologische Aspekte des Alterungsprozess	ses und die Rolle
des Proteasoms	
1.6.1 Neurodegenerative und weitere altersabhängige Erkrankungen.	
1.6.2 Physiologische molekulare Aspekte des Alterungsprozesses	
1.7 Zielsetzung	
2 Material und Methoden	
2.1 Material	
2.2 Methoden	
2.2.1 Aktivitätstest mittels fluorogener Peptidsubstrate nach Barret (l	Barrett 1980) 27
2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford	1 1976) 27
2.2.3 Nativ-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Nativ-PAGE)	
2.2.4 Substrat-Overlay nach Nativ-PAGE	
2.2.5 Ethanol-Fällung von Proteinen	
2.2.6 TCA Fällung von Proteinen	
2.2.7 Denaturierende SDS Polyacrylamidgelelektrophorese, nach La	emmli (1970) 29
2.2.8 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	
2.2.9 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	
2.2.10 2D-Non-Equilibrium-pH-Gradient-Elektrophorese (2D-NEpH	IGE) 30
2.2.11 Trennung von 20S und 26S Proteasomkomplexen im Rohextr	akt mittels
Glycerol-Dichtegradientenzentrifugation	
2.2.12 Rocket-Immunelektrophorese	
2.2.12.1 Spezifitätstest der 20S Proteasom Antiseren 37 und 87	

2.2.13 Präparation von 26S und 20S Proteasomen aus Rattenhirn-Regionen
2.2.14 Trennung einzelner Proteasom-Subtypen mittels
Anionenaustauschchromatographie am SMART-System
2.2.15 Abbau von poly-ubiquitinierten Substraten durch isolierte 26S Proteasomen 38
2.2.16 Aktivierung der chymotryptischen Aktivität der 26S Proteasomen durch poly-
ubiquitinierte Substrate
2.2.17 Western-Blot
2.2.18 Densitometrische Auswertung von Signalen nach Immundetektion
2.2.19 Statistik
3 Ergebnisse
3.1 Erarbeitung einer Methode zur Trennung von 20S und 26S Proteasomen aus
Hirngewebe-Extrakten 43
3.2 Trennung von 20S und 26S Proteasomenn aus Geweberohextrakt von Großhirn,
Kleinhirn und Hippocampus junger und alter Ratten mittels
Glycerol-Dichtegradienten-Zentrifugation46
3.3 Quantifizierung von 20S und 26S Proteasomen aus Großhirn, Kleinhirn und
Hippocampus junger und alter Ratten im Vergleich
3.3.1 Quantifizierung der 20S und 26S Proteasomen aus Großhirngewebe
3.3.2 Quantifizierung von 20S und 26S Proteasomen aus Kleinhirngewebe
3.3.3 Quantifizierung von 20S und 26S Proteasomen aus Hippocampusgewebe 50
3.4 Untersuchungen der proteolytischen Aktivität von 20S und 26S Proteasomen aus
Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus junger und alter Ratten
3.4.1 Vergleich der proteasomalen Aktivität in Hirngeweben von jungen und alten Ratten
mittels Nativgel-Elektrophorese und Substrat-Overlay
3.4.2 Untersuchungen altersabhängiger Veränderungen der proteasomalen
Aktivität in Hirn-Geweben alter und junger Ratten
3.5 Untersuchung der Untereinheiten-Zusammensetzung von 26S Proteasomen aus
Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus alter und junger Tiere
3.5.1 Reinigung und Charakterisierung von 26S und 20S Proteasomen aus
Großhirn und Kleinhirn alter und junger Ratten
3.5.2 Untersuchungen der Untereinheiten-Zusammensetzung der 26S Proteasomen 59
3.5.3 2D Elektrophorese von Proteasomen aus Großhirn und Kleinhirn
3.6 Trennung von Proteasom-Subtypen aus Rattengroßhirn und -kleinhirn

3.6.1 20S Proteasom Subtypen aus Rattengroßhirn beider Alterstufen	64
3.6.2 20S Proteasom Subtypen aus Rattenkleinhirn beider Alterstufen	66
3.7 Abbau poly-ubiquitinierter Substrate durch 26S Proteasomen aus Großhirn	und
Kleinhirn junger und alter Ratten	68
3.7.1 Abbau des Substrats Ub_5 -MUC ₄ durch 26S Proteasomen aus Groß- und	
Kleinhirngewebe	68
3.7.2 Einfluss des Ub ₅ Muc ₄ -Substrates auf den proteasomalen Abbau fluorogener	
Substrate	70
3.7.3 Abbau des Substrats polyUb-GST-UbcH5a durch 26S Proteasomen aus Groß	3- und
Kleinhirngewebe	72
3.8 Nachweis von Ubiquitinkonjugaten in Rohextraktproben aus Großhirn	
junger und alter Ratten	74
3.8.1 Immundetektion von USP14 und UCH37 in 26S Proteasomproben aus	
Großhirn und Kleinhirn junger und alter Ratten	75
4 Diskussion	77
4.1 Die Methodik zur Quantifizierung von 20S und 26S Proteasomen aus Hirnge	ewebe
der Ratte	77
4.2 Quantifizierung von 20S und 26S Proteasomen aus Großhirn, Kleinhirn und	l
Hippocampus alter und junger Ratten	79
4.3 Aktivitätsmessung von 20S und 26S Proteasom aus dem ZNS junger und	
alter Ratten mittels fluorogener Peptidsubstrate und poly-ubiquitinierter Subst	rate 80
4.3.1. Messdaten der Aktivitätsbestimmungen mit fluorogenen Peptidsubstraten	80
4.3.2 Vergleichende Untersuchungen des Abbaus polyubiquitinierter-Substrate	83
4.4 Untereinheiten-Zusammensetzung und Subtypen der Proteasomen aus Groß	shirn,
Kleinhirn und Hippocampus junger und alter Ratten	84
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick	89
Zusammenfassung	92
Literaturverzeichnis	94
Danksagung	102
Lebenslauf	103
Publikationsliste	104

1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Der Proteinabbau eukaryontischer Zellen wird überwiegend durch zwei proteolytische Systeme realisiert, das lysosomale und das proteasomale Abbausystem. Während extrazelluläre Proteine überwiegend über das lysosomale System eliminiert werden, beseitigt das Ubiquitin-Proteasom-System vor allem intrazellulär lokalisierte Proteine. Zu den proteasomalen Substraten zählen u.a. kurzlebige Zellproteine, denaturierte oder fehlgefaltete Proteine, sogenannte DRiPs (defective ribosomal products) (Voges, Zwickl et al. 1999; Schubert, Ott et al. 2000). Als proteolytische Komponente des UPS trägt das Proteasom wesentlich zur Erhaltung der zellulären Proteinhomöostase bei und ist durch die Vielzahl seiner Substrate in mannigfaltige zelluläre zählen Hierzu Prozesse involviert. u. a. die Apoptose, Zellzyklusregulation, Genexpression/repression und die Peptidgenerierung für die MHC-Klasse I-abhängige Antigenpräsentation (Coux, Tanaka et al. 1996; Hershko and Ciechanover 1998; Kloetzel 2001). Das Vorkommen des UPS in allen drei Domänen des Lebens (Archeae, Eubakterien und Eukaryonten) weist auf seine essentielle Rolle innerhalb dieses Systems hin (Coux, Tanaka et al. 1996). Die verschiedenen Proteasomkomplexe sind ubiquitär in Zellen eukaryontischer Organismen vorhanden und gewährleisten durch die drei vorliegenden Endopeptidaseaktivitäten die Proteolyse von bis zu 90% der intrazellulären Proteine. Das Proteasom selbst repräsentiert mit seinen verschiedenen Komplexformen bis zu 1% der löslichen Zellproteine (Tanaka, Ii et al. 1986).



Abbildung 1-1 Ein schematischer Überblick über die Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems und dessen Beteiligung an verschiedenen zellulären Prozessen. Durch seine mannigfaltigen Substrate ist das Proteasom an zahlreichen Vorgängen in der Zelle beteiligt, die eng miteinander verknüpft sind. Eine Störung des proteasomal bedingten Proteinabbaus steht im engen Zusammenhang mit verschiedenen pathologischen Veränderungen und schwerwiegenden Krankheiten (modifiziert nach Wolf und Hilt) (Wolf and Hilt 2004).

Um intakte Proteine vor einem willkürlichen Abbau zu schützen, werden die abzubauenden Proteine durch die posttranslationale Modifikation mit Ubiquitin markiert. Der Abbau der meisten Proteine mittels des UPS erfordert demnach zwei konsekutive Reaktionsschritte. Zuerst wird das Substrat durch die Konjugation mit Polyubiquitin markiert und anschließend dem 26S Proteasom zugeführt. Ubiquitin, ein stabiles, hoch konserviertes Polypeptid aus 76 Aminosäuren von ca. 8 kDa Größe, wird hierbei über eine dreischrittige Enzymkaskade (E1-E3) an das proteasomale Substrat gebunden. E1-Enzyme (ubiquitin activating enzymes) aktivieren das Ubiquitin in einem ATP-abhängigen Reaktionsschritt. Hierbei wird initial das C-terminale Glycin76 des Ubiquitins zu einem hochenergetischen Thiolester-Intermediat aktiviert und auf das aktive Cystein eines E2-Enzyms (ubiquitin conjugating enzyme) transferiert. Anschließend erfolgt die Überführung bzw. Konjugation des Ubiquitins an das Substrat durch eine substratspezifische E3-Ligase (ubiquitin ligase) (Ciechanover 2006). Das humane Genom kodiert für über 600 E3 Ligasen, die auf der Grundlage ihrer Primärstruktur in drei große Familien eingeteilt werden: HECT-E3 Ligasen, RING-finger E3 Ligasen und U-Box-E3 Ligasen (Wang and Pickart 2005; Deshaies and Joazeiro 2009; Komander 2009). Die E3 Ligasen katalysieren die Bildung der Isopeptidbindung zwischen dem freien C-Terminus am Glycin76 des Ubiquitinmoleküls und der Aminogruppe eines internen Lysins des Subsrates. Diese Monoubiquitinierung kann durch eine sukzsessive Addition aktivierter Ubiquitinmoleküle zu einer Polyubiquitinkette verlängert werden. Die Polyubiquitinierung eines monomeren Ubiquitins kann hierbei an einem von sechs verschiedenen Lysin-Resten des Ubiquitins erfolgen (K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63) (Reyes-Turcu and Wilkinson 2009). Demnach kann ein Protein an einem oder mehreren Lysinresten mit einem Ubiquitinmonomer oder Ubiquitinpolymer markiert werden. Die Art der Ubiquitinierung ist hierbei entscheidend für die weitere Prozessierung des Proteins. Für den Abbau von Proteinen durch das Proteasom ist das Vorliegen von mindestens einer Tetraubiquitinkette und die Kettenbildung an K48 von großer Bedeutung (Thrower, Hoffman et al. 2000; Ciechanover 2006; Kerscher, Felberbaum et al. 2006).



Abbildung 1-2 Die Konjugation des Ubiquitins an ein Substrat beinhaltet eine Enzymkaskade durch drei Enzyme E1-E3. Zuerst wird das Ubiquitin durch ein E1-Enzym gebunden und aktiviert. Darauf folgt die Übertragung des Ubiquitins an ein konjugierendes E2-Enzym, welches den letzten Reaktionsschritt durch eine E3-Ligase induziert. Die substratspezifischen E3-Ligasen führen zur Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem Glycin76 des Ubiquitins und der freien Aminogruppe eines Lysins im Substrat. Die Ubiquitinierung eines Proteins ist ein reversibler Vorgang, der durch DUBs aufgehoben werden kann (modifiziert nach Kerscher et al.) (Kerscher, Felberbaum et al. 2006).

Die Ubiquitinierung eines Substrates ist ein reversibler Vorgang und kann durch Hydrolyse der Isopeptidbindung durch Deubiquitinierungsenzyme (DUBs) aufgehoben werden. Die freigestellten Ubiquitinmoleküle stehen so erneut als Abbausignal zur Verfügung (Lam, DeMartino et al. 1997). DUBs ermöglichen auf diese Weise nicht nur die erneute Bereitstellung von Ubiquitinmolekülen, sondern erfüllen zudem eine regulatorische Funktion. Durch das Entfernen des Ubiquitins vom Substrat und somit der Markierung verhindern sie den Substratabbau durch das 26S Proteasom. Es wird angenommen, dass die Länge der Polyubiquitinkette maßgeblich bestimmt, ob das jeweilige Substrat länger am Proteasom gebunden bleibt oder vorzeitig durch den Vorgang der Deubiquitinierung abgelöst wird und somit dem Abbau entgeht (Lam, DeMartino et al. 1997; Guterman and Glickman 2004). In eukaryotischen Genomen werden fünf Familien von DUBs unterschieden. Vier dieser DUBs Familien sind Cystein-Proteasen: die Ubiquitin-carboxy-terminal hydrolases (UCHs), Ubiquitin-specific processing proteases (USPs), ovarian tumour proteases (OTUs) und die der Josephin Familie. Die fünfte Familie von DUBs stellen Zink-Metalloproteasen dar (Komander 2009).

Gut untersucht sind verschiedene Enzyme der UCH und USP Familie. Beide Gruppen weisen Enzyme auf, die mit dem 26S Proteasomkomplex assoziiert vorliegen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass UCH37 eine Spaltung von Polyubiquitinketten bewirkt, wenn dieses an das 26S Proteasom gebunden vorliegt (Reyes-Turcu and Wilkinson 2009). Ein bekannter Vertreter der USP Gruppe ist das USP14, welches ebenfalls in Verbindung mit dem 26S Proteasom eine Spezifität für K48 verknüpfte Ubiquitinketten aufweist (Komander 2009).

1.2 Das 20S Proteasom

Das 26S Proteasom ist die zentrale Protease-Komponente des UPS und ist für den ATPabhängigen Abbau polyubiquitinierter Substrate in der Zelle verantwortlich. Der proteolytisch aktive Teil des 26S Proteasoms ist das 20S Proteasom. Es besteht aus zwei Kopien von sieben unterschiedlichen β -Typ Untereinheiten und zwei Kopien sieben unterschiedlicher α -Typ Untereinheiten, deren Molekulargewichte im Bereich von ca. 20- 35 kDa liegen. Die Grundstruktur des 20S Proteasoms ist evolutionär hoch konserviert und setzt sich aus vier heterooligomeren, gestapelten Ringen mit der Konfiguration α 1-7, β 1-7, β 1-7, α 1-7 zusammen, die so einen zylindrisch geformten Komplex mit pseudo-siebenfacher Symmetrie bilden (Coux, Tanaka et al. 1996). Der Zylinder hat eine Höhe von 15 nm und einen Durchmesser von 11 nm und birgt im Inneren drei Kompartimente, zwei Vorkammern und eine zentral gelegene proteolytisch aktive Kammer, die sechs proteolytisch aktive Zentren enthält. Diese aktiven Zentren werden von den β -Untereinheiten β 1, β 2 und β 5 gebildet (siehe auch Abb.1-3).

Die neben den katalytisch aktiven Untereinheiten vorliegenden α - und β -Untereinheiten des Proteasoms sind im Wesentlichen für die Stöchiometrie des Komplexes verantwortlich und fungieren zudem als wichtige Bindungsstellen für regulatorische Partikel (Hochstrasser 1996; Varshavsky 1997; Hershko and Ciechanover 1998). So konnten C-terminale Verlängerungen an vier der sieben α -Untereinheiten (C6, C8, C9 und C2) gefunden werden. Die Verlängerungen an C6 und C9 bestehen aus sich abwechselnden Lysin (K) und Glutamat (E) –Resten und bilden s.g. KEKE Motive aus. Selbige Motive konnten ebenfalls in verschiedenen Regulatoren (19S) bzw. Aktivatoren (PA28) und dem Proteasom assoziierter Proteine (z.B. Hitzeschock Proteine) beobachtet werden. Es besteht demnach die Hypothese, dass eben diese KEKE Motive Protein-Protein Interaktionen vermitteln (Realini, Rogers et al. 1994; Rechsteiner, Realini et al. 2000). Die N-terminalen-Seitenketten der α-Untereinheiten weisen ebenfalls wichtige Eigenschaften auf, die für den Abbauprozess eine besondere Bedeutung tragen. Sie nehmen eine gitterartige Stellung ein und schließen das Zentrum der α-Ringe nach außen hin ab. Der α-3 Untereinheit kommt hierbei eine zentrale Rolle zu, da sie mit ihrem N-Terminus einen engen Kontakt zu allen weiteren α -Untereinheiten des Ringes ausbildet und somit die α -Ring-Pore verschließt (Groll, Bajorek et al. 2000; Kohler, Bajorek et al. 2001).



Abbildung 1-3 A: Das Oberflächenmodell des 20S Proteasoms aus S.cerevisiae nach Kristallographie in Anwesenheit des Calpain-Inhibitor I. Gezeigt wird ein Schnitt entlang der pseudo-siebenfach Symmetrieachse des zylindrischen 20S Proteasoms. Zusehen sind die drei Hohlräume im Inneren des Zylinders, die zwei Vorkammern und die zentrale Kammer, welche die katalytisch aktiven β -Untereinheiten, β 1, β 2 und β 5 einschließt. Im Modell sind die sauren Aminosäureseitenketten gelb (β 1), die basischen orange (β 2) und die hydrophoben violett (β 5) markiert (modifiziert nach Groll et al.)(Groll and Huber 2004). **B**: Die schematische Darstellung des 20S Proteasomkomplexes zeigt seinen Aufbau im Kugelmodell. Die α -Untereinheiten (grün) bilden die jeweils außen liegenden Ringstrukturen, während die sieben β -Untereinheiten (blau und rot) die zwei zentral gelegenen Ringe aufbauen. Die proteolytisch aktiven β -Untereinheiten sind hierbei rot und die nicht aktiven β -Untereinheiten blau markiert (nach Kloetzel)(Kloetzel 2001).

Das Proteasom gehört der Superfamilie von N-terminal nucleophilen Hydrolasen an. Die Hydroxylgruppe der Seitenkette des N-terminalen Threonins (Thr 1) der aktiven β -Untereinheiten stellt das Nucleophil für den katalytischen Angriff auf die Peptidverbindung bereit und verleiht dem Proteasom Threonin-Proteasecharakter (Ditzel, Huber et al. 1998; Kloetzel 2001). So führte in verschiedenen Arbeiten die Deletion oder Mutation des Thr 1 in den aktiven β -Untereinheiten zu einer Inaktivierung des Proteasoms und schließlich zum Verlust der proteolytischen Funktion. (Seemuller, Lupas et al. 1995; Heinemeyer, Fischer et al. 1997; Ditzel, Huber et al. 1998). In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die in eukaryontischen Proteasomen vorliegenden proteolytisch aktiven Untereinheiten befähigt sind, nach fast jeder beliebigen Aminosäure zu schneiden. Unter Einsatz von chromogenen Peptidsubstraten konnten fünf unterschiedliche Schnittpräferenzen identifiziert werden. Diese umfassen die chymotryptische, tryptische und Peptidyl-Glutamyl-Peptid hydrolysierende

Aktivität (oder auch als Caspase-ähnliche Aktvität bezeichnet) des Proteasoms sowie zwei weitere Schnittpräferenzen, die sogenannte branched chain amino acid preferring (BrAAP) und die small neutral amino acid preferring (SNAAP) Aktivität. Den drei konstitutiven β-Untereinheiten (\beta1, \beta2, \beta5) kann jeweils eine spezifische peptidspaltende Aktivität zugeschrieben werden. Ausschlaggebend für die Proteolysespezifitäten ist die Aminosäure in der jeweiligen Substratbindungstasche. Die Untereinheit ß1 enthält hier ein Arginin-45 und interagiert demnach bevorzugt mit Glutamat-Resten der Substrate. Der Untereinheit ß1 wird demzufolge die Spezifität der Caspase-ähnlichen Aktivität (Schnitte vor allem nach sauren Aminosäureresten) zugeschrieben. Die Untereinheit β_2 , die ein Glycin-45 in der Substratbindungstasche trägt, eignet sich für die Hydrolyse von Peptidbindungen C-terminal von Aminosäuren mit großen basischen Resten. Dieser Untereinheit wird die tryptische Aktivität des Proteasoms zugeordnet. Die chymotryptische Aktivität wird auf die Untereinheit ß5 zurückgeführt, die bedingt durch das Vorliegen von Methionin-45 bevorzugt nach hydrophoben Aminosäureresten schneidet. Den BrAAP und SNAAP Aktivitäten konnten bislang keiner der drei aktiven
ß-Untereinheiten zugeordnet werden. Die vom Proteasom generierten Peptide weisen eine erhebliche Größenvarianz auf und können Längen von 4-25 Aminosäuren einnehmen. Durchschnittlich ergibt sich eine Peptidlänge von ca. 7-9 Aminosäuren (Dick, Moomaw et al. 1991; Akopian, Kisselev et al. 1997; Nussbaum, Dick et al. 1998; Orlowski and Wilk 2000; Groll and Huber 2005).

1.3 Das 26S Proteasom und die Funktion des 19S Regulators

Während das 20S Proteasom den proteolytisch aktiven Kernkomplex des 26S Proteasoms darstellt, ist letzteres die zentrale Protease-Komponente des gesamten UPS und ist für den ATPabhängigen Abbau polyubiqitinierter Substrate in der Zelle verantwortlich.

An den α -Ring eines 20S Proteasoms (auch core particle, CP genannt) kann ein 19S Regulator (RP) binden, dieser Komplex hat einen Sedimentationskoeffizienten von 26S und wird deshalb als 26S Partikel (CP1RP) bezeichnet; er besitzt ein Molekulargewicht von ca. 1000-1500 kDa. Bindet jeder α -Ring des 20S Kernkomplexes einen 19S Regulator, so entsteht das 30S Proteasom (CP1RP2) mit einem Molekulargewicht von ca. 2000-2500kDa. (Tanaka 1995). Experimente mit chromogenen Substraten zeigen, dass die Bindung der Regulatoren an das 20S Proteasom eine Zunahme der peptidspaltenden Aktivität bewirkt, die das 2-10 fache der Aktivität eines einzelnen 20S Proteasomkomplexes betragen kann (Adams, Crotchett et al. 1998; Kopp, Dahlmann et al. 2001). Ein komplexes System wie das Ubiquitin-Proteasom-System verlangt strenge

Regulationsmechanismen, um funktionell intakte Proteine vor einem unkontrollierten Abbau zu schützen. Die Mehrzahl der intrazellulären Substrat-Proteine enthalten deshalb Polyubiquitinketten als Abbausignal. Die so markierten Proteine werden in einem ATP-abhängigen Vorgang vom 26S/30S Proteasom eleminiert. Ein Abbau polyubiquitinierter Substrate durch das 20S Proteasom ist nicht möglich, da der Kernkomplex nicht zur Erkennung und Bindung von Polyubiquitinketten befähigt ist. Erst die Anwesenheit von zwei oder einem 19S Regulator ermöglicht eine ATP-abhängige Proteolyse von polyubiquitinierten Substraten.



Abbildung 1-4 A: Die elektronenmikroskopische Rekonstruktion des 26S Proteasomkomplexes aus Drosophila zeigt die Anordnung des 19S Regulators an beide α -Ringe des 20S Partikels. Der 19S Regulator ist zusammengesetzt aus dem Lid - und Base-Subkomplex. Die ATPase Untereinheiten des Base-Subkomplexes sind in orange hervorgehoben (Abb. übernommen aus Stadtmüller und Hill, 2011). B: Schematische Darstellung des 26S Proteasoms, welches aus einem 20S Kernkomplexes und gebundenen 19S Regulatoren besteht. Die Darstellung des 19S Regulators zeigt den schematischen Aufbau des Lid- und Base-Subkomplexes. Im Base-Komplex werden die ATPase Untereinheiten (RPT1-6) von den Nicht-ATPase Untereinheiten (Rpn1, Rpn2 und Rpn10) unterschieden. In violett markiert ist die ATPase Untereinheit Rpt5, die über eine Ubiquitin-bindende Dömane verfügt. Der Lid-Komplex ist aus 11 Rpn Untereinheiten aufgebaut. Im Modell hervorgehoben ist die Rpn11-Untereinheit, welche eine deubiquitinierende Funktion besitzt (modifiziert nach Kostova und Wolf 2003) (Kostova and Wolf 2003).

Die Funktion des 19S Regulators umfasst somit die Substraterkennung, Deubiquitinierung und ATP-abhängige Substrattranslokation zum aktiven Zentrum des Proteasomkernkomplexes (Glickman, Rubin et al. 1998; Kohler, Bajorek et al. 2001; Liu, Li et al. 2006; da Fonseca, He et al. 2012; Lander, Estrin et al. 2012). Der 19S Regulator (auch PA700 genannt) eukaryontischer Zellen ist ein Komplex aus ca. 17 verschiedenen Untereinheiten, die in zwei Subkomplexe unterteilt werden können, dem "base"- und dem "lid"- Subkomplex (Glickman, Rubin et al. 1998). Der base-Subkomplex beinhaltet die Nicht-ATPase Untereinheiten Rpn1, Rpn2 und

Rpn10 sowie ein Hexamer aus homologen ATPasen (Rpt1-6), welche der Superfamilie der AAA-ATPasen (ATPases Associated with a variety of cellular Activities) angehören (Ferrell, Wilkinson et al. 2000). Die Chaperon-ähnliche Funktion der ATPase-Untereinheiten ermöglicht Entfaltung der abzubauenden die Proteine als wichtige Vorraussetzung für die Substrattranslokation in das Innere des Proteasomkernkomplexes. Des Weiteren kommt es durch die Bindung des 19S Regulators an den α-Ring des 20S Proteasoms zu einer Konformationsänderung innerhalb des α-Heptameres, welches die Öffnung der zentral gelegenen Pore des α-Rings zur Folge hat (auch als *gating* bezeichnet), wodurch die entfalteten Substrat-Proteine schließlich in den 20S Proteasomkernkomplex transduziert werden können (Groll, Bajorek et al. 2000; Groll and Huber 2003). Kohler et al. konnten der Untereinheit Rpt2 durch die Interaktion mit der Untereinheit α 3 eine essentielle Rolle in der Öffnung der α -Ring-Pore zuweisen und unterstrichen damit die Aufgabe des base-Komplexes an diesem Vorgang. Durch die Bindung des 19S Regulators und im Besonderen durch die entstehende Interaktion der base-Subkomplex-Untereinheit Rpt2 mit $\alpha 3/\alpha 4$, kommt es schließlich zu einer Öffnung der zentralen Pore des α-Rings. Dies ermöglicht nicht nur den Eintritt der Peptidsubstrate, sondern ebenso den Austritt der prozessierten Peptidfragmente (Kohler, Bajorek et al. 2001). Neben der beschriebenen α 3-Rpt2 Verbindung werden weitere Rpt- α Interaktionen, z. B. α 1/ α 7-Rpt5, vermutet, die ebenfalls am gating-Prozess beteiligt sein könnten (Groll, Bajorek et al. 2000; Kohler, Bajorek et al. 2001). Zudem wurde für die Untereinheiten Rpn1 und Rpn2 gezeigt, dass sie in Verbindung mit dem Mittlerprotein Rad23b bzw. Rpn10 ebenfalls zur Bindung von Ubiquitin befähigt sind (da Fonseca, He et al. 2012). Wichtige Eigenschaften konnten auch den nicht ATPase Untereinheiten zugeordnet werden. So konnte durch den Nachweis eines Ubiquitin Interacting Motif (UIM) der Untereinheit Rpn10 eine wichtige Rolle bei der Bindung von Ubiquitin-Konjugaten zugewiesen werden. Darüberhinaus trägt Rpn10 wesentlich zur Stabilität des 19S Regulators bei. Glickman et al. zeigten, dass das Fehlen der Rpn10 Untereinheit zu einer vermehrten Dissoziation von lid - und base -Subkomplex führt (Glickman, Rubin et al. 1998). Die Untereinheit Rpn13 besitzt wichtige Eigenschaften für die Vermittlung der Substartbindung (Fu, Sadis et al. 1998; Husnjak, Elsasser et al. 2008).

Der lid-Subkomplex wird aus acht Nicht-ATPase-Untereinheiten Rpn3, Rpn 5-9 und Rpn 11-12 aufgebaut. Er bildet eine scheibenartige Formation aus, die mit dem base-Subkomplex und dem 20S Kernpartikel verbunden ist (Lander, Estrin et al. 2012). Die vollständige Funktion des lid-Komplexes und seiner einzelnen Untereinheiten ist bisher nicht vollständig entschlüsselt. Zwei

vor kurzem erschienene Arbeiten von Lander et al. und Fonseca et al. erbrachten jedoch neue Erkenntnisse über die Struktur des Lid-Komplexes bzw. des 19S Regulators und beschreiben zahlreiche Interaktionen einzelner Untereinheiten. So werden neue funktionelle Aspekte der verschiedenen Untereinheiten diskutiert (da Fonseca, He et al. 2012; Lander, Estrin et al. 2012). Die Untereinheit Rpn11 z.B. ist die einzige essentielle Deubiquitinase des Proteasoms. Es eine Zn²⁺abhängige-Metalloprotease, handelt sich hierbei um die befähigt ist, Isopeptidbindungen zwischen Substrat und Ubiquitin ATP-abhängig zu hydrolysieren (Yao and Cohen 2002; Guterman and Glickman 2004; Verma, Oania et al. 2004). Dem Lid-Komplex, der Untereinheit Rpn2 und die mit ihr verbundenen Untereinheiten Rpn10 und Rpn13 sowie der Untereinheit Rpn11 werden zusammen nun vor allem die Substratbindung, Deubiquitinierung und die Substratweiterleitung zum Zentrum der AAA-ATPasen funktionell zugeordnet (Verma, Oania et al. 2004; Smith, Chang et al. 2007; Husnjak, Elsasser et al. 2008; Lander, Estrin et al. 2012).

1.4 Weitere Regulatoren des 20S Proteasoms

Neben dem sehr gut charakterisierten 19S Regulator existieren noch weitere regulatorisch wirksame Moleküle, die mit dem 20S Proteasom interagieren bzw. es in seiner latenten hydrolytischen Aktivität stimulieren. Der 11S Regulator, oder auch PA28 (Proteasomaktivator 28) genannt, wurde als erstes in Blutzellen von Rind und Mensch entdeckt (Dubiel, Pratt et al. 1992; DeMartino and Slaughter 1999). Es sind bisher drei homologe Proteine des Aktivatormoleküls bekannt, PA28α, PA28β und PA28γ. Die ca. 30 kDa großen PA28 α-und β-Untereinheiten bilden ein Heterohexamer ($\alpha 3/\beta 3$) aus, welches eine ringähnliche Formation mit einer Komplexgröße von ca. 200 kDa ausbildet. Im Zellkern wurden zudem hexamere Ringe aus PA28y beobachtet (Kuehn and Dahlmann 1997; Tanaka and Kasahara 1998; Rechsteiner, Realini et al. 2000). Der PA28 Regulator weist eine stark aktivierende Wirkung auf die Hydrolyse fluorogener Substrate auf, wobei der Regulator selbst keine peptidspaltende Funktion besitzt. Ebenso wie der 19S Regulator bindet auch PA28 an die außen gelegenen α-Ringe des 20S Kernkomplexes. Im Gegensatz zum 26S Proteasom ist der PA28-20S-Proteasom-Komplex nicht zum ubiquitinabhängigen Substratabbau befähigt. Die Bindung von PA28 führt jedoch zu einer Steigerung aller drei peptidspaltenden Aktivitäten (tryptische, chymotryptische und Caspaseähnliche Aktivität) um das ca. 14 fache der Grundaktivität, gemessen mit fluorogenen Substraten (Kuehn and Dahlmann 1997). Die Bindung des PA28 an den α-Ring des 20S Proteasoms induziert eine Konfirmationsänderung desselbigen und fördert, wie auch der 19S Regulator, die

Öffnung der α-Ring Pore. Unter diesen strukturellen Veränderungen kommt es zu einem beschleunigten Eintreten der Peptidsubstrate in das 20S Proteasom und/oder zu einem vereinfachten Auslass der bereits prozessierten Peptide (Stohwasser, Salzmann et al. 2000; Whitby, Masters et al. 2000; Li and Rechsteiner 2001; Sijts, Sun et al. 2002; Sijts and Kloetzel 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des PA28 Regulators vor allem einer Stimulation durch IFN γ unterliegt (Groettrup, Soza et al. 1996). Darüber hinaus wiesen Schwarz et al. nach einer Überexpression von PA28 α und β eine gesteigerte Antigenpräsentation in Fibroblastenzellen nach (Tanaka and Kasahara 1998; Schwarz, Eggers et al. 2000). Versuche mit Zellen aus Milzgewebe zeigten weiter, dass die Deletion des PA28β-Gens einen deutlichen Defekt in der Antigenpräsentaion dieser Zellen und eine gestörte Immunoproteasomassemblierung zur Folge hat (Preckel, Fung-Leung et al. 1999; Noda, Tanahashi et al. 2000). Dem PA28-20S Proteasom-Komplex wird somit vor allem eine wichtige Funktion in der Immunantwort zugeschrieben.

Die Assoziation von einem 19S Regulator an einen α -Ring des 20S Kernkomplexes und die gleichzeitige Bindung eines PA28 Moleküls an den anderen α -Ring desselbigen Kernkomplexes führt zur Bildung des Hybridproteasoms (19S-20S-PA28), eine Regulator-Proteasom Konstellation, die ebenfalls in der Zelle existiert (Hendil, Khan et al. 1998; Tanahashi, Murakami et al. 2000). Es wird vermutet, dass Hybridproteasomen eine Funktion in der zellulären Immunantwort übernehmen. Ihre genaue Aufgabe ist jedoch noch unzureichend bekannt.

1.5 Das Immunoproteasom

Unter dem Einfluss verschiedener immunmodulatorischer Moleküle, vor allem in Anwesenheit des Zytokins γ -Interferon, werden drei weitere proteolytisch aktive β -Untereinheiten (β 1i, β 2i, β 5i) exprimiert und bei der Biogenese anstelle der konstitutiv vorhandenen β 1, β 2, β 5 eingebaut (Rock and Goldberg 1999; Kloetzel 2004). Es entstehen auf diese Weise Immunoproteasomen, welche sich in ihren proteolytischen Eigenschaften von den Standardproteasomen unterscheiden (Griffin, Nandi et al. 1998; Pamer and Cresswell 1998; Noda, Tanahashi et al. 2000). Trotz einer fast identischen Aminosäuresequenz bieten β 1i, β 2i und β 5i einige funktionelle Besonderheiten gegenüber den konstitutiv exprimierten β -Untereinheiten (Tanaka and Kasahara 1998; Rock and Goldberg 1999; Groll and Huber 2005). So konnte gezeigt werden, dass Immunoproteasomen im Vergleich zu Standardproteasomen vor allem Peptidbindungen nach hydrophoben und basischen

Aminosäuren schneiden, wohingegen die Spaltung von Peptidbindungen nach sauren Aminosäuren stark reduziert ist (Bochtler, Ditzel et al. 1999; Rock and Goldberg 1999). Dieses lässt sich auf den Austausch der ß1-Untereinheit zurückführen, die durch die Untereinheit ß1i ersetzt wird (Kuckelkorn, Frentzel et al. 1995; Ustrell, Pratt et al. 1995). Für den Austausch der Untereinheiten ß2 und ß2i konnten bisher keine Unterschiede in der Substratbindung und Prozessierung nachgewiesen werden, die Funktion der Untereinheit ß2i ist daher unzureichend bekannt (Huber, Basler et al. 2012). Untersuchungen der Untereinheit β5i zeigten wichtige molekulare Unterschiede für den Substratbindungsmechanismus dieser Untereinheit und bieten die Möglichkeiten für weitere Entwicklungen von selektiven Inhibitoren für Immunoproteasomen (Huber, Basler et al. 2012). Es wurde postuliert, dass diese Veränderungen in der Schnittpräferenz zu einer Peptidgenerierung mit höherer Rezeptoraffinität für MHC Klasse I Moleküle führen, da die von Immunoproteasomen generierten Peptide mit ihren hydrophoben C-terminalen Enden sehr gut von MHC Klasse I Molekülen gebunden werden können (Goetrupp et al., 1996, Huber et al., 2012). Eine wichtige Funktion des Immunoproteasoms scheint demnach die Prozessierung/Bereitstellung von Peptiden für die MHC-Klasse Ι Molekülpräsentation auf der Oberfläche infizierter Zellen zu sein. Hiefür spricht im Besonderen die schnelle Induktion der Immunproteasomuntereinheiten ß1i, ß2i, ß5i nach der Stimulation durch proinflammatorische Zytokine wie dem y-Interferon (Kloetzel 2004). Die ausgeprägte Präsenz von Immunoproteasomen in professionell antigenpräsentierenden Zellen und sekundären Immunorganen, zum Beispiel der Milz und Lymphknoten sowie in Thymus, spricht ebenfalls für eine Rolle des Immunoproteasoms innerhalb des Immunsystems (Macagno, Gilliet et al. 1999; Sijts and Kloetzel 2011). Jedoch zeigten verschiedene Arbeiten, dass auch nicht infizierte Zellen erhebliche Mengen an Immunoproteasome produzieren, ohne mit einer vermehrten, von MHC-Klasse I Molekülen vermittelte Antigenpräsentation, einherzugehen (Nussbaum, Rodriguez-Carreno et al. 2005). Seifert et al. wiesen daraufhin eine nicht immunologisch assoziierte Funktion der Immunoproteasom nach. Unter der Wirkung von y-Interferon kommt es zu einem verstärkten oxidativen Stress in der Zelle, der zu Schäden an Proteinen und somit zu deren Akkumulierung führen kann. Die daraufhin eintretende verstärkte Synthese von Immunoproteasomen ermöglichte einen im Vergleich zu Standardproteasomen effizienteren Abbau dieser oxidativ geschädigten Proteine. Unter zellulären Stressbedingungen üben Immunoproteasomen demnach eine protektive Funktion in der Zelle aus. Es kann daher angenommen werden, dass Immunoproteasomen eine nicht ausschließlich immunologische Funktion besitzen, sondern vielmehr einen Schutzmechanismus gegen verschiedene zelluläre Stressoren darstellen (Seifert, Bialy et al. 2010).

1.6 Pathologische und physiologische Aspekte des Alterungsprozesses und die Rolle des Proteasoms

1.6.1 Neurodegenerative und weitere altersabhängige Erkrankungen

Altersabhängige Erkrankungen, z. B. die Kataraktbildung, Atherosklerose und im Besonderen die neurodegenerativen Erkrankungen wie die Alzheimer'sche Erkrankung oder der Morbus Parkinson weisen gemeinsame pathophysiologische Merkmale auf, die Hinweise auf eine Beteiligung des UPS bieten (Hipkiss 2006). Es handelt sich um die Akkumulation von fehlgefalteten bzw. geschädigten Proteinen in Form intra- oder extazellulären Protein-Aggregationen (Mori, Kondo et al. 1987; Askanas, Engel et al. 1993). Die Akkumulation von aberranten Proteinen wird als Ausdruck einer gestörten Proteinhomöostase gewertet und weist auf einen möglichen Funktionsverlust des UPS, des autophagisch/lysosomalen Systems oder einer gesteigerten Proteinsynthese hin (Bulteau, Szweda et al. 2006; Hipkiss 2006; Vernace, Schmidt-Glenewinkel et al. 2007).

In verschiedenen Arbeiten wurde ein enger Zusammenhang zwischen dem UPS und neurodegenerativen Erkrankungen hergestellt. Die Beobachtung Ubiquitin und andere Komponenten des UPS seien Bestandteile verschiedener intrazellulärer Proteinaggregate, z. B. der Plaques und Lewy Bodies von Alzheimer- bzw. Parkinson-Patienten, führte zu der Annahme, das UPS und seine Funktionalität seien kausal mit der Pathogenese dieses Krankheitsspektrums verknüpft (Ding, Cecarini et al. 2007; Hegde and Upadhya 2011).

Die Alzheimer'sche Erkrankung (AE) bietet die höchste Prävalenz neurodegenerativer Erkrankungen weltweit und ist der häufigste Grund einer altersbedingten Demenz (Hegde and Upadhya 2011). Das pathologische Korrelat der Alzheimer'schen Erkrankung ist die Akkumulierung von intrazellulärem und extrazellulärem fibrotischen Material in Form von neurofibrillären Knäueln (Tau-Protein-haltige Ablagerungen) bzw. seniler Plaques (β-Amyloidhaltige Ablagerungen). Beginnend an Allo- und Isokortex breiten sich die pathologischen Veränderungen über die Hippocampusformation auf weitere limbische Areale aus. Die Zerstörung der genannten Hirnareale führt schließlich zu den klassischen Symptomen einer demenziellen Erkrankung (Jack 2012). Es wird angenommen, dass die extrazelluläre Ablagerung des A β (1-42) Peptides zu einem progressiven Untergang neuronaler Zellen führt. Die genaue Funktion des A β -Vorläuferproteins und dem damit verbundenen Pathomechanismus sind bisher ungeklärt. Verschiedene Arbeiten zeigten jedoch einen Einfluss von A β -Aggregationen auf die proteasomale Aktivität. Tseng et al. wiesen in *in vitro* Experimenten einen inhibitorischen Effekt von A β -Oligomeren auf die proteasomale Aktivität nach (Tseng, Green et al. 2008). Ein weiteres Merkmal der Alzheimer'schen Erkrankung ist die Akkumulierung des Tau-Proteins. Das Tau-Protein ist ein Mikrotubulus-assoziiertes Protein, welches bei der Alzheimer'schen Erkrankung posttranslationalen Modifikationen unterliegt. Die häufigste Modifikation wird durch eine Hyperphosphorylierung des Proteins erreicht und bildet den Hauptbestandteil der Neurofibrillären Knäuel (auch tangles genannt) (Grune, Botzen et al. 2010). Den Aggregaten aus hyperphosphoryliertem-Tau-Protein konnte ebenfalls ein inhibitorischer Effekt auf die proteolytische Aktivität des 20S Proteasoms zugeschrieben werden (Keck, Nitsch et al. 2003).

1.6.2 Physiologische molekulare Aspekte des Alterungsprozesses

Die Lebenserwartung der Bevölkerung v. a. in den westlichen Industrieländern nimmt stetig zu. Im Jahre 2060 wird nach den Berechnungen des Statistischen Bundesamtes die Lebenserwartung für Männer 85,0 Jahre und für Frauen 89,2 Jahre betragen (Statistisches Bundesamt 2009). Mit dieser erheblichen Steigerung der durchschnittlichen Lebensdauer werden altersabhängige Erkrankungen zunehmend an Bedeutung gewinnen. Für neue therapeutische sowie präventive Ansätze, aber auch für ein besseres Verständnis altersassoziierter Erkrankungen, ist die genaue Untersuchung des Altersprozesses demnach von großer Bedeutung.

Der Alterungsprozess ist ein physiologisches Geschehen, welches im Allgemeinen mit einer langsam fortschreitenden Abnahme zellulärer Funktionen einhergeht (Chondrogianni and Gonos 2005). Zahlreiche zelluläre Prozesse wurden auf altersabhängige Veränderungen untersucht und in der aktuellen Literatur beschrieben. In den meisten Fällen handelt es sich um einen Nachweis von Verlusten verschiedener molekularer Funktionen. Klassische Beispiele sind die Telomer-Verkürzung und die altersabhängige Zunahme von DNA-Schädigungen, welche z.B. durch eine Abnahme verschiedener enzymatischer DNA-Reperaturmechanismen begünstigt wird (Riou, Saffroy et al. 2002; Epel, Blackburn et al. 2004; Hoeijmakers 2009). Des Weiteren werden die mitochondrale Dysfunktion, metabolische Dysfunktionen, z. B. die altersabhängige Abnahme von anabolen Hormonen wie dem Insulin, und die vermehrte Bildung und Akkumulierung von freien Sauerstoffradikalen als altersassozierte Prozesse beschrieben (Levine and Stadtman 2001;

Rocha, Carvalho et al. 2003; Oliveira, Nogueira-Machado et al. 2010; Houtkooper, Argmann et al. 2011; Kowald and Kirkwood 2011; Kriegenburg, Poulsen et al. 2011). Die große Anzahl von Funktionsveränderungen zeigt, dass der Alterungsprozess ein multikausales Geschehen beschreibt, dessen einzelne Komponenten zum Teil eng miteinander verbunden sind und ein komplexes Netzwerk bilden.

Das UPS und seine Komponenten, insbesondere die verschiedenen proteasomalen Komplexe, sind seit geraumer Zeit Gegenstand aktueller Forschungen, um seine Rolle im Alterungsprozess bzw. bei altersabhängigen Erkrankungen zu klären und mögliche therapeutische Ansätze für die oben erwähnten Erkrankungen zu finden.

Die Bestimmung der proteasomalen Aktivität mittels fluorogener Peptidsubstarte in unterschiedlichen Geweben verschiedener Spezies wie Ratte, Maus sowie humanen Zellen zeigte, mit einigen Ausnahmen, eine Abnahme der proteolytischen Aktivität im Alter. So wurde in verschiedenen Organen der Ratte z.B. Muskel, Herz, Lunge, Leber, Niere und Retina eine deutliche Aktivitätsminderung mit zunehmendem Alter der Tiere nachgewiesen. Keller et al. konnten eine altersabhängige Abnahme der proteasomalen Aktivität in Geweben aus Maus, z.B. des Rückenmarks, des Kortex und Hippocampus messen, jedoch konnten keine Aktivitätsverluste im Kleinhirn und Hirnstamm selbiger Tiere beobachten werden (Shibatani, Nazir et al. 1996; Husom, Peters et al. 2004; Ferrington, Husom et al. 2005; Kapphahn, Giwa et al. 2006; Petersen, Honarvar et al. 2010). Versuche mit humanen Fibroblasten und Lymphozyten bestätigten ebenfalls eine Abnahme der peptidspaltenden Funktion von Proteasomen alter im Vergleich zu jungen Spendern (Chondrogianni and Gonos 2005).

Die genannten Untersuchungen beschreiben zwar im Allgemeinen eine altersabhängige Abnahme der proteasomalen Aktivität, jedoch konnte bisher kein einheitliches Bild für die chymotrypische, tryptische und Caspase-ähnlichen Aktivität des Proteasoms für die jeweiligen Gewebe erhoben werden. Die Abnahme der peptidspaltenden Aktivitäten scheint demnach kein generelles, sondern vielmehr ein Zell, Gewebe und Spezies spezifisches Phänomen zu sein, welches weiterergehender Untersuchungen bedarf.

1.7 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von Proteasomen aus Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus alter und junger Ratten. Die Untersuchungen wurden in Gewebehomogenaten angereicherten Proben sowie mit chromatographisch gereinigten Proben durchgeführt. Hierbei sollte der Frage nach einer Veränderung/Anpassung von 20S und 26S Proteasomen während des

Alterungsprozesses in neuronalem Gewebe nachgegangen werden. Es galt die proteasomale Aktivität, Quantität und Untereinheiten-Zusammensetzung von 20S und 26S Proteasomen alter und junger Tiere vergleichend zu analysieren. Dies schien aus den folgenden Gründen von großem Interesse:

Veränderungen der proteasomalen Aktivität können schwerwiegende Veränderungen der zellulären Proteinhomöostase hervorrufen. Dies kann die Akkumulation von Proteinen zur Folge haben und in Zusammenhang mit verschiedenen altersbedingten Pathologien gestellt werden. Es galt demnach die proteasomale Aktivität unter verschiedenen Gesichtspunkten näher zu charakterisieren. Neben der Bestimmung der spezifischen Aktivitäten von 20S und 26S Proteasomen wurden ebenfalls polyubiquitinierte Substrate eingesetzt, die einerseits physiologischen Substraten ähnlicher sind als niedermolekulere Peptidsubstrate und zum anderen eine differenzierte Beurteilung der Aktivität von 26S Proteasomen erlauben.

Es wurde zudem die Quantität der 20S und 26S Proteasomen in alten und jungen Geweben bestimmt, um mögliche altersabhängige Veränderungen im Proteasomgehalt zu untersuchen. Zudem stellt die genaue Quantifizierung der Proteasomen eine essentielle Grundlage für die exakte Berechnung der spezifischen Aktivitäten dar.

Des Weiteren sollten die Proteasomen auf ihre Untereinheiten-Zusammensetzung untersucht werden. Neuronales Gewebe verfügt hauptsächlich über Standardproteasomen, wobei aber über begrenzte Bildung von Immunoproteasomen berichtet worden ist (Mishto, Luciani et al. 2008). Eine gesteigerte Synthese von Immunoproteasomen im Gewebe der verschiedenen Altersgruppen könnte Veränderungen der proteolytischen Aktivität herbeiführen. Es wurden aus diesem Grund die Proteasomen per Western-Blot-Analyse auf ihre Untereinheiten-Zusammensetzung untersucht. Zudem erfolgten die vollständige Reinigung der Proteasomen sowie eine zusätzliche chromatographische Trennung von 20S Proteasom-Subtypen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Geräte

Blockthermostat (Thermomixer comfort) Elektrophorese Einheit Mighty Small II SE250/SE260 Elektrophoresekammer Rocket Elektophoresekammer vertikale **OpsysMR** Plattenreader Feinwaage MC1 Fluorimeter FluoroStar Reader mit Easy Software FPLC Gefrierschrank -20°C Gefrierschrank -80°C Homogenisator Kühlzentrifuge SIGMA 3K15 Kühlzentrifuge Eppendorf 5402 Kühlzentrifuge RC 5C Magnetrührer MR 3001 K Mikrowelle Micro Chef FM 8935 Stromgeber DC PS3000 pH-Meter pH Level 1 Photometer UV-2102 PC Software UV-X101 PC Pipetten Rotor SA300 Rotor SW28 Rotor Ti70 SMART-Sytem Schüttler Semidry- Blot-Kammer Ultraschall Sonoplus GM70 Ultrazentrifuge Beckmann TL-700 Ultrazentrifuge Beckmann L-70 Vortexer VF2

Verbrauchsmaterialien

Centricon Plus-20 Einmalspritzen Eppendorf Reagenzgefäße Mikrotiterplatten, schwarz und klar Molekulargewichtsstandard, prestained Petrischalen Röntgenfilme: Xomat/AR/Biomax-MR PVDF-Membran Immobilon-P Sterilfilter 4,5;0,2 µm Hoefer **Dyner Technologies** Sartorius SLT Amersham Pharmacia Liebherr Puffer hubbard Braun Sigma Eppendorf Sorvall Heidolph Moulinex Hoefer InoLab Shimadzu Gilson Sorvall Beckman Beckman Amersham Pharmacia Heidolph **BioRad** Bandelin Beckman Coulter **Beckman Coulter** Heidolph

Eppendorf

Millipore Braun Eppendorf Greiner Fermentas Greiner Kodak Millipore Schleicher & Schuell Ultrazentrifugenröhrchen Ultraclear 23,5 ml Whatman-Papier

Reagenzien

Acrylamid (30%, 29:1) Acrylamid ultrapure Agarose Ammoniumsulfat Ammoniumpersulfat (APS) β-Mercaptoethanol Bis-Acrylamid (0,8%) Rinder Serum Albumin Fraktion V (BSA) Bromphenolblau Coomassie Brilliant Blue R250 Coomassie Plus Protein Assay Coumarinsäure DEAE Sephacel DMSO DTT Essigsäure Ethanol Fluorogene Peptid-Substrate Formaldehyd Glycerol HEPES Isopropanol Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphosphat Lab-trol-E normal Luminol (3-Aminophtalhydrazid) Magermilchpulver Magnesiumchlorid Methanol **MUC-Substrat** Natriumazid Natriumcarbonat Natriumchlorid Natriumhydroxid Polyethylenglycol 4000 Salzsäure (37%) SDS TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylen-Amin) Trifluoressigsäure Tris Triton-X-100 Tween20 Wasserstoffperoxid

Beckman Coulter Schleicher & Schuell

Roth Serva Serva AppliChem Serva Serva Serva Serva AppliChem Serva Pierce Sigma Amersham Fluka Roth Merck Baker **Bachem-Biochemica Bachem-Biochemica** Roth Roth Baker Roth Roth Merz-Dade Switzerland Fluka Difco AppliChem Baker Biochemie, Charité Roth Sigma AppliChem Applichem Roth AppliChem AppliChem/Serva Serva Fluka Applichem Sigma/Serva Serva Roth

Antikörper

Name	Epitop	Hersteller	Verdünnung für
			Western-Blot
IB5	α1	Cappel	1:5000
Lmp2	β 1i	abcam	1:1000
Lmp7	β 5i	abcam	1:1000
20SX	β 5	abcam	1:1000
Delta	β1	(Kaltoft, Koch et al. 1992)	1:100
MUC	Ub ₅ MUC (950-958) ₄	Charge 14G2, A. Zvirbliene, Institut	1:1000
		for Biotchnology, Vilinus, Litaen	
Mcp 72	α7	(Kaltoft, Koch et al. 1992)	1:100
Antiserum 37	Rattenmuskel 20S	Dahlmann	1:100
Antiserum 87	Rattenleber 20S	Dahlmann	
Anti-UBE2D1	UbcH5a	Sigma Aldrich	1:1000
Ubiquitin	Ubiquitin	DAKO	1:1000
USP14	USP14	Bethyl Laboratories, Inc.	1:1000
Rpn3	Rpn3	Klaves Hendil Kopenhagen	1:1000
UCH37	UCH37	Epitomics, Inc.	1:1000

Gewebe

Für die durchgeführten Experimente wurde Hirngewebe aus männlichen 24 Monate alten und 3 Wochen alten Sprague-Dawley-Ratten eingesetzt. Die Tiere wurden von Zivic Laboratories INC. (New Castle, PA 16103, USA) bezogen. Großhirne, Kleinhirne und Hippocampi (paarweise) wurden durch Zivic-Laboratories entnommen und präpariert. Alle Gewebe wurden bei -80°C gelagert. Insgesamt wurden 20 Großhirne, 20 Kleinhirne und 50 Hippocampi der alten Tiere und 30 Großhirne, 30 Kleinhirne und 70 Hippocami der jungen Tiere für die Experimente eingesetzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Aktivitätstest mittels fluorogener Peptidsubstrate nach Barret (Barrett 1980)

Die Substratstammlösungen wurden mit 10mM in DMSO angefertigt und für den Test entsprechend mit Test-Puffer: 30mM Tris-HCl, 0,5mM DTT, 1mM NaN3, 5mM MgCl2, 10mM KCl, pH 7,5 verdünnt.

200 M Suc-LLVY-AMC, Messung der chymotryptischen Aktivität

400 M Bz-VGR-AMC, Messung der tryptischen Aktivität

400 M Z-LLE-AMC, Messung der Caspase ähnlichen-Aktivität

Durch Spaltung der Peptidbindung zwischen dem C-Terminus des Peptides und der Aminogruppe des 4-Methyl-7-coumarins (AMC) entsteht Aminomethylcumarin, welches eine fluoreszierende Eigenschaft besitzt und gemessen werden kann.

Eine Eichgerade der Fluoreszenzsignale wurde zuvor aus einer Verdünnungsreihe aus AMC-Standardlösung in TEAD-Puffer erstellt.

Für den Test wurden jeweils 20µl der Proteasomprobe mit 20µl der jeweiligen Substratlösung zusammengeführt und für einen bestimmten (testabhängigen) Zeitraum bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenzsignale wurden in einem Fluorimeter bei einer Exzitationswellenlänge von

 $\lambda = 360$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 460$ nm gemessen.

2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford 1976)

20µl der zu bestimmenden Probe wurden mit je 200µl Coomassie Plus-Protein-Reagenz versetzt. Anschließend wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 590nm gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration der untersuchten Probe erfolgte auf der Grundlage einer zuvor erstellten Eichgeraden. Diese wurde in Versuchen mit Lab-Trol-E Proteinstandard generiert.

2.2.3 Nativ-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Nativ-PAGE)

Trenngel-Puffer: 1,8M Tris/HCl, pH 8,8 Sammelgel-Puffer: 1,2M Tris/ HCl, pH 6,8 Nativ-Laufpuffer: 90M Tris, 0,08mM EDTA, 77mM Borsäure, pH 8,3 Nativ-Probenpuffer: 1,2M Tris/HCl, 50% Glycerin, 0,2% Bromphenolblau 30% Acrylamid (w/v), 0,8% Bisacrylamid (w/v) Die Polymerisationsreaktion wurde durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat 10% (w/v) und TEMED initiiert. Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 2,5% und im Trenngel 4,5%. Die Dicke der Gele betrug 0,75mm.

Die Proben wurden mit Nativ-Probenpuffer versetzt und für 1 Minute in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 40 Volt für ca. 16 Stunden bei einer Temperatur von 4°C.

2.2.4 Substrat-Overlay nach Nativ-PAGE

Fluorogene Peptid-Substrate wurden in Test-Puffer: 30 mM Tris-HCl, 0,5 mM DTT, 1mM NaN3, 5mM MgCl₂, 10mM KCl, pH 7,5 gelöst; Endkonzentrationen der Peptidsubstrat waren 100µM für Suc-LLVY-AMC und 200µM für Bz-VGR-AMC und Z-LLE-AMC

Die in der Nativ-PAGE getrennten proteasomalen Enzymkomplexe werden auf ihre peptidspaltende Aktivität getestet, indem das Nativgel in einer Substrat enthaltenden Lösung inkubiert wird. Das in der Lösung befindliche Substrat diffundiert in das Gel und wird vom Enzym gespalten, wobei N–Methylcoumarin freigesetzt und durch UV-Licht sichtbar gemacht wird. Die entstandenen Signale können im Anschluss densitometrisch ausgemessen und miteinander verglichen werden.

2.2.5 Ethanol-Fällung von Proteinen

Die zu fällende Proteinprobe wurde mt dem 2,5-fachen Volumen 100% Ethanol versetzt und gut vermischt. Anschließend wurde die Probe bei –80°C für 2 Stunden gekühlt und über Nacht bei-20°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die Probe für 60 Minuten bei 15000g zentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Das Proteinpellet wurde mit eiskaltem Aceton gewaschen und für 5-10 Minuten auf Eis gestellt. Es folgte eine weitere Zentrifugation (60

Minuten, 15000g, 4°C), um das verwendete Aceton von der Probe zu trennen. Der Acetonüberstand wurde entfernt und die gefällte Probe bei 90°C getrocknet.

Die konzentrierten Proben konnten für die denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese oder 2D-Elektrophorese eingesetzt werden.

2.2.6 TCA Fällung von Proteinen

Für die eindimensionale SDS-Polyacrylamidelektrophorese wurden 1µg Probe mit gleichem Volumen 20% Trichloressigsäure (TCA)-Lösung vermischt und für mindestens 10 Minuten auf Eis gekühlt. Es folgte eine Zentrifugation bei 15000g, 4°C für 60 Minuten. Der Überstand der Probe wurde verworfen und das vorliegende Pellet mit 500µl-1000µl eiskaltem Aceton gewaschen und erneut unter den zuvor erwähnten Umständen zentrifugiert. Der acetonhaltige Überstand wurde entfernt und das Proteinpellet bei 90°C für 5 Minuten getrocknet. Die Proteinpellets wurden für die anschließende Elektrophorese in Probenpuffer aufgenommen und der Elektrophorese zugeführt.

2.2.7 Denaturierende SDS Polyacrylamidgelelektrophorese, nach Laemmli (1970)

Acrylamidlösung: 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid Polymerisationsstart mit Ammoniumpersulfat 10% (w/v), TEMED Trenngel-Puffer (vierfach): 375mM Tris-HCl, 0,1% SDS in dest. H₂O, pH 8,8 Sammelgel-Puffer (vierfach): 125mM Tris-HCl, 0,1% SDS in dest. H₂O, pH 6,8 SDS-Lauf-Puffer: 3% Tris, 14% Glycin, 20% SDS, in dest. H₂O SDS Probenpuffer: 20mM Tris/HCl, pH 6,8, 10% (w/v) Glycerol, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Bromphenolblau in dest. H₂O Molekulargewichtstandard: Prestained-Proteinmarker, Bereich: 10-170kDa Die Acrylamidkonzentration im Trenngel betrug 12,5 %, im Sammelgel 3%. Dicke der Gele 0,75mm oder 1mm.

Die Durchführung der Elektrophorese und Probenvorbereitung erfolgte nach Laemmli (Laemmli 1970). Die Proben wurden mit denaturierendem Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben bei 4°C für 10 Minuten und eine Zentrifugation für weitere 10 Minuten. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen und

anschließend eine Spannung von 80V-120V angelegt. Die Elektrophoresedauer betrug 3-4 Stunden.

2.2.8 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Coomassielösung: 0,1g (w/v) Coomassie Brillant blau R250, 10% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Äthanol, Entfärbelösung: 10% Essigsäure (v/v), 40 % Methanol (v/v)

Die Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel erfolgte durch die Inkubation des Gels in Coomassie-Lösung für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur. Das gefärbte Gel wurde anschließend mit Entfärbelösung gewaschen bis die Proteinbanden bei farblosem Hintergrund gut sichtbar waren.

2.2.9 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Fixierlösung: 50% Methanol, 12%Essigsäure, 0,5% Formaldehyd (37% Stammlösung)
Dehydrierlösung: 50% Äthanol
Reduziererlösung (frisch angesetzt): 0,2mg/ml Natriumthiosulfat-5-hydrat
Färbelösung: 0,5g Silbernitrat, 75µl einer 37%igen Formaldehylösung in 100ml H₂0 gelöst.
Entwicklerlösung (frisch ansetzen): 6g Na₂CO₃, 0,4g Natriumthiosulfat und 50µl einer
37% Formaldehylösung wurden in 100ml H₂O gelöst.
Stoplösung: Fixierlösung/50mM EDTA

Zuerst wird das Gel für 3 x 20 Minuten in der Fixierlösung gewaschen (sollte eine Coomassie-Färbung vorangegangen sein, kann auf diesen Schritt verzichtet werden). Es folgt die Inkubation in der Dehydrierlösung für ebenfalls 3 x 20 Minuten. Das Gel wird für 1 Minute in Reduziererlösung gebadet und für 3 x 20 Sekunden mit dest. Wasser gewaschen. Das Gel verbleibt im Anschluss für 20 Minuten in der Färbelösung bevor sich die Inkubation mit der Entwicklerlösung anschließt und die entsprechenden Proteinbanden sichtbar werden. Bei gewünschter Bandenintensität wird das Gel für 3 x 20 Sekunden mit H₂O dest. gewaschen und wird abschließend für mindestens 20 Minuten mit der Stoplösung inkubiert.

2.2.10 2D-Non-Equilibrium-pH-Gradient-Elektrophorese (2D-NEpHGE)

Die erste Dimension und damit Trennung der Proteine wird durch eine isoelektrische Fokussierung nach dem isoelektrischen Punkt der Proteine erreicht. In der 2. Dimension erfolgt die Trennung durch eine SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht der Proteine. Die Durchführung der Elektrophoresen erfolgte nach der Methode von O'Farrell et al. durchgeführt (O'Farrell, Goodman et al. 1977).

Die 2D-Elektrophoresen wurden freundlicherweise von Sabrina Gohlke am Institut für Biochemie der Charité angefertigt.

2.2.11 Trennung von 20S und 26S Proteasomkomplexen im Rohextrakt mittels Glycerol-Dichtegradientenzentrifugation

Glycerol-Dichtegradientenzentrifugation: Mittels Mischzylinder wurde ein Gradient von 10%bis 40% Glycerol-TSD-Lösung hergestellt. Die angefertigten Gradienten (23,5ml) wurden jeweils mit 500µl des Rohextraktes überschichtet. Die Zentrifugation (Beckman, SW28 Rotor) erfolgte in der Ultrazentrifuge für 24 Stunden bei 25000rpm und 4°C.

Die Gradienten wurden in Fraktionen von jeweils 0,5ml geteilt und jede Fraktion auf ihren Gehalt an chymotryptischer Aktivität mit dem fluorogenen Substrat Suc-LLVY-AMC getestet. Die 20S und 26S Proteasom enthaltenden Fraktionen wurden entsprechend zusammengeführt und die Enzyme mittels einer Ultrazentrifugation im Ti70 Rotor für 21 Stunden bei 44000rpm und 4°C pelletiert. Die entstandenen Proteasompellets wurden jeweils in ca. 1ml TSDG Puffer gelöst und aufgenommen.

2.2.12 Rocket-Immunelektrophorese

Agarose (Serva), Polyethylenglycol 4000, Laufpuffer: HEPES-Puffer 30mM, pH 7,8 Agarose-Bonding-Folien, Ansatz für 10ml ergibt ein Gel mit den Maßen 6,2cm x 7,5cm (L x B), 1% Agaroselösung, 4% Polyethylenglycol 4000, 0,5% Antiserum (gleiche Volumina von Antiserum 87 und 37)

Diese elektrophoretische Methode ermöglicht die Quantifizierung eines Antigens unbekannter Konzentration. Es handelt sich um eine Agargel-Elektrophorese. Im Gel homogen verteilte Antikörper reagieren mit den in der Probe enthaltenen Proteasomkomplexen und formen Antigen-Antikörperkomplexe. Im Laufe der Elektrophorese nehmen diese Komplexe an Größe zu und präzipiteren im Gel. Die durch die entstandenen Präzipitatlinien eingeschlossene Fläche steht in einer linearen Beziehung zu der Antigenmenge in der zu untersuchenden Probe und erlaubt eine Quantifizierung der Proteasomen.

Die Immunelektrophorese wurde abgeändert nach (Weeke 1973) durchgeführt.

Die Depots für die Probenauftragung wurden 2cm von der Unterkante des Gels ausgestochen (Durchmesser: 0,9cm) und ermöglichten die Auftragung von maximal 10µl Probenvolumen. Die Elektrophorese wurde für 16 Stunden bei einer angelegten Spannung von 50V durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 1-24 Stunden mit HEPES-Puffer gewaschen (bei Elektrophorese von Rohextraktproben wurde für 24 Stunden gewaschen, angereicherte Proteasomen für mindestens eine Stunde). Anschließend erfolgte eine Inkubation in 7,5 % Essigsäure für weitere 15-30 Minuten. Das Gel wurde danach getrocknet und mit Coomassie-Blue gefärbt.

Die Größe der angefärbten Präzipitate wurden ausgemessen und die Proteinmenge der Proben anhand zuvor erstellter 20S Proteasom- und 26S Proteasom-Eichkurven quantifiziert, siehe Abbildung 2-2.



Abbildung 2-1 Schematischer Versuchsaufbau der Rocket-Immunelektrophorese (A und B) und Orginal Rocketgel (C). A: Ein polyklonaler Antikörper gegen verschiedene Untereinheiten des 20S Proteasoms wird in einer 1% igen Agaroselösung gelöst und in eine Kassette gegossen. Nach Applikation der jeweiligen Probe in ausgestanzte Depots wird ein Stromfluss angelegt und die Elektrophorese in einer horizontalen Gelkammer gestartet. B: Die Probe wird im Laufe der Elektrophorese durch das Gel getrieben und reagiert mit den im Agarosegel befindlichen Antikörpern. Es entstehen auf diese Weise Antigen-Antikörperkomplexe, die in Abhängigkeit zur Antigenmenge an Größe zunehmen bis diese schließlich präzipitieren. Das entstandenen Präzipitat wird auch aufgrund seiner Form als Rocket bezeichnet, dessen Fläche sich direkt proportional zur applizierten Antigenmenge verhält. C: Rocketgel mit 20S Proteasomen aus Rattenleber für die Eichkurve. Es wurden Proteasomkonzentrationen von 43,9ng-1250ng aufgetragen.



Abbildung 2-2 Eichkurven der Rocket-Immunelektrophorese mit gereinigten Proteasomen aus Rattenleber. A: Eichkurve 20S Proteasom. Die Kurve stellt die Mittelwerte (\pm STAW) mit 20S Proteasomen bekannter Konzentration dar, n = 5, y = 0.0047x, R2 = 0.9898. B: Eichkurve mit gereinigtem 26S Proteasom. Die Kurve enthält die Mittelwerte (\pm STAW) für 26S Proteasomen mit bekannter Konzentration, n = 5, y = 0.0018 x, R2 = 0.9875.

2.2.12.1 Spezifitätstest der 20S Proteasom Antiseren 37 und 87

Das für diese Methode eingesetzte Antiserum eignet sich für die Immunreaktion mit nativen Proteasomkomplexen und zu deren Präzipitation. Eine zuvor durchgeführte 2D Elektrophorese mit anschließender Immundetektion nach Western-Blotting konnte eine Reaktion des Antiserums mit mehrern proteasomalen Untereinheiten des Kernkomplexes nachweisen. Eine durchgeführte Immunpräzipitation zeigte zudem die Bindungsfähigkeit der Antikörper an beiden Proteasomkomplexen, 20S und 26S. Gereinigtes 20S und 26S Proteasom aus Rattenleber wurde mit IgG 87 (siehe Antikörperliste), das an CnBr-aktivierter-Sepharose 4b gekoppelt war, versetzt und inkubiert. Die Probe wurde anschließend zentrifugiert, die Überstände mit ungebundenen Proteasomkomplexen abgenommen und mit diesen Proben eine Nativgelelektrophorese durchgeführt. Anschließend wurde ein Peptidsubstrat-*overlay* durchgeführt, um die Proteasomen zu erkennen, die nicht mit dem an Sephaose 4b gekoppelten Antiserum reagiert haben Das

eingesetzte Verfahren eignet sich nach den durchgeführten Untersuchungen zur Folge für die Quantifizierung beider Proteasomformen.

2.2.13 Präparation von 26S und 20S Proteasomen aus Rattenhirn-Regionen

TSDG-Puffer: 10mM Tris/HCl, 25mM KCl, 1,1mM MgCl₂, 0,1mM EDTA, 1mM NaN₃, 10% Glycerol pH 7,0

Lysepuffer: TSDG-Puffer, pH 7,0

TSDG/500-Puffer: 10% Glycerol pH 7,0, + 2mM ATP (frisch angesetzt), 500mM KCl

Gewebe: Für die Präparation aus Großhirn wurden 8 Großhirn-Hemispheren der alten (24 Mo.) bzw. 10 Hemispheren der jungen (3 Wo.) Ratten eingesetzt. Für die Präparation aus Kleinhirngewebe wurden 12 Kleinhirne der alten (24 Mo.) Ratten und 15 Kleinhirne der jungen (3 Wo.) Ratten verwendet.

Das Hirngewebe wurde von -80°C zuerst für 15 Minuten bei -20°C aufbewart und anschließend bei 4°C aufgetaut. Der Aufschluss des Gewebes erfolgte mit einem Potter. Hierbei wurde dem Gewebe das zehnfache Volumen TSDG-Puffer zugesetzt und 25 x bei 1500rpm gepottert. Die so behandelten Lysatproben wurden für 60 Minuten bei 14000rpm zentrifugiert. Der hierbei entstandene Probenüberstand wurde für die weitere Präparation abgenommen. Die Isolierung von 20S und 26S Proteasomen erfolgte anschließend mittels verschiedener Reinigungsschritte (siehe Abbildung 2-3).



Abbildung 2-3 Flussdiagramm der chromatographischen Schritte zur Reinigung von 20S und 26S Proteasomen. Die Präparation erfolgte nach Dahlmann et al. und wurde bei 4°C durchgeführt (Dahlmann, Kuehn et al. 1995). Als erster gemeinsamer Reinigungsschritt erfolgte eine Anionenaustauscher-Chromatographie, die auch zur Trennung von 20S und 26S Proteasomen führte, für die jeweils weitere unterschiedliche Reinigungsschritte notwendig waren.

Schritt 1: DEAE-Toyopearl Anionenaustauscher

Eine DEAE-Toyopearl-Suspension haltige Säule (Volumen 13ml), äquilibriert in TSDG-Puffer, wurde mit der zuvor gewonnenen Rohextraktprobe beladen. Die Proteinkomplexe binden an die positiv geladene Gelmatrix und werden mittels eines linearen Salzgradienten (25mM KCl - 350mM KCl in TSDG) eluiert. Nach der Proteinelution wurden die Fraktionen entsprechend ihrer proteolytischen Aktivität (Substrat: Suc-LLVY-AMC) und des Elutionsprofils in 20S und 26S Proteasomen unterteilt und für die weitere Präparation verwendet. Die Proteasomproben wurden anschließend in der Ultrazentrifuge (Ti70 Rotor) für 21 Stunden bei 44000rpm und 4°C pelletiert. Das 26S Proteasom enthaltene Pellet wurde in TSDG/2mM ATP, das 20S Proteasom in TSDG-Puffer aufgenommen und den unten genannten Präparationsschritten unterzogen.

Das Vorliegen intakter 20S und 26S Proteasomkomplexe wurde mittels einer Nativgelelektrophorese und anschließendem Substrat-Overlay (Suc-LLVY-AMC, 100µM) überprüft (siehe Kapitel 2.2.3 und 2.2.4).

2.2.13.1 Isolierung von 26S Proteasomen

Schritt 2: Gelfiltration mit Sepharose 6

Die Gelfiltration ermöglicht eine Trennung von Proteinkomplexen nach ihrer Größe. Für die Chromatographie der Proben wurde eine Gelfiltrationssäule mit einem Volumen von 450ml gewählt und mit der 26S Proteasomprobe beladen. Die Elution erfolgte im *free-flow*. Die Fraktionen (3ml) wurden auf ihre proteolytische Aktivität mit dem Suc-LLVY-AMC Substrat getestet und entsprechend vereint.

Schritt 3: Arginin-Sepharose (FPLC)

Die zuvor gewonnene Proteasomprobe der Sepharose 6 Chromatographie wurde auf eine Arginin-Sepharose-Säule (Säulenvolumen 8ml) geladen und die Proteine mittels eines linearen KCl-Gradientens (25mM - 350mM KCl) in der FPLC eluiert. Nach Test der Fraktionen hinsichtlich ihres Gehalts an proteolytischer Aktivität wurden die entsprechenden Fraktionen vereinigt und anschließend die Proteasomprobe durch Pelletierung in der Ultrazentrifuge (Ti70-Rotor, 45000rpm, 21 Stunden, 4°C) konzentriert. Das resultierende Pellet wurde in TSDG/2mM ATP-Puffer gelöst und dem nächsten Präparationsschritt zugeführt.

Schritt 4: Glycerol-Dichtegradienten-Zentrifugation

Glycerol wurde in TSD/2mM ATP gelöst und ein Glycerol-Gradient (20% - 40%) hergestellt. Die Beladung erfolgte mit 1,5ml Probe. Die Zentrifugation in der Ultrazentrifuge wurde unter dem Einsatz eines SW 28 Rotors bei 25000rpm für 24 Stunden und 4°C durchgeführt. Nach Fraktionierung des Gradienten wurden die gewonnenen Fraktionen auf ihre peptidspaltende Aktivität mit dem fluorogenen Substrat Suc-LLVY-AMC getestet. Aufgrund der unterschiedlichen Größe und Gestalt der 20S und 26S Proteasomen konnten die 20S Proteasomen in Gradientenschichten geringerer Dichte und die 26S Proteasomen in Schichten höherer Dichte nachgewiesen werden. Die so gewonnenen Enzym-Proben wurden getrennt voneinander mittels Ultrazentrifugation (Ti70-Rotor, 45000rpm, 21 Stunden bei 4°C) konzentriert. Die Proteasomkonzentrationen wurden anhand einer Rocket-Immunelektrophorese ermittelt und die Aktivitäten der Proteasomen mittels der Substrate Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC und Bz-VGR-AMC gemessen.
2.2.13.2 Isolation von 20S Proteasomen

Schritt 2: Superose 6 Gelfiltraion (FPLC)

Die nach der DEAE-Toyopearl-Chromatographie erhaltene und mittels Ultrazentrifugation konzentrierte 20S Proteasom-Probe wurde auf eine Superose 6-Gelfiltrationssäule aufgetragen (Volumen 200ml, äquilibriert in TEAD-Puffer: 20mM Tris/HCl, 1mM EDTA, 1mM NaN₃, 1mM DTT, pH 7,5). Die Suc-LLVY-AMC-hydrolysierenden Fraktionen wurden vereinigt und dem nächsten Reinigungsschritt zugeführt.

Schritt 3: MonoQ Anionenaustausch-Chromatographie (FPLC)

MonoQ ist ein starker Anionenaustauscher. Die Säule wurde in TEAD-Puffer äquilibriert und die gebundenen Proteine mittels eines linearen NaCl-Garadienten (25mM -500mM NaCl) eluiert. In den Proteasom enthaltenden Fraktionen ließ sich anschließend eine proteolytische Aktivität mit dem Substrat Suc-LLVY-AMC nachweisen.

Schritt 4: Resource-Phenylsuperose- Säule (FPLC)

Die Resource-Phe-Säule wurde mit 1,2M $(NH_4)_2SO_4$ gelöst in TEAD äquilibriert. Die nach MonoQ Chromatographie erhaltene Probe wurde mit $(NH_4)_2SO_4$ bis zu einer Endkonzentration von 1,2M versetzt und dann auf die Resource-Phe Säule aufgetragen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem von 1,2M – 0M absteigenden $(NH_4)_2SO_4$ Gradienten. Die 20S Proteasom enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und gegen TEAD-Puffer dialysiert.

2.2.14 Trennung einzelner Proteasom-Subtypen mittels Anionenaustauschchromatographie am SMART-System

Puffer A: TEAD: 20mM Tris/HCl, 1mM EDTA, 1mM NaN₃, 1mM DTT, pH 7,5; Puffer B: TEAD/ 0,5M NaCl, pH 7,5

Eine MiniQ PC 3.2/2 Säule wurde mit 10µg Protein pro Chromatographie-Durchlauf beladen. Die Elution der 20S Proteasomen erfolgte entlang eines linearen NaCl-Gradienten (6ml). Bei einer maximalen Flussrate von 100µl/min, Fraktionsgröße: 52µl und einer Laufdauer ca. 35 Minuten. Die Detektion der eluierten Proteine erfolgte bei einer Wellenlänge von 280nm. Eine fortlaufende Leitfähigkeitsmessung der durchlaufenden Probe galt der Kontrolle des korrekt ablaufenden Salzgradienten. Die getrennten Subtypen der verschiedenen Läufe einer Probe wurden vereinigt und mit dem Suc-LLVY-AMC-Substrat getestet.

2.2.15 Abbau von poly-ubiquitinierten Substraten durch isolierte 26S Proteasomen

2.2.15.1 Ub₅-MUC₄-Substratverdau durch 26S Proteasomen

Puffer: 50mM Tris/HCl, pH 7,5, 10mM KCl, 0,5mM DTT, 5mM MgCl2, 2mM ATP
70nM 26S Proteasom aus Rattengroßhirn bzw. Rattenkleinhirn
600nM Ub₅-MUC₄ Substrat 5xUb-(MUC 950-958)₄ (freundlicherweise von Dr. D. Bech-Otschir überlassen)
eingesetzte Antikörper: anti-MUC₉₅₀₋₉₅₈ und anti-α1 (proteasomale Untereinheit)
26S Proteasomen isoliert aus Großhirn- bzw. Kleinhirngewebe

Das Mucin-Protein (kodierendes Gen = MUC-1) zählt zu der Familie der Typ 1 Transmembranproteine und wird von vielen physiologisch vorkommenden sekretorischen Epithelzellen exprimiert. Zudem gilt das MUC-Protein als potentielles Tumor-Antigen und kann in zahlreichen malignen Erkrankungen verstärkt nachgewiesen werden (Hanisch and Muller 2000; Julian, Dharmaraj et al. 2009). Das Epitop für die MHC-Klasse I abhängige Präsentation auf der Zelloberfläche wird durch das Proteasom generiert (Bech-Otschir, Helfrich et al. 2009). Für die Untersuchung des ATP-abhängigen Proteinabbaus durch das 26S Proteasom wurde von Bech-Otschir und Kollegen ein tetra-ubiquitiniertes Protein generiert. Hierfür wurde eine Tetra-Ubiquitinkette an ein Lysin eines weiteren Ubiquitinmoleküls gebunden, welches über Hexa-Histidin schließlich mit dem MUC-Protein (MUC 950-958)₄ verbunden ist und von 26S Proteasomen abgebaut werden kann, siehe Abbildung 2-4 (Bech-Otschir, Helfrich et al. 2009).



Abbildung 2-4 Schematischer Aufbau des poly-ubiquitinierten MUC-Substrates. Die Tetra-Ubiquitinkette ist über das Lysin48 eines am N-Terminus mit Histidin markierten Ubiquitins an das MUC Derivat gebunden. Das MUC-Protein beinhaltet das viermal aneinandergereihte MUC 950-958 Epitop. nach Bech-Otschir et al. (Bech-Otschir, Helfrich et al. 2009)

Die Pufferlösungen wurden kurz vor dem Start des Experiments zusammen pipettiert und anschließend H₂0, 26S Proteasom und Ub₅₋MUC₄-Substrat zugefügt.

Nach der Zugabe des Substrates wurde die Probe gut vermischt und bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert. Zu den folgenden Zeitenpunkten (0, 20, 40 und 80 Minuten) wurden jeweils 10µl des Probenansatzes abgenommen, mit 5µl Probenpuffer versetzt und bei 90°C denaturiert. Nach Beendigung des Substratverdaus wurden die Proben der jeweiligen Zeitpunkte auf einem SDS Polyacrylamidgel (1mm) getrennt und auf eine PVDS-Membran mittels Semi-Dry Western-Blot übertragen. Die Membran wurde mit MUC-Antikörpern und einem Proteasom-Antikörper gegen die α 1-Untereinheit inkubiert. Die densitometrische Auswertung der entstandenen Signale des MUC-Proteins erlaubte die Beurteilung des Substratabbaus durch das Proteasom. Durch Detektion der proteasomalen Untereinheit α 1 wurde nachgewiesen, dass die gleiche Menge an 26S Proteasomen in den jeweiligen Proben waren. Zum Nachweis eines ausschließlich proteasomal erfolgten Proteinabbaus wurden Kontrollen mit dem Proteasominhibitor MG132 (100 M) durchgeführt.

2.2.15.2 PolyUb_{K48}-UbcH5a Substratverdau durch 26S Proteasomen

TSDG-Puffer ohne ATP

1 g 26S Proteasom aus Rattengroßhirn bzw. Rattenkleinhirn

2 g polyUb_{K48}-GST-UbcH5a (freundlicherweise von Dr. P. Sheppard und Dr. T. Nicholson, ENZO, überlassen)

eingesetzte Antikörper: anti-UBcH5a und anti-a1 (proteasomale Untereinheit) UBcH5a-

Bei dem eingesetzten Substrat handelt es sich um ein Klasse 1, E2 (ubiquitin conjungating enzyme). Als E2 verfügt UbcH5a über eine hochkonservierte Ubc-Domäne (ubiquitin conjugating domain), welche die Bindung von Ubiquitin ermöglicht. UbcH5a ist u.a. in den Abbau von p53, I κ B α und fehlerhaften Proteinen involviert. Hierbei weist UbcH5a eine besondere Präferenz für die Ausbildung von Polyubiquitinketten an K11, K48 und K63 von Ubiquitin auf. (Brzovic and Klevit 2006; Ravid and Hochstrasser 2008; van Wijk and Timmers 2010).

Für die durchgeführten Versuche wurde polyUb_{K48}-GST-UbcH5a als Substrat eingesetzt. Dieses mit GST-markierte (E2) Enzym kann als Auto-poly-ubiquitiniertes Protein und demnach Substrat isoliert werden, wenn es zuvor mit E1 und Ubiquitin inkubiert wurde (Cooper, Heath et al. 2004).

Für den Versuch wurde TSDG-Puffer, H₂O, 26S Proteasom und das polyUb-GST Ubch5a-Substrat zusammen pipettiert. Der Versuch erfolgte nach dem Protokoll der Ub₅-Muc₄-Verdaus (2.2.15.1). Der eingesetzte Antikörper in der Western-Blot-Analyse ist gegen das UbcH5a-Protein gerichtet und wurde als Nachweis für den Proteinabbau eingesetzt.

2.2.16 Aktivierung der chymotryptischen Aktivität der 26S Proteasomen durch polyubiquitinierte Substrate

2.2.16.1 Aktivierung der chymotryptischen Aktivität des Proteasoms durch Abbau des Ub_5-MUC_4 -Substrats

30nM 26S Proteasom, 300nM Ub₅-MUC₄-Protein, 100µM Suc-LLVY-AMC

Der Versuch erfolgte nach dem Protokoll von Bech-Otschir et al. 2009. Für den Versuch wurden 30nM 26S Proteasom mit jeweils 300nM Ub₅-Muc₄-Substrat versetzt und für 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 100µM des fluorogenen Substrates Suc-LLVY-AMC

dazugeben und für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert bevor dessen Hydrolyse fluorometrisch gemessen wurde.

2.2.16.2 Aktivierung der chymotryptischen Aktivität des Proteasoms durch das polyUb_{K48}-UbcH5a-Protein

26S Proteasom und UbcH5a-Protein wurden in einem 1:2 Verhältnis eingesetzt (g/g),
100μM Suc-LLVY-AMC
Der Versuch wurde nach dem Protokoll von 2.2.16.1 durchgeführt.

2.2.17 Western-Blot

Blotting-Puffer: 50mM Tris-HCl, 40mMGlycin Whatman-Paper TBS: 20mM Tris/HCl, 0,5M NaCl. 1mM Natriumazid TTBS: 20mM Tris/HCl, 0,5M NaCl, 1mM Natriumazid, 0,1 % Tween 20 Blockierungslösung: 5 % Magermilchpulver Antikörperverdünnungslösung: 2% Magermilchpulver in TTBS-Puffer ECL: Lösung A: 5ml 0,1M Tris/HCl pH 8,0 / 22μl 90mM Cumarinsäure gelöst in DMSO / 50μl 250mM Luminol (3-Aminophtalhydrazid) gelöst in DMSO. Lösung B: 5ml 0,1M Tris/HCl pH 8,0 / 3μl 30 % H₂O₂ Filme: Kodak, Xomat/AR/Biomax-MR

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen erfolgte im diskontinuierlichen Semi-dry-Verfahren aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran.

Die bereitgestellten PVDF-Membranen wurden zuvor mit einer 100% Methanollösung für mindestens 20 Sekunden aktiviert und mit H₂O dest. gewaschen. Anschließend erfolgte eine Äquilibration der Membran, des Polyacrylamidgels und der Whatman-Papiere mit dem eingesetzten Blotting-Puffer für mindestens 2 x 10 Minuten. Es wurde der folgende Aufbau für das Western-Blot-Verfahre gewählt: Kathodenplatte, 1x Whatman-Papier, Polyacrylamidgel, PVDF-Membran, 1x Whatman-Papier, Anodenplatte. Der Proteintransfer erfolgte bei 16V für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Spezifischer Nachweis von Proteinen mittels Immundetektion

Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurden die mit Protein beladenen PVDF-Membranen mit Blockierungslösung für mindestens 30 Minuten gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit der entsprechenden Primär-Antikörperlösung zur Detektion der zu untersuchenden Proteine über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss 2 x 10 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen und mit dem POD-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit TTBS-Puffer für jeweils 10 Minuten und eine Waschung mit TBS –Puffer bis die Signaldetektion mit ECL erfolgte.

Die Lösungen für die ECL Detektion wurden stets frisch zubereitet und im Dunkeln aufbewahrt. Die Lösungen A und B wurden zusammengegeben und mit der PVDF-Membran für 1 Minute inkubiert. Die eingesetzten Antikörper und entsprechende Verdünnungen sind unter Punkt 2.1angegeben.

2.2.18 Densitometrische Auswertung von Signalen nach Immundetektion

Die densitometrische Auswertung der Western-Blotsignale und Substrat-Overlay-Signale (Nativgeleletrophorese) erfolgte nach dem Einscannen der Gele mit dem Computerprogramm Image J. Die Messungen wurden nach den Angaben des Programmanbieters durchgeführt.

2.2.19 Statistik

Dargestellte Werte beschreiben, wenn nicht anders angegebenden, Mittelwert +/- SEM. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm SIGMA STAT 3.0 durchgeführt. Es wurden vornehmlich die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den erhobenen Messdaten junger und alter Tiere mit Hilfe des student's-t-Test untersucht. Der Mann-Whitney Rank-Sum Test wurde nur eingesetzt, wenn die Normalität oder gleiche Varianz nicht gegeben waren. Die statistischen Signifikanzen wurden dabei wie folgt festgelegt und mit den jeweiligen Symbolen (*) gekennzeichnet: p-Wert < 0.05*, p- Wert <0.01** und p- Wert < 0.001***.

3 Ergebnisse

3.1 Erarbeitung einer Methode zur Trennung von 20S und 26S Proteasomen aus Hirngewebe-Extrakten

Ein Mangel an Methoden, die eine zügige und schonende Separierung der verschiedenen proteasomalen Komplexe innerhalb eines Gewebes ermöglichen, führte zu der Notwendigkeit, eine entsprechende Methode zu etablieren. Im Verlauf dieser Arbeit wurden drei verschiedene Strategien verfolgt, die eine Trennung von 20S und 26S Proteasomen aus einem Gewebelysat erlauben. Dabei kamen die folgenen Methoden zum Einsatz: 1. 2D-Nativ-Elektrophorese des Gewebeextrakts, 2. Elektroelution der Enzyme aus einem Nativgel mit anschließender Quantifizierung und 3. Dichtezentrifugation des Gewebeextrakts. Die unterschiedlichen Verfahren sind in den Abbildung 3-1 bis 3-3 näher dargestellt. Im Verlauf setzte sich die Dichtezentrifugation zur Trennung der proteasomalen Komplexe durch, da ausschließlich mit dieser Methode eine reproduzierbare Trennung und damit quantitative Bestimmung der proteasomalen Komplexe gelang.



Abbildung 3-1 Schematische Darstellung der 2D Rocketelektrophorese.

A: In der 1. Dimension erfolgte die Trennung der 20S und 26S Proteasomen in der Lysatprobe in einem 3,5% Polyacrylamid-Nativgel. Nach der Elektrophorese wurde ein Substrat-Overlay durchgeführt, um die 20S und 26S Proteasomproteinbanden darzustellen. Die fluoreszierenden anschließend ausgeschnitten Proteinbanden wurden und in ein Agarose-Rocket-Immunelektrophoresegel eingegossen. Anschließend wurden in der 2. Dimension die Proteine aus dem Nativgelstück in das antikörperhaltige Agarosegel getrieben. Die geformten Antikörper-Proteasomkomplexe präzipitierten in einer antigenkonzentrationsabhängigen Weise (siehe Material und Methoden). Abbildung B zeigt eine Aufnahme eines 2D Rocketgels. Es sind das eingebettete Nativgelstück und das in der 2. Dimension entstandene Präzipitat sichtbar.



Abbildung 3-2 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Elektroelutionsversuches.

In einem ersten Schritt erfolgte eine Trennung der Proteasomen innerhalb der Geweberohextrakte mittels einer Nativgelelektrophorese (3,5% iges Polyacrylamidgel). Nach der Elektrophorese wurde ein Substrat- *overlay* durchgeführt. Die Fluoreszenzsignale im Nativgel zeigten die Proteasomenenthaltenden Proteinbanden, die ausgeschnitten wurden. In einem zweiten Schritt erfolgte eine Elektroelution der Proteasomen. Dazu wurden die Nativgelstücke in ein Plastikröhrchen mit permeabler Membran gelegt. Das Röhrchen wurde in eine horizontale Elektrophoresekammer gelegt und ein Stromfluss angelegt. Die im Röhrchen befindliche Pufferlösung sollte am Ende des Versuches das sich im Gelstück befindliche Proteasom enthalten. In der Pufferlösung konnte eine peptidspaltende Aktivität nachgewiesen werden, jedoch konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse mit dieser Methode erreicht werden.

Mit Hilfe der Dichtezentrifugation gelang es, 20S und 26S Proteasomen aus Gewebeextrakten reproduzierbar zu separieren und diese weiterführend zu untersuchen. Die Verwendung des frischen Gewebeextraktes sollte zum einen mögliche Artefakte durch mehrschrittige chromatographische Verfahren minimieren und zum anderen eine möglichst schonende und physiologische Umgebung für die zu untersuchenden Proteasomen gewährleisten.

In dieser Arbeit wurden 20S und 26S Proteasomen aus einer Probe gewonnen und individuell weiterführend untersucht. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen umfassten eine anschließende Quantifizierung beider Komplexe und die Untersuchung der proteolytischen Aktivität. Des Weiteren wurden die angereicherten Proteasomen auf ihre Untereinheiten-Zusammensetzung untersucht und verglichen. Es sollten altersabhängige Unterschiede in der proteasomalen Quantität, proteolytischen Aktivität und strukturelle Veränderungen zwischen Proteasomen der verschiedenen Hirnarealen junger und alter Ratten analysiert werden.

Proteasomen aus drei Regionen des ZNS (Großhirn, Kleinhirn und der hippocampalen Region) wurden für die Versuche ausgewählt und auf altersabhängige Unterschiede Ergebnisse

untersucht. Nach der Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die Fraktionen des Gradienten auf ihre proteolytische Aktivität mit dem fluorogenen Substrat Suc-LLVY-AMC getestet. Es konnten vier Peaks mit einer chymotryptischen Aktivität nachgewiesen werden (Abb 3-3A). Um unter diesen die proteasomalen Komplexe zu identifizieren, wurde die Aktivität der vier proteolytisch aktiven Peaks auch in Anwesenheit des spezifischen Proteasominhibitor Lactacystin gemessen. Hier zeigte sich ein inhibitorischer Effekt auf alle vier Aktivitätspeaks (Abb3-3B), so dass nicht ersichtlich war, welche dieser Aktivitätspeaks auf die Existenz verschiedener Proteasomenkomplexen zurückzuführen war. Aus dem Grunde wurden aus Human-Erythrocyten isolierte 20S und 26S Proteasomen unter gleichen Bedingungen auf Glycerolgradienten zentrifugiert und somit Standard-Gradienten erstellt. Dieses Vorgehen ermöglichte schließlich die 20S und 26S Proteasomen innerhalb des Dichtegradienten zu lokalisieren und anhand des Sedimentationsverhaltens 20S und 26S Proteasomen aus Hirngewebeextrakt zu identifizieren (Abb 3-3C).

Die proteolytische Aktivität, die bei ca 15% Glycerol eluierte, wurde mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert, wobei jedoch keine proteasomspezifischen Proteinbanden nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Eine Gelfiltration der Probe mittels Superose 6 ergab, dass es sich um eine Protease von 105 kDa Größe handeln muß. Vigouroux et al. wiesen eine Protease mit eben diesen Eigenschaften in humanem Hirngewebe nach (Vigouroux, Furukawa et al. 2003). Eine detaillierte biochemische Charakterisierung dieser Protease liegt in der aktuellen Literatur bisher nicht vor. Die gewonnenen Daten verdeutlichen, dass eine Auftrennung von Gewebelysaten aus Hirnmaterial unerlässlich für eine zuverlässige Messung der chymotryptischen Aktivität von Proteasomen ist.



Abbildung 3-3 A: Trennung der unterschiedlichen proteasomalen Komplexformen aus Großhirn-Extrakt mittels eines 10-40% Glycerol-Gradienten. Die einzelnen Fraktionen (0,5ml) wurden mit dem fluorogenen Substrat Suc-LLVY-AMC (chymotryptische Aktivität) getestet, wobei vier Aktivitätspeaks, I, II, III und IV detektiert werden konnten. B: Die Peakfraktionen von Peak I, II, III und IV wurden in Anwesenheit (schwarze Säulen) von 50 μ M Proteasominhibitor Lactacystin (LC) und ohne diesen (weiße Säulen) auf ihre chymotryptische Aktivität untersucht. C: Isolierte 20S Proteasomen (schwarze Vierecke) und 26S Proteasomen (weiße Vierecke), isoliert aus Human-Erythrocyten, wurden jeweils auf einen 10-40% Glycerol-Gradienten aufgetragen, zentrifugiert und ihre Wanderungsgeschwingigkeit in den Elutionsfraktionen durch Messung ihrer Suc-LLVY-AMC spaltenden Aktivität nachgewiesen.

3.2 Trennung von 20S und 26S Proteasomenn aus Geweberohextrakt von Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus junger und alter Ratten mittels Glycerol-Dichtegradienten-Zentrifugation

In nachfolgenden Experimenten wurden jeweils auf parallel laufenden Gradienten, die Hirngewebe-Extrakte von jungen (Alter 3 Wochen) und alten (Alter 24 Monate) Ratten zentrifugiert, so dass deren Proteasom-Profile direkt miteinander verglichen werden konnten.



Abbildung 3-4 Trennung von 20S und 26S Proteasomen aus Gewebeextrakten mittels Dichtezentrifugation im Glycerol-Gradienten. A Großhirn , B Kleinhirn, C Hippocampus. Auf der rechten Seite sind jeweils die Gradienten mit Gewebe der jungen Tiere und auf der linken Seite das der alten Tiere abgebildet. Es wurden Dichtegradienten von 10%-40% Glycerol angefertigt und mit Rohextraktproben aus Gewebe der verschiedenen ZNS-Regionen beladen. Durchschnittlich wurden die Gradienten mit 10-15mg/500µl Protein beladen. Die einzelnen Fraktionen von jeweils 0,5ml wurden nach der Zentrifugation mit dem fluorogenen Peptidsubstrat Suc-LLVY-AMC auf proteolytische Aktivität getestet.

Ergebnisse

Wie in den Abbildungen gezeigt und näher im Kapitel "Material und Methoden' beschrieben, lassen sich in den einzelnen Glycerolgradienten vier proteolytisch aktive Peaks nachweisen. Zwei dieser Peaks sind in den Fraktionen 14-27 (32% und 30% Glycerol) lokalisiert, ein Peak in den Fraktionen 28-40 (25%) und ein letzter zwischen Fraktion 54-68 (15% Glycerol). Dabei handelt es sich bei ersterem um 30S und 26S Proteasomkomplexe, im Bereich von 25% Glycerol um 20S Proteasomen. Da eine entsprechende Separierung von 30S und 26S Proteasomen nicht möglich war, wurden diese als 26S Proteasomprobe zusammengefügt. Bei einer Glycerolkonzentration von 15% konnte zudem die bereits oben beschriebene 105 kD nicht proteasomale Protease nachgewiesen und abgetrennt werden, so dass Ungenauigkeiten in der Aktivitätsmessung und damit auch Berechnung der spezifischen Aktvität von 26S und 20S Proteasomen minimiert werden konnten.

Das Sedimentationsverhalten der vier proteolytisch aktiven Peaks wies im Mittel keine altersabhängigen Veränderungen auf und zeigte ein ähnliches Verteilungsmuster von 20S und 26S Proteasomen innerhalb der Glycerol-Gradienten. Zur weiteren Charakterisierung wurden die einzelnen Fraktionen zu jeweils einer 20S und 26S Proteasomprobe vereinigt.

3.3 Quantifizierung von 20S und 26S Proteasomen aus Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus junger und alter Ratten im Vergleich

Für die Beantwortung der Frage nach möglichen quantitativen Unterschieden des Proteasomengehaltes in jungem und altem Gewebe des ZNS (Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus) wurde eine Quantifizierung der enzymatischen Komplexe mittels Rocket-Immunelektrophorse gewählt. Es wurden die Proteasom-Gesamtmengen in den Gewebehomogenaten bestimmt und eine individuelle Quantifizierung von 20S und 26S Proteasomenn vorgenommen. Die Trennung der 20S und 26S Proteasome erfolgte in der zuvor durchgeführten Dichtegradientenzentrifugation. Verglichen wurden zudem der Proteingehalt derselben Proben und die Gewichte der einzelnen Hirnareale.

3.3.1 Quantifizierung der 20S und 26S Proteasomen aus Großhirngewebe

Die Großhirne der 24 Monate alten Tiere waren signifikant schwerer als die Großhirne der drei Wochen alten Tiere. Zudem wurde eine signifikant höhere Proteinmenge im Gewebe der alten Tiere im Vergleich zu dem der jungen Tiere nachgewiesen. Die Proteasomgesamtmenge in beiden Altersgruppen unterschied sich jedoch nicht, so dass die Proteasomkonzentration im Großhirn der alten Tiere um ca. 20% geringer war als im Gewebe der jungen Tieren (Abb. 3-5). Nach der Trennung von 20S und 26S Proteasomen wurde deren Gehalt ebenfalls quantifiziert. Es zeigten sich weder Unterschiede im 26S noch 20S Proteasomgehalt im Großhirngewebe beider Altersgruppen. So blieb auch das Verhältnis von 26S/20S Proteasomen im Gewebe mit zunehmendem Alter nahezu unverändert. Die einzelnen Messdaten sind in der folgenden Tabelle 3-1 wiedergegeben.

А				
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Jung	6	19,617	1,303	0,009**
Alt	6	26.250	0,966	
В				
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Jung	5	393,000	18,491	0,841
Alt	5	402,800	24,784	
С		•		
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Jung	4	102,750	35,457	0,982
Alt	5	103,502	54,970	
D		·	•	
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Jung	5	285,335	40,937	0,960
Alt	6	282,926	26,567	
E	•	•	•	
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Jung	9	1,0	28,9	0,001***
Alt	9	1,5	16,7	

 Tabelle 3-1 Messungen im Gewebehomogenat aus Großhirn alter und junger Tiere

A: Proteingesamtmenge (mg/Großhirn)

B: Proteasomgesamtmenge (μ g/Großhirn)

C: 20S Proteasomgesamtmenge (µg/Großhirn)

D: 26S Proteasomgesamtmenge (µg/Großhirn)

E: Organgesamtgewicht Großhirn (g)

Statistik: student's t-test, signifikant p< 0.05*, p< 0,01**, p< 0,001***

3.3.2 Quantifizierung von 20S und 26S Proteasomen aus Kleinhirngewebe

Das Kleinhirngewebe junger und alter Sprague Dawley-Ratten wurde ebenfalls auf die Proteasomgesamtmenge, Proteingesamtmenge und das Gewicht des einzelnen Organs untersucht.

Das Organgewicht der alten Ratten lag hierbei signifikant über dem der jungen Tiere. Im Rohextrakt des Kleinhirngewebes konnten ähnliche Beobachtungen wie in den Untersuchungen des Großhirns festgestellt werden, d.h., es zeigte sich ein statistisch signifikant höherer Proteingehalt im Kleinhirngewebe der alten Tiere, jedoch keine alterabhängige Veränderungen der Proteasomgesamtmenge, so dass der proteasomale Anteil am Gesamtprotein im Gewebe der alten Tiere deutlich (ca. 30%) vermindert war (Abb. 3-5). Es zeigte sich keine alterabhängige Veränderung des Verhältnisses von 26S/20S Proteasomen. Die Daten sind in der Tabelle 3-2 zusammengefasst.

А				
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Jung	7	7,514	0,289	0,001***
Alt	7	11,236	0,772	
В	•	÷	•	
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Jung	7	124,66	11,368	0,843
Alt	7	128,50	15,527	
С			•	
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Jung	6	39,808	4,04	0,187
Alt	6	31,102	4,64	
D	•	÷	•	
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Jung	7	81,035	10,971	0,469
Alt	7	69,032	11,323	
E	•	÷	•	
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Jung	6	0,33	0,007	0,007**
Alt	6	0,45	0,035	

Tabelle 3-2 Messungen im Gewebehomogenat aus Kleinhirn junger und alter Tiere

A: Proteingesamtmenge (mg/Kleinhirn)

B: Proteasomgesamtmenge (g/Kleinhirn)

C: 20S Proteasomgesamtmenge (µg/Kleinhirn)

D: 26S Proteasomgesamtmenge (µg/Kleinhirn)

E: Organgesamtgewicht Kleinhirn (g)

Statistik: student's t-test, signifikant p< 0.05*, p< 0,01**, p< 0,001***

3.3.3 Quantifizierung von 20S und 26S Proteasomen aus Hippocampusgewebe

Wie in Tabelle 3-3 zusammengefasst, wiesen auch die Hippocampi der alten Tiere einen signifikant höheren Proteingehalt im Vergleich zu denen der jüngeren Tiere auf. Der Proteasomgehalt blieb jedoch nahezu unverändert, so dass auch hier die Proteasomkonzentration bei den alten Tieren um ca. 36% verringert war (Abb. 3-5).

Auch im Hippocampus änderte sich das Verhältnis von 26S/20S Proteasomen mit zunehmendem Alter nicht.

А				
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Jung	4	1,805	0,110	0.051
Alt	4	2,627	0,320	
В				
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Jung	4	32,470	4,079	0,688
Alt	4	29,325	6,256	
С				
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Jung	4	6,532	1,393	0,548
Alt	4	8,213	2,243	
D				
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Jung	5	23,083	2,309	0,530
Alt	5	20,230	3,601	
E				
	Anzahl	Mittelwert	SEM	P<
Alt	12	0,069	0,032	0,025*
Jung	15	0,011	0,012	

Tabelle 3-3 Messungen im Gewebehomogenat aus Hippocampus junger und alter Tiere

A: Proteingesamtmenge (mg/g Hippocampus)

B: Proteasomgesamtmenge (µg/g Hippocampus)

C: 20S Proteasomgesamtmenge (µg/g Hippocampus)

D: 26S Proteasomgesamtenge (µg/g Hippocampus)

E: Organgesamtgewicht Hippocampus (g)

Statistik: student's t-test, signifikant p< 0.05*, p< 0,01**, p< 0,001***



Großhirn Kleinhirn Hippocampus

Abbildung 3-5 Prozentualer Anteil der Proteasomen an der Gesamtproteinmenge der verschiedenen ZNS-Regionen. Weiß: junge Tiere, schwarz: alte Tiere. Abgebildet ist der prozentuale Proteasomanteil (gemessen mittels Rocket-Elektrophorese) an der gemessenen Proteingesamtmenge (bestimmt mittels Bradford) pro Hirngewebe (Großhirn, Kleinhirn, Hippocampus).

3.4 Untersuchungen der proteolytischen Aktivität von 20S und 26S Proteasomen aus Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus junger und alter Ratten

3.4.1 Vergleich der proteasomalen Aktivität in Hirngeweben von jungen und alten Ratten mittels Nativgel-Elektrophorese und Substrat-Overlay

Die angefertigten Rohextraktproben aus Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus der alten und jungen Sprague Dawley-Ratten wurden auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoriert. Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte eine Inkubation des Nativgels mit dem fluorogenen Peptidsubstrat Suc-LLVY-AMC (Substrat-*overlay*). Das mit Substratlösung inkubierte Gel wurde auf einen UV-Tisch gelegt und fotografiert (Abb 3-6). Es zeigten sich unterschiedliche Signalintensitäten zwischen den Proben der alten und jungen Tiere, welche erste Hinweise auf Unterschiede in der proteasomalen Aktivität zwischen alten und jungen Tieren gaben. So zeigten die Rohextraktproben aus Rattengroßhirn, Kleinhirn und Hippocampus eine höhere Signalintensität in den Proben der jungen Tiere.



Abbildung 3-6 Nativgelelektrophorese mit Rohextrakten aus Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus mit anschließendem Substrat-*overlay*

Jeweils zwei verschiedene Mengen (Angaben in μ g) von Rohextraktproben aus (A) Großhirn, (B) Kleinhirn, (C) Hippocampus von jungen (J) und alten (A) Ratten wurden auf einem 4,5% Nativgel getrennt und die peptidspaltende Aktivität anschließend mit dem fluorogenen Substrat Suc-LLVY-AMC im *overlay* getestet. Die Gele wurden jeweils für 15 Min. bei 37 °C mit der Substratlösung inkubiert. Zur Kontrolle wurden 20S und 26S Proteasomen gereinigt aus Human-Erythrocyten parallel elektrophoriert. In Abbildung A sind die Positionen des 30S, 26S und 20S Proteasoms im Gel gekennzeichnet.

3.4.2 Untersuchungen altersabhängiger Veränderungen der proteasomalen Aktivität in Hirn-Geweben alter und junger Ratten

Die peptidspaltende Enzymfunktion von 20S und 26S Proteasomen aus Großhirn alter und junger Tiere wurde mit drei fluorogenen Substraten, nämlich Suc-LLVY-AMC, Bz-VGR-AMC und Z-LLE-AMC, gemessen, wodurch die chymotryptische, tryptische und Caspaseähnliche Aktivitäten des Proteasoms unterschieden und analysiert werden konnten. Die Messungen wurden sowohl in Gewebeextrakten, als auch für die 20S und 26S Proteasomen nach deren Trennung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. In jedem Fall wurde sowohl die Gesamtaktivität, d.h. pmol Substratumsatz/Minute Inkubationszeit x Gesamtvolumen der Probe (pmol/min), als auch die spezifischen Aktivitäten, d.h. pmol Substratumsatz/Minute Inkubationszeit x μ g Proteasom (pmol/min x μ g) bestimmt.





Abbildung 3-7 Proteasomale Gesamtaktivitäten (pmol/min x Gesamtgewebe) gemessen mit fluorogenen Substraten in Gewebeextrakten der Hirnregionen junger (weiße Balken) und alter (schwarze Balken) Tiere. Großhirn (A), Kleinhirn (B), Hippocampus (C). Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Aktivitäten der jungen und alten Tiere.

Wie in Abbildung 3-7 zusammengefasst, waren die alterabhängigen Veränderungen der proteasomalen Gesamtaktivitäten in den Gewebeextrakten der drei Hirnregionen statistisch nicht signifikant.

3.4.2.2 Bestimmung der spezifischen 20S und 26S Proteasom- Aktivitäten im Großhirn

Die 20S Proteasomen aus dem Großhirngewebe der alten Tiere zeigten eine deutliche Abnahme der spezifischen chymotryptischen Aktivität im Vergleich zu den jungen Tieren (Abb 3-9A). Die Messungen der tryptischen und Caspase-ähnlichen Aktivitäten der 20S Proteasomen gaben keine Hinweise für altersabhängige Veränderungen dieser peptidspaltenden Funktion der Proteasomen (Abb 3-8B, C).

Für die 26S Proteasomen wurden ähnliche Veränderungen der chymotryptischen Aktivität gemessen. Es konnte eine signifikante Veränderung der spezifischen chymotrypsin-ähnliche Aktivität der 26S Proteasomen nachgewiesen werden, während die tendenzielle altersabhängige Abnahme der spezifischen tryptischen und Caspase-ähnlichen-Aktivität unterhalb einer statistischen Signifikanz blieb (Abb 3-8B,C).

Bei den 26S Proteasomen war in beiden Altersgruppen die Caspase-ähnliche-Aktivität die höchste der drei Aktivitäten. Dies galt bei den 20S Proteasomen jedoch nur für die 24 Monate alten Tiere, während sich bei den jungen Tieren die chymotryptische als höchste Aktivität zeigte.

3.4.2.3 Bestimmung der spezifischen 20S und 26S Proteasom- Aktivitäten im Kleinhirn

Nach der Trennung von 20S und 26S Proteasomen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation zeigten die spezifischen Aktivitäten, die chymotryptische und Caspase-ähnliche-Aktivität, signifikante Unterschiede zwischen beiden Altersgruppen. Die 20S Proteasomen aus dem Gewebe der jungen Tiere wiesen eine chymotryptische Aktivität von 6,4pmol/min x μ g auf, welche sich im Alter auf eine Aktivität von 1,8 pmol/min x μ g verringerte (Abb. 3-8A). Ebenso war die spezifische Caspase-ähnliche Aktivität im Gewebe der alten Tiere mit 4,4 pmol/min x μ g signifikant niedriger als die Aktivität (8,9pmol/min x μ g) der 20S Proteasomen aus jungem Kleinhirngewebe (Abb 3-8C).

Während die 26S Proteasomen aus Kleinhirngewebe der alten Ratten eine Reduktion der spezifischen chymotryptischen Aktivität aufwiesen, zeigten die Caspase-ähnliche und tryptische Aktivität keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Jung und Alt auf.

3.4.2.4 Bestimmung der spezifischen 20S und 26S Proteasom- Aktivitäten im Hippocampus

Die Messungen der spezifischen chymotryptischen, tryptischen und Caspase-ähnlichen Aktivität der 20S Proteasomen aus hippocampalem Gewebe zeigten keine altersabhängigen Veränderungen, während Unterschiede in der Aktiviät der 26S Proteasomen sichtbar waren. Die spezifische chymotryptische Aktivität der alten Tiere lag mit Werten von 1,7 pmol/min x μ g deutlich unterhalb der Aktivität der 26S Proteasomen aus Gewebe der jungen Tiere mit 3,4 pmol/min x μ g und erreichte mit p < 0,05 statistische Signifikanz (Abb. 3-8A).

Da sowohl in Großhirn, Kleinhirn als auch Hippocampus keine altersabhängigen Veränderungen in der totalen Proteasommenge gemessen wurden, sich die spezifischen Aktivtäten der 20S und 26S Proteasomen jedoch altersabhängig veränderten, verhalten sich die Gesamtaktivtäten (pmol/min) entsprechend.



Abbildung 3-8 Spezifische Aktivitäten der angereicherten 20S und 26S Proteasomen aus den unterschiedlichen Regionen des ZNS (Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus). Abgebildet sind die spezifischen Aktivitäten (pmol/min x μ g) der angereicherten 20S und 26S Proteasomproben nach ihrer Trennung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. Für die Berechnung wurden die Daten der Quantifizierung der Proteasomen mittels Rocket-Immunelektrophorese verwendet. Die Diagramme zeigen die spezifischen Aktivitäten gemessen mit Suc-LLVY-AMC (A), Bz-VGR-AMC (B), Z-LLE-AMC (C). Statistik: student's t-test, statistische Signifikanz ab p-Werten < 0,05*, < 0.01**.

3.5 Untersuchung der Untereinheiten-Zusammensetzung von 26S Proteasomen aus Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus alter und junger Tiere

3.5.1 Reinigung und Charakterisierung von 26S und 20S Proteasomen aus Großhirn und Kleinhirn alter und junger Ratten

Um die Untereinheitenzusammensetzung und proteinspaltenden Eigenschaften der Proteasomen zu untersuchen, wurden 26S und 20S Proteasomen des Großhirns und Kleinhirns beider Altersgruppen in modifizierter Form nach Dahlmann et al (Dahlmann, Ruppert et al. 2000) isoliert und vollständig gereinigt (näher beschrieben in Kapitel 2.2.13). Die Abbildungen 3-9A –D zeigen Nativgele, welche den hohen Reinheitsgrad der isolierten 20S und 26S Proteasomenproben nachweisen. Im Substra*t-overlay* der Nativgele (nicht gezeigt) konnten die Proteinbanden mit einer peptidspaltenden Aktivität den jeweiligen Proteasomen zugeordnet werden und weisen auf eine bestehende Integrität der Enzymkomplexe hin.



Abbildung 3-9 Die abgebildeten Gele zeigen die isolierten 26S und 20S Proteasomen einer Präparation aus Großhirngewebe (A und B) und Kleinhirngewebe (C und D). A: Zeigt ein Nativgel, welches mit jeweils 4µg der 26S Proteasomprobe der alten Tiere (II) und jungen Tiere (III) beladen wurde. Zur Größenmarkierung diente 20S Proteasom, isoliert aus humanen Erythrocyten (I). B: SDS-PAGE isolierter 26S Proteasomen aus Großhirn junger (1) und alter (3) Ratten. Es wurden jeweils 2 g der 26S Proteasomprobe aufgetragen. Die Spalte 2 enthält Molekulargewichts-Proteinmarker (17-130 kDa). Nachweis der Proteinbanden erfolgte mit einer Coomassie-Blue Färbung. C: Das Nativgel wurde mit jeweils 4 g der vollständig isolierten 26S (II) und 20S (III) Proteasomprobe aus Kleinhirngewebe der jungen Tiere, bzw. mit ebenfalls 4 g 26S (IV) und 20S (V) der alten Tiere beladen und eine Elektrophorese durchgeführt. Als Größenkontrolle dienten 3 g 26S Proteasomen aus humanen Erythrocyten (I) D: SDS-Elektrophorese-Gel der 26S Proteasomproben von jungen (1) und alten (3) Ratten (Auftrag jeweils 2µg) Spur 2: Molekulargewichts-Größenmarker. Gelfärbung: Coomassie-Blue

Ergebnisse

Die Messungen mit gereinigten 20S und 26S Proteasomen aus Großhirngewebe zeigten eine Abnahme der spezifischen Aktivität in alten gegenüber jungen Ratten. Die deutlichsten Veränderungen im Sinne einer Abnahme der peptidspaltenden Aktivität konnte für die chymotryptische Aktivität verzeichnet werden. Die Caspase-ähnliche und tryptische Aktivität zeigten nur bei den untersuchten 20S Proteasomen eine altersabhängige Reduktion. Die 26S Proteasomen hingegen zeigten keine Unterschiede zwischen den genannten Aktivtäten.

Aus unerklärlichen Gründen waren die zuvor beobachteten altersabhängigen Veränderungen der spezifischen Aktivitäten in den gereinigten Proben aus Kleinhirngewebe nicht nachzuweisen.

3.5.2 Untersuchungen der Untereinheiten-Zusammensetzung der 26S Proteasomen

Um strukturelle Veränderungen als Ursache der Aktivitätsunterschiede zwischen Alt und Jung beurteilen zu können, wurden die isolierten Proteasomen aus Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus auf ihre Zusammensetzung der proteolytisch aktiven β-Untereinheiten untersucht. Dies geschah mittels Immunoblot-Analyse. Die Proteasomen wurden von einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran überführt. Im Anschluss erfolgte die spezifische Immundetektion der konstitutiven proteasomalen Untereinheiten ß2 und ß5 sowie der Immunountereinheiten ß1i und ß5i. Der Nachweis der Untereinheiten ß2 und ß2i konnte nicht durchgeführt werden, da keine spezifischen Antikörper gegen diese Proteasomen-Untereinheiten aus Rattengewebe vorliegen. Die durchgeführten Western-Blot-Analysen der 26S Proteasomen aus Großhirn und Kleinhirn erbrachten den Nachweis einer sich im Alter veränderten Zusammensetzung der proteolytisch aktiven Untereinheiten in Proteasomen des ZNS. Während eine Isolation von Proteasomen aus Großhirn und Kleinhirn möglich war, konnten die genannten Untersuchungen im Hippocampus nur an angreicherten Proteasomen durchgeführt werden, da eine vollständige Reinigung von Proteasomen aus der hippocampalen Region junger und alter Tiere aufgrund von unzureichenden Gewebemengen nicht möglich war.

3.5.2.1 Western-Blot -Analysen der Untereinheiten-Zusammensetzung von Proteasomen aus Großhirn

Im Gewebe des Großhirns wiesen die 26S Proteasomen der alten Tiere einen deutlich höheren Anteil an β 5i Untereinheiten auf, welches mit einer gleichzeitigen Abnahme der konstitutiven Untereinheit β 5 einherging. Der Nachweis der Untereinheiten β 1 und β 1i zeigten ein ähnliches Bild. Es konnte sowohl bei den alten als auch den jungen Tieren die Untereinheit β 1i nachgewiesen werden, wobei die Signalstärke der β 1i Signale in den Proben der alten Tiere ausgeprägter war (Abb. 3-10).

3.5.2.2 Western-Blot-Analysen der Untereinheiten-Zusammensetzung von Proteasomen aus Kleinhirn

Die 26S Proteasomen aus Kleinhirngewebe wiesen ebenfalls ein vermehrtes Vorliegen von Immunountereinheiten in den Proben der alten Tiere auf. Die Untereinheit β 1i konnte jedoch in beiden Altersgruppen nachgewiesen werden. Unterschiede in der Signalstärke in der Immundetektion konnten nicht beobachtet werden und zeigten sowohl bei den jungen Tieren als auch bei den alten Tieren ein Signal von ähnlicher Intensität. Das konstitutiv exprimierte Korrelat dieser Immunountereinheit, die Untereinheit β 1, erbrachte wesentlich stärkere Signale in der Western-Blot-Aanalyse mit den Proben der jungen Tiere im Vergleich zu denen der alten. Die proteasomale Immunountereinheit β 5i hingegen konnte ausschließlich in den Proteasomproben der alten Tiere nachgewiesen werden. Gleichzeitig zeigten die Proteasomen aus jungem Kleinhirngewebe zeigten deutlich höhere Signale der konsitutiven β 5 Untereinheit, welche wiederum in den Proben der alten Tiere kaum nachweisbar war (Abb. 3-13).

3.5.2.3 Western-Blot-Analysen der Untereinheiten-Zusammensetzung von Proteasomen aus Hippocampus

Die angereicherten Proteasomen aus der hippocampalen Region beider Altersgruppen wurden mittels des gleichen Verfahrens nachgewiesen. Die Immundetektion der Untereinheit β 1i erbrachte ein nur schwaches Signal in den Proben der jungen Tiere. Die entsprechende konstitutive Untereinheit β 1 ergab hingegen ein deutlich stärkeres Signal. Die Proteasomen der alten Tiere zeigten annähernd gleich starke Signale für die Untereinheiten β 1i und β 1. Ähnliche Daten konnten für die Untereinheiten β 5i und β 5 erhoben werden. Im Gewebe der jungen Tiere konnte kein Signal für die Immunountereinheit β 5i erzielt werden, jedoch ergab die Detektion der konstitutiven Untereinheit β 5 ein kräfiges Signal. Die Hippocampi der alten Tiere hingegen zeigten deutliche Signale in der Immundetektion für beide Untereinheiten, β 5 i und β 5 (Abb. 3-10).



Abbildung 3-10 Western-Blot-Analyse von 26S Proteasomen aus Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus. Jeweils 3µg 26S Proteasom, isoliert und gereinigt aus Großhirn und Kleinhirn alter und junger Ratten sowie 5µg 26S Proteasom aus Hippocampus alter und junger Ratten (nach Anreicherung SDS-PAGE Glycerolgradienten-Zentrifugation) mittels wurden einer unterzogen. Als Positivkontrollen wurden 0,5µg 20S Proteasom aus Rattenmilz (Immunoproteasom) und 0,5µg 20S Proteasom aus Rattenmuskel (Standardproteasom) eingesetzt. Es erfolgte der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western-Blot-Verfahren. Anschließend erfolgte eine spezifische Beladung des SDS-Gels mit den Proteasomen zu kontrollieren, wurde die proteasomale Untereinheit α 1 nachgewiesen.

3.5.3 2D Elektrophorese von Proteasomen aus Großhirn und Kleinhirn

Da die beobachteten Signalstärken in der Immundetektion unzureichenden Aufschluss über die tatsächliche Menge der untersuchten Untereinheiten bieten, wurden komplett gereinigte 20S Proteasom-Proben zusätzlich durch eine 2D-Elektrophorese analysiert. Die Separierung und anschließende Färbung der einzelnen proteasomalen Untereinheiten mittels dieser Elektrophoresetechnik ermöglicht eher eine Interpretation der jeweils vorliegenden Proteinmenge. Es wurden 20S Proteasomen aus Großhirn und Kleinhirn untersucht und jeweils beide Altersgruppen vergleichend gegenübergestellt. Eine Untersuchung von Proteasomen aus Hippocampus konnte aufgrund von unzureichenden Probemengen nicht durchgeführt werden. Die Abbildung 3-11 zeigt die Ergebnisse der 2D-Elektrophorese von Kleinhirn.

Nach der Färbung des 2D-Gels mit Coomassie-Blue konnten die einzelnen proteasomalen Untereinheiten durch den Vergleich mit 2D-Elektrophoresegelen von 20S Proteasomen aus Ratten-Leber und Ratten-Herzmuskel (Schmidt et al, 2006; Kloss et al, 2009) markiert werden. Es zeigte sich sowohl bei den Proben der alten als auch bei denen der jungen Tiere ein typisches Proteinmuster der proteasomalen Untereinheiten. Altersabhängige Unterschiede konnten für die Immunountereinheiten ß1i, ß2i und ß5i beobachtet werden. Während in den Proben der alten Tiere ein deutlich sichtbarer Proteinpunkt für die Untereinheit ß5i sichtbar war, konnte dieser im Material aus jungem Kleinhirngewebe nicht nachgewiesen werden. Für die Untereinheit ßli konnte ein ähnliches Ergebnis festgestellt werden, jedoch war dieser wesentlich schwächer gefärbt als der 65i Proteinpunkt derselben Probe. Die 62i Untereinheit konnte ebenfalls ausschließlich in Kleinhirn der alten Tiere nachgewiesen werden. Die 2D Elektrophorese ermöglicht somit den Nachweis altersabhängiger Veränderungen im Vorliegen dieser Proteasomuntereinheit. Demnach konnten auf Proteinebene die Immunountereinheiten β1i, β2i und β5i im Gewebe des Kleinhirns alter Ratten nachgewiesen werden, während in den Proteasomproben der jungen Tiere nur die konstitutiven Untereinheiten β_1 , β_2 und β_5 nachweisbar waren. In der 2D-Elektrophorese der Proteasomen Großhirngewebe aus alter Tiere konnten ebenfalls Proteinpunkte für die Immunountereinheiten nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die 2D-Elektrophoresegele der Proben aus Kleinhirngewebe sind in der Abbildung 3-14 dargestellt.



Abbildung 3-11 2D-Elektrophoresegele mit 20S Proteasomen aus Kleinhirngewebe junger und alter Ratten. JUNG: Kleinhirn 3 Wochen alte Tiere, $30\mu g$ isoliertes 20S Proteasom. ALT: Kleinhirn, 24 Monate alte Tiere, $30\mu g$ isoliertes 20S Proteasom. pH-Gradient: 3-10; die 2D-Gele wurden anschließend mit Coomassielösung gefärbt.

3.6 Trennung von Proteasom-Subtypen aus Rattengroßhirn und -kleinhirn

Die hochauflösende Anionenaustauscherchromatrographie ermöglicht eine weiterführende Trennung von 20S Proteasomen, resultierend aus unterschiedlichen Oberflächenladungen der Enzymkomplexe. 20S Proteasomen isoliert aus verschiedenen Rattenorganen zeigten ein charakteristisches Elutionsprofil (Dahlmann, Ruppert et al. 2000). Änderungen in diesem Profil unterliegen vermutlich zum einen strukturellen Veränderungen der 20S Proteasomen, im Sinne einer veränderten Zusammensetzung der proteasomalen Untereinheiten, zum anderen werden posttranslationale Modifikationen der einzelnen Untereinheiten-Proteine diskutiert, die insgesamt zu einer veränderten Oberflächenladung führen können (Zong, Young et al. 2008; Huber, Basler et al. 2012). Die Proteasomen können somit nach ihrem Elutionszeitpunkt innerhalb des NaCl-Gradienten in unterschiedliche proteasomale Subtypen Ergebnisse

unterteilt werden (Näheres siehe Kapitel 2.2.14). Für diese Arbeit wurden gereinigte 20S Proteasomen aus Großhirn bzw. Kleinhirn alter und junger Tiere mittels Chromatographie an einer MiniQ PC 3.2/3 Säule in proteasomale Subtypen getrennt und hinsichtlich ihrer proteolytischen Eigenschaft untersucht.

3.6.1 20S Proteasom Subtypen aus Rattengroßhirn beider Alterstufen

Die Chromatographien der 20S Proteasomen aus Rattengroßhirn beider Altersgruppen zeigten unterschiedliche Proteinelutionsprofile (Abbilldung 3-12). Die 20S Proteasomenpopulationen der alten wie auch der jungen Tiere enthielten jeweils drei Subtypen (I, II, III), die sich jedoch in ihrer quantitativen Verteilung unterschieden. Subtyp I war im Profil der jungen Tiere stärker vertreten als in dem der alten Tiere, wohingegen der Subtyp III bei den alten Tieren dominanter war. Der Subtyp II unterschied sich zwischen beiden Altersgruppen kaum. In der Abbildung 3-12B ist das chymotryptische Aktivitätsprofil dargestellt, welches mit Hilfe des fluorogenen Substrates Suc-LLVY-AMC erstellt wurde. Es konnte entlang des gesamten Proteinspektrums des Chromatogramms chymotryptische Aktivität in den Fraktionen der Chromatographie der Proteasomen aus jungem und altem Großhirngewebe gemessen werden, wodurch deren Integrität und Funktionalität nachgewiesen wurde. Zudem konnten Unterschiede in den Aktivitäsprofilen beobachtet werden. Die Proteasomen der jungen Tiere wiesen die höchste Aktivität in den Fraktionen des Subtyps I auf, während die Proteasomen der alten Tiere die höchste chymotryptische Aktivität im Bereich des Subtyps II zeigten. Zusätzlich wurden die Fraktionen mittels Western-Blot und anschließender spezifischer

Immundetektion einiger proteasomaler Untereinheiten untersucht. Aufgrund zu geringer Proteinkonzentrationen konnten aber keine ausreichenden Signale nachgewiesen werden.



Fraktion



Abbildung 3-12 A: Subtypentrennung von 20S Proteasomen aus Rattengroßhirn alter und junger Tiere. Für die Trennung der proteasomalen Komplexe mittels MiniQ-Anionenaustauscher-Chromatographie wurden jeweils $10\mu g$ 20S Proteasom pro Chromatographielauf eingesetzt. Die Proteasomen der alten Tiere (---) eluierten zwischen 295mmol und 323mmol NaCl, die der jungen Tiere im Bereich von 296 - 318mmol NaCl, so dass ein direkter Vergleich der Chromatographien beider Altersgruppen möglich ist.

B: Messung peptidspaltender Aktivität in den einzelnen Fraktionen. Jede Fraktion (50µl) wurde mit dem fluorogenen Substrat Suc-LLVY-AMC (100µM) versetzt und für 16 Stunden bei 37C° inkubiert und anschließend gemessen. (\triangle) junge Tiere; (\blacksquare) alte Tiere

3.6.2 20S Proteasom Subtypen aus Rattenkleinhirn beider Alterstufen

Die chromatographische Trennung der 20S Proteasomen Subtypen aus Rattenkleinhirn junger und alter Tiere zeigte deutliche, altersabhängige Unterschiede im Proteinelutionsprofil. Sowohl die Anzahl der einzelnen Elutionspeaks als auch in deren Verteilungsmuster waren zwischen den 20S Proteasomen der jungen und alten Tiere verschieden. Das Proteasomelutionsprofil der jungen Tiere wies drei Subtypen (I-III) auf, während das Spektrum der alten Tiere zwei zusätzliche Peaks (IV und V) im hinteren Bereich des Salzgradienten enthielt. Subtyp I war bei den jungen Tieren stärker vertreten als bei den alten Tieren. Der Subtyp III war wie im Gewebe des Großhirns der dominantere Subtyp bei den alten Tieren. Der Subtyp II zeigte auch bei den 20S Proteasomen aus Kleinhirn keine altersabhängigen Unterschiede. Die Elutionsprofile beider Altersstufen sind in der Abbildung 3-13 dargestellt. Es wurden ebenfalls alle Fraktionen der Chromatographie auf eine vorliegende chymotryptische Aktivität getestet und die jeweiligen Aktivitätsprofile miteinander verglichen. Die Subtypen I-III der jungen und alten Tiere zeigten keine auffallenden Unterschiede in der chymotryptischen Aktivität. Die Subtypen IV-V, welche nur in der Probe der alten Tiere nachweisbar waren, wiesen entsprechend des zunehmenden Anteils an Immunoproteasomen eine gut messbare chymotryptische Aktivität in den jeweiligen Fraktionen auf. In den entsprechenden Fraktionen der Chromatographie mit 20S Proteasomen der jungen Tiere konnte keine Aktivität detektiert werden. Der Versuch, die unterschiedlichen proteasomalen Untereinheiten mittels Immundetektion nachzuweisen, konnte auch hier aufgrund der geringen Proteinmengen nicht erfolgen.

Ergebnisse



Abbildung 3-13 A: Subtypentrennung von 20S Proteasomen aus Rattenkleinhirn alter und junger Tiere. Für die Trennung der proteasomalen Komplexe mittels MiniQ-Anionenaustausch-Chromatographie wurden jeweils 10µg 20S Proteasom pro Chromatographielauf eingesetzt. Die Proteasomen der alten Tiere (---) eluierten zwischen 305mmol und 333mmol NaCl, und die der jungen Tiere (-) im Bereich von 306 - 331mmol NaCl, sodass ein direkter Vergleich der Chromatographien beider Altersgruppen möglich ist. **B**: Nachweis der peptidspaltenden Aktivität in den einzelnen Fraktionen der Chromatographien. Jede Fraktion (50µl) wurde mit dem fluorogenen Substrat Suc-LLVY-AMC (100µM) versetzt und für 16 Stunden bei 37C° inkubiert und anschließend gemessen (Δ) junge Tiere; (**II**) alte Tiere.

Ergebnisse

3.7 Abbau poly-ubiquitinierter Substrate durch 26S Proteasomen aus Großhirn und Kleinhirn junger und alter Ratten

Der Einsatz von fluorogenen Substraten zur Messung der peptidspaltenden Aktivitäten von Proteasomen stellt ein sehr gut etabliertes und häufig angewandtes Verfahren zur Beurteilung der proteasomalen Funktion dar. Bei den genannten Substraten handelt es sich jedoch um einfache Tripeptide bzw. Tetrapeptide, die sowohl vom 20S als auch 26S Proteasom gespalten werden können und deren Abbau ubiquitinunabhängig erfolgt. Um die Funktion der 26S Proteasomen aus Großhirn und Kleinhirn alter und junger Tiere detaillierter zu charakterisieren, wurden zusätzlich zwei poly-ubiquitinierte Substrate für weitere Funktionsanalysen eingesetzt. Es handelt sich um ein penta-ubiquitiniertes lineares Tetramer eines Nonapeptids (Aminosäuren 950-958) aus dem MUC-1 Protein (Ub₅-MUC₄) und um das polyubiquitinierte GST-UbcH5a-Protein (polyUb-GST-UbcH5). Der Abbau beider Substrate durch gereinigte 26S Proteasomen aus Großhirn- und Kleinhirn- und Kleinhirngewebe beider Altersgruppen wurde untersucht und verglichen.

3.7.1 Abbau des Substrats $\mathrm{Ub}_5\text{-}\mathrm{MUC}_4$ durch 26S Proteasomen aus Groß- und Kleinhirngewebe

26S Proteasomen, isoliert aus Rattengroßhirn alter und junger Tiere, wurden mit Ub₅MUC₄ Substrat für insgesamt 80 Minuten inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden Aliquots entnommen und die Menge nichtabgebauten Substrats mittels SDS-Elektrophorese und anschließendem Western/Immunblot detektiert. Die Stärke der Substratproteinbande (Abb. 3-14A) wurde anschließend densitometrisch quantifiziert. Wie in Abb. 3-15A ersichtlich, konnte innerhalb des Messzeitraumes von 80 Minuten ein 50%iger Abbau des Ub₅-MUC₄-Substrates durch die 26S Proteasomen der alten Ratten beobachtet werden, während die 26S Proteasomen der jungen Tiere lediglich 17,6 % des Substrates abgebaut hatten. Somit zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Substratabbaurate zwischen beiden Altersgruppen (p < 0,045).

In Abb. 3-14B ist ebenfalls exemplarisch ein gleicher Versuch des Abbaus von Ub₅-MUC₄-Substrat durch 26S Proteasomen aus Kleinhirngewebe der alten und jungen Tiere gezeigt. Die quantitative Auswertung dieser Versuche ist in Abb 3-15B dargestellt und zeigt, dass ein 50% iger Abbau des Substrates durch die 26S Proteasomen der alten Tiere bereits nach 40 Minuten gemessen wurde (verbliebenes Substrat 37,5 %), wohingegen der Abbau durch Enzyme der jungen Tiere zum gleichen Messzeitpunkt weniger als 50% betrug (61,6 % verbliebenes Substrat, p = 0,041). Nach 80 Minuten erreichten die Proteasomen aus dem Kleinhirngewebe der alten Tiere einen Abbau des MUC- Proteins von 83,7%, während die Proteasomen der jungen Tiere maximal 54,6% des Substrates umsetzen konnten.



Abbildung 3-14 A: Ub₅Muc₄-Substrat-Abbau durch 26S Proteasomen aus Rattengroßhirn alter und junger Tiere. Der Ub₅Muc₄-Abbau wurde mit 70nM 26S Proteasomen und 600nM Ub₅Muc₄ Substrat durchgeführt. Nach den gewählten Messzeitpunkten von 0-80 Minuten wurden jeweils 10µl des Testansatzes abgenommen, auf einem SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und verbleibendes Substrat mittels eines Antikörpers gegen das Epitop Muc₉₅₀₋₉₅₈ detektiert. Um eine gleichmäßige Beladung des Gels nachvollziehen zu können, wurde die proteasomale Untereinheit α 1 ebenfalls mittels Immundetektion nachgewiesen und zeigt eine entsprechende Reaktionen im Bereich von ca. 28kDa. **B**: Ub₅Muc₄-Substrat-Abbau durch 26S Proteasomen aus Rattenkleinhirn alter und junger Tiere. Der Ub₅Muc₄-Abbau wurde in gleicher Weise wie unter **A** beschrieben durchgeführt.



Abbildung 3-15 Densitometrische Auswertung des Ub₅Muc₄-Substratabbaus durch 26S Proteasomen aus Rattengroßhirn (**A**) und Rattenkleinhirn (**B**). Die Signale der Westernblotanalyse wurden densitometrisch mit dem Programm Image J ausgewertet und die Daten (Mittelwerte \pm SEM aus 3-5 Experimenten) für die jungen Tiere (weiß) und alten Tiere (schwarz) dargestellt. Statistische Unterschiede (t-test) in den Werten beider Altersgruppen wurden mit den jeweiligen p-Werten gekennzeichnet und ab einem Wert von p < 0.05 als statistisch signifikant gewertet.

Diese Befunde, dass der Abbau von Ub₅-MUC₄ durch 26S Proteasomen alter Tiere signifikant schneller erfolgte als durch die Enzyme der jungen Tiere, stehen somit im direkten Gegensatz zu den Aktivitäten, die mit fluorogenen Peptidsubstrate gemessen worden sind (vergleiche Abb. 3-8) und zeigen an, dass Aktivitätsbestimmungen mittels kleiner fluorogener Peptidsubstrate für die Charakterisierung zumindest von 26S Proteasomen von eingeschränkter Aussagekraft sind.

3.7.2 Einfluss des Ub₅Muc₄-Substrates auf den proteasomalen Abbau fluorogener Substrate

Da in vorherigen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die Bindung von Poly-ubiquitinierten Substraten auch Einfluss auf die peptidolytische Basalaktivität von 26S Proteasomen ausübt (Bech-Otschir, Helfrich et al. 2009; Li and Demartino 2009), wurden in zusätzlichen Experimenten untersucht, ob sich die chymotryptische Aktivität von 26S Proteasomen beider Altersgruppen durch die Anwesenheit des MUC-Substrates beeinflussen lässt.

Wie in Abbildung 3-16 dargestellt, führte die Anwesenheit/Bindung im Vergleich zu Messungen in Abwesenheit von Ub_5Muc_4 zu einer Steigerung der chymotryptischen Aktivität der 26S Proteasomen aus Großhirn und Kleinhirn beider Altersgruppen. Interessanterweise war das Ausmaß der Aktivierung der Proteasomen jedoch unterschiedlich. Erstens war die Aktivierung bei den 26S Proteasomen aus dem Kleinhirn größer als bei solchen aus Großhirn; zweitens wurde die chymotryptische Aktivität der Enzyme aus den Geweben alter Tiere jeweils stärker aktiviert als die aus jungen Tieren, d.h. die 26S Proteasomen, die Ub_5Muc_4 schneller abbauten, wurden auch stärker aktiviert.



Abbildung 3-16 Aktivierung der chymotryptischen Basalaktivität von 26S Proteasomen aus Großhirn und Kleinhirn alter (schwarze Kreise) und junger (weiße Kreise) Ratten. Für den Versuch wurden 30nM 26S Proteasomen und 300nM Ub₅Muc₄ Substrat oder ein entsprechendes Volumen Puffer bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden den Testansätzen jeweils 100 μ M des Peptidsubstrates Suc-LLVY-AMC zugefügt und dessen Abbau zeitabhängig fluorometrisch gemessen. Gezeigt ist die chymotryptische Aktivität von 26S Proteasomen aus Großhirn (A) und Kleinhirn (B) als Differenz der Meßreihen in An- und Abwesenheit des Ub₅Muc₄ Substrates. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus jeweils zwei Meßreihen.

3.7.3 Abbau des Substrats polyUb-GST-UbcH5a durch 26S Proteasomen aus Groß- und Kleinhirngewebe

Um zu überprüfen, ob der Einsatz anderer poly-ubiquitinierter Substratproteine zu ähnlichen Ergebnissen führen würden wie in den Versuchen mit dem Ub₅Muc₄-Substrat.,wurden 26S Proteasomen aus Rattengroß- und Kleinhirn alter und junger Tiere mit dem polyUb-GST-UbcH5a Substrat für insgesamt 60 Minuten inkubiert (Abb. 3-17A-C). Die Versuchsdurchführung entsprach dem Substratabbau-Experiment mit dem Ub₅Muc₄-Substrat.


Abbildung 3-17 A: PolyUb-GST-UbcH5a Substrat-Abbau durch 26S Proteasomen aus Rattenkleinhirn alter und junger Tiere. Der polyUb-GST-UbcH5a-Abbau wurde mit 1 g 26S Proteasomen und 2 g polyUb-GST-UbcH5a Substrat durchgeführt. Nach den gewählten Messzeitpunkten von 0-60 Minuten wurden jeweils 10µl des Testansatzes abgenommen, auf einem SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und verbleibendes Substrat mittels eines UbcH5 Antikörpers detektiert. **B und C**: Densitometrische Auswertung des Abbaus von polyUb-GST-UbcH5a jeweils zweier separater Experimente (Mittelwerte \pm SD) mit 26S Proteasomen aus Kleinhirn (**B**) und Großhirn (**C**) junger (weiße Symbole) und alter (schwarzer Symbole) Ratten. **D**: 26S Proteasomen aus Kleinhirn (Dreiecke) und Großhirn (Vierecke) junger (weiße Symbole) und alter (schwarze Symbole) Ratten wurden für 15 min bei 37°C mit und ohne polyUb-GST-UbcH5a inkubiert, bevor die chymotryptische Aktivität zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Suc-LLVY-AMC gemessen wurde. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte jeweils zweier Experimente.

Es wurde auch für das polyUb-GST-UbcH5a Substrat getestet, ob dieses ebenfalls einen Einfluss auf den proteasomalen Abbau fluorogener Substrate ausübt. Wie in Abb 3-17D zu erkennen ist, konnte sowohl für die 26S Proteasomen der alten Tiere als auch für die der jungen Tiere eine Aktivierung der chymotryptischen Aktivität gemessen werden. Altersabhängige Unterschiede wie im Versuch mit dem Ub₅Muc₄-Substrat konnten nicht beobachtet werden.

3.8 Nachweis von Ubiquitinkonjugaten in Rohextraktproben aus Großhirn junger und alter Ratten

Um zu untersuchen, ob die offensichtlich größere Abbaukapazität von polyUb-Substraten in Hirngeweben von alten Tieren im Vergleich zu jungen sich in der Konzentration von polyubiquitinierten Protein-Konjugaten in den Geweben widerspiegelt, wurden Großhirn-Gewebehomogenate in Anwesenheit von Inhibitoren für das Proteasom sowie Deubiquitinasen hergestellt. Anschließend wurden die Proben mittels einer SDS-PAGE getrennt und im Immunblot auf ihren Gehalt an hochmolekularen Ubiquitin-Konjugaten untersucht. Wie in Abbildung 3-18 dargestellt, ist die Konzentration von hochmolekularen polyUb-Protein-Konjugaten in Großhirn-Extrakten alter Tiere deutlich niedriger als in solchen von jungen Tieren. Das heißt, dass die mit zunehmendem Alter parallel zunehmende Organgröße und Proteinmenge unter physiologischen Bedingungen nicht mit einer Zunahme an polyUb-konjugierten Proteinen einhergeht.



Abb 3-18 Nachweis von Poly-Ubiquitin-Konjugaten in Kleinhirnhomogenaten. A: Gleiche Mengen (25 g und 50 g) Gewebehomogenat der Kleinhirne junger und alter Ratten wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt. Im Anschluss erfolgte ein Western-Blot und die Detektion von Poly-Ubiquitin-Konjugaten mit einem Poly-Ubiquitin-Antikörper. GAPDH diente als Lade-und Blotkontrolle. B: Desitometrische Auswertung der Western-Blot-Signale. Die Poly-Ubiquitin-Konjugatmenge der alten Tiere wurden als Prozent der Konjugatmenge der jungen Tiere angegeben.

3.8.1 Immundetektion von USP14 und UCH37 in 26S Proteasomproben aus Großhirn und Kleinhirn junger und alter Ratten

Für die Aktivierung des 26S Proteasoms (Öffnung der α -Ring-Pore) ist nicht nur die Bindung der Poly-Ubiquitin-Konjugate notwendig, sondern auch deren Deubiquitinierung. Während die Bindung von Ubiquitin an den 19S Regulator vor allem über die Untereinheiten Rpn10 und 13 vermittelt wird, sind für die Entfernung des Ubiquitins u.a. Deubiquitinasen wie USP14 oder UCH37 verantwortlich. Diese liegen assoziiert mit dem 19S Regulator vor. Hanna et al. zeigten, dass eine verminderte Ubiquitinmenge mit einer vermehrten Assoziation von Ubp6 (Hefe-Homolog des USP14) mit dem 19S Regulator einhergeht (Hanna, Meides et al. 2007). Zudem konnte eine Abnahme von Ubiquitin in alten Zellen beobachtet werden (Jahngen, Haas et al. 1986; Pan, Short et al. 1993). Es scheint demnach eine 26S Population

zu existieren, die eine vermehrte Assoziation mit USP14 aufweist und dadurch eine verstärkte Aktivierung der 26S Proteasomen durch Ubiquitin-Konjugate im Gewebe alter Tiere verursacht. Dies könnte wiederum durch altersabhängige struktuelle Änderungen der 26S Peoteasomen bedingt sein.

Aus diesem Grunde wurden die Deubiquitinasen USP14 und UCH37 mittels Western-Blot-Analyse und anschließender spezifischer Immundetektion in den gereinigten 26S Proteasomproben aus Großhirn und Kleinhirn der alten und jungen Tiere untersucht. Weder USP14 noch UCH37 waren in den gereinigten 26S Proteasomproben im Gegensatz zu den Gewebeextrakten nachweisbar (Abb. 3-19).



Abb. 3-19 2 g gereinigte 26S Proteasomen aus Großhirn und Kleinhirn der jungen und alten Ratten und 50 g der jeweiligen Gewebehomogenate wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und eine Elektrophorese mit anschließendem Western-Blot durchgeführt. USP14 und UCH37 wurden mittels spezifischer Atikörper detektiert. Das Vorliegen von 26S Proteasomen wurde durch die Detektion der 19S Regulator-Untereinheit Rpt3 nachgewiesen.

Der Alterungsprozess stellt einen physiologischen und hoch komplexen, den gesamten Organismus betreffenden Vorgang dar. Neben zellulären, endogenen Prozessen spielen exogene Faktoren eine wichtige Rolle, so dass von einem multikausalen Geschehen ausgegangen wird. Auf zellulärer Ebene zeigen sich alterungsbedingte Veränderungen in der Proteinhomöostase, d.h. bei Proteinabbau und -Biosynthese. Dies äußert sich vornehmlich in einer Akkumulation funktionsloser Proteine und kann zu pathologischen Prozessen bis zum Zelltod führen (Hipkiss 2006). Eine besondere Vulnerabilität für Proteinakkumulationen bietet das zentrale Nervengewebe; denn gemeinsames histologisches Merkmal neurodegenerativer Erkrankungen ist eine Aggregation von fehlerhaften Proteinen (Hegde and Upadhya 2011). Seit Langem wird vermutet, dass altersbedingte Veränderungen der Proteinabbau-Systeme für solche Proteinaggregationen ursächlich mitverantwortlich gemacht werden können. In dieser Arbeit wurden deshalb 20S und 26S Proteasomen als proteolytisches Kernelement des UPS in verschiedenen Hirnarealen junger (3 Wochen) und alter (24 Monate) Ratten quantifiziert, gereinigt und hinsichtlich ihrer peptidolytischen und proteolytischen Aktivitäten sowie ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung bezüglich der aktiven β -Untereinheiten analysiert.

4.1 Die Methodik zur Quantifizierung von 20S und 26S Proteasomen aus Hirngewebe der Ratte

Ein erster grundlegender Schritt der vorliegenden Arbeit war, eine Methode zu etablieren, die eine zügige und schonende Separierung der verschiedenen proteasomalen Komplexe innerhalb eines Gewebes ermöglicht. Im Verlauf dieser Arbeit wurden drei verschiedene Methoden getestet, die eine Trennung von 20S und 26S Proteasomen aus einem Gewebehomogenat erlauben. Häufig wird zur Bestimmung der Proteasommenge innerhalb eines Gewebes das Western-Blot-Verfahren eingesetzt. Durch die Detektion einer oder mehrerer proteasomaler α - und/oder β -Untereinheiten wird die in der Immundetektion nachgewiesene Signalstärke dem jeweiligen Proteasomgehalt gleichgesetzt. Diese Art der Mengennachweise ist jedoch als semiquantitativ zu betrachten, da die Stärke des jeweiligen Signals von zahlreichen, teils schwer zu kontrollierenden Faktoren abhängig ist. Dazu zählen die Affinität der gewählten Antikörper, ihre Spezifität für das zu untersuchende Protein und der exakte Transfer der Proteine von der jeweiligen Gelmatrix auf die proteinbindende

Membran. Besonders die Konstanz der Qualität und Konzentration der für die Immunreaktion und ihren photografischen Nachweis verwendeten Lösungen ist schwer zu kontrollieren. Eine weitere Möglichkeit zur allgemeinen Quantifizierung von Proteinen bietet der ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Da wie bei der Western-Blot-Analyse auch bei dem ELISA mit Primär- und Sekundärantikörpern gearbeitet wird, sind diese beiden Reaktionsschritte für die Qualität des Testes von großer Bedeutung und sehr anfällig für unspezifische Reaktionen und somit Fehlbestimmungen. Da bei dieser Methode keine Größenkontrolle des Reaktionsproduktes durch mitgeführte Proteinmarker wie beispielsweise in der Gelelektrophorese möglich ist, kann bei dem mittels ELISA gemessenen Signal nicht zwischen freien Proteasomuntereinheiten und denen aus intakten Komplexen stammenden Untereinheiten differenziert werden. Da eine möglichst exakte Quantifizierung der proteasomalen Komplexe erzielt werden sollte, kam schließlich eine relativ alte, aber sichere Methode zum Einsatz, die Rocket-Immunelektrophorese (Laurell 1965). Dieses elektrophoretische Verfahren ermöglicht die Quantifizierung eines Antigens auch in komplexen biologischen Materialien. Die in einem Agarosegel homogen verteilten Proteasom-Antikörper reagieren mit den elektrophoretisch einwandernden Proteasomen und formen präzipitierende Antigen-Antikörperkomplexe (siehe Kapitel 2.2.12). Die Größe der Präzipitate steht in einem linearen Verhältnis zu der Antigenmenge, in diesem Fall Proteasommenge. Vorteilhaft gegenüber den oben beschriebenen Methoden ist, dass keine Reaktion mit Sekundärantikörpern notwendig ist, wobei auch hier die Qualität und Spezifität des eingesetzten Antikörpers entscheidend sind und entsprechend getestet werden sollten. Das in dieser Arbeit verwendete Antiserum wurde auf beide Merkmale getestet (siehe Material und Methoden). Die für die Quantifizierung von 20S und 26S Proteasomen etablierte Rocket-Immunelektrophorese führte zu sehr gut reproduzierbaren Ergebnissen. Dies zeigte sich zum einen in niedrigen Standardabweichungen der einzelnen Werte der jeweiligen Eichkurven mit 20S und 26S Proteasomen, zum anderen stimmte die durchschnittlich ermittelte Proteasommenge in Lebergewebe der Ratte mit Daten von Tanaka et al. überein (Tanaka, Ii et al. 1986).

Um eine separate Quantifizierung von 20S und 26S Proteasomen aus Gewebeextrakten zu ermöglichen, mussten die jeweiligen Proteasomen im Gewebehomogenat voneinander separiert werden. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Methoden untersucht, die solch ein Vorgehen ermöglichen:

1. 2D-Nativgel- Elektrophorese der Gewebeextraktprobe,

2. Nativgel-Elektrophorese mit anschließender Elektroelution der Proteasomen,

3. Dichtegradientenzentrifugation der Gewebeextraktprobe.

Da die unter 1. und 2. aufgeführten Methoden (näher beschrieben im Kapitel 3.1) zu keinen reproduzierbaren Trennungsergebnissen führten, waren diese nur für den qualitativen Nachweis von Proteasomen in der Probe einsetzbar.

Die Dichtegradienten-Zentrifugation mittels eines 10-40% Glycerolgradienten ermöglichte jedoch die reproduzierbare Separierung von 20S und 26S Proteasomen aus den Homogenaten von Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus. Eine weitere Trennung von 30S und 26S Proteasomen war nicht möglich, so dass die 26S Proteasomproben auch 30S Komplexe enthalten. Die Quantifizierung der Gesamtproteasommenge im Gewebeextrakt und nach der Trennung in 20S und 26S Komplexe zeigten mit nur 10% Abweichung, dass es sich sowohl bei der Quantifizierung als auch bei der Anreicherungsmethode um zwei reproduzierbare und valide Verfahren handelt. Die so generierten 20S und 26S Proteasomproben konnten im Anschluss weitergehend untersucht werden und stellten somit die Grundlage für die folgenden Experimente der Quantifizierung, Aktivitätsmessungen und Untereinheiten-Analysen dieser Arbeit dar.

4.2 Quantifizierung von 20S und 26S Proteasomen aus Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus alter und junger Ratten

Die Bestimmung der einzelnen Organgewichte, der Gesamtproteinmenge des jeweiligen Gewebeextrakts und die Quantifizierung von 20S bzw. 26S Proteasomen sollte genauere Informationen über die altersabhängige Entwicklung dieser Größen in den drei Hirnarealen bringen. Verschiedene Arbeiten weisen auf eine Reduktion proteasomaler Untereinheiten und mit dem Proteasom assoziierter Moleküle, wie PA28 und dem 19S Regulator, hin. Arbeiten von Keller et al. und Dasuri et al. zeigten unter anderem eine altersabhängige Abnahme von proteasomalen Untereinheiten in Rückenmark- bzw. Großhirngewebe der Ratte (Keller, Huang et al. 2000; Dasuri, Zhang et al. 2009). Während Keller und Kollegen eine Reduktion der Signalintensität bei der Immundetektion von α - und β -Untereinheiten des 20S Kernkomplexes nachwiesen, beschrieben Dasuri et al. eine Reduktion der α 7-Untereinheit von 26S Proteasomen, jedoch sonderbarerweise keine altersabhängige Veränderung der Signalstärken für β -Untereinheiten von 20S Proteasomen bei gleichzeitiger Zunahme einer 19S Regulatoruntereinheit im Alter. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in humanen, epidermalen Zellen erhoben (Petropoulos, Conconi et al. 2000). Carrad et al. fanden zwar einen altersabhängigen Verlust der proteasomalen Aktivität in Lymphozyten, jedoch wurden

keine Veränderungen des Proteasomgehaltes festgestellt (Carrard, Dieu et al. 2003). Diese Ergebnisse zeigen somit kein einheitliches Bild, suggerieren jedoch eine tendenzielle Abnahme von 20S und 26S Proteasomen im Alter. Die Untersuchung quantitativer Veränderungen von 20S und 26S Proteasomen alter und junger Tiere sowie mögliche Veränderungen des Proteingehaltes als Bezugspunkt der untersuchten Gewebe ist demnach von großer Bedeutung.

Die in dieser Arbeit erzielten Daten zeigen eine Zunahme des Organgewichts und der Gesamtproteinmenge, jedoch keine altersabhängigen Veränderungen der Proteasommengen in allen drei untersuchten Hirnarealen. Demzufolge ist der Anteil der Proteasomen an der Gesamtproteinmenge und der gesamten Organmasse im Alter vermindert. Ein geringerer Proteasomanteil im jeweiligen Gewebe müsste somit eine größere Substratmenge umsetzen, um die Proteinhomöostase aufrechtzuerhalten. Insofern war die Untersuchung möglicher altersabhängiger Veränderungen der proteolytischen Aktivität der Proteasomen von großer Bedeutung. Auch hierfür war die Quantifizierung der 20S und 26S Proteasomen wichtig, um eine genaue Berechnung der spezifischen Aktivitäten (pmol/µg 20S bzw. 26S Proteasom) zu gewährleisten.

4.3 Aktivitätsmessung von 20S und 26S Proteasom aus dem ZNS junger und alter Ratten mittels fluorogener Peptidsubstrate und polyubiquitinierter Substrate

4.3.1. Messdaten der Aktivitätsbestimmungen mit fluorogenen Peptidsubstraten

Mit Ausnahme einiger Veröffentlichungen, die keine Veränderungen (Hayashi and Goto 1998; Bregegere, Soroka et al. 2003; Ferrington, Husom et al. 2005) oder eine Steigerung (Shibatani, Nazir et al. 1996) der proteolytischen Funktion von Proteasomen aus altem im Vergleich zu jungem Gewebe fanden, wurde in der Mehrzahl eine altersabhängige Reduktion der proteasomalen Aktivität nachgewiesen. Die meisten dieser Studien untersuchten Organe von Ratten wie Herz, Lunge, Niere, Muskel und Leber (Sahakian, Szweda et al. 1995; Keller, Hanni et al. 2000; Bulteau, Szweda et al. 2002; Husom, Peters et al. 2004; Dasuri, Zhang et al. 2009; Koga, Kaushik et al. 2011). Auch Arbeiten mit Zellen bzw. Geweben humanen Ursprungs liegen in der aktuellen Literatur vor. So zeigten Petropoulos et al. und Carrard et al. eine verringerte proteolytische Aktivität von Proteasomen aus Epidermalzellen bzw. T-Lymphozyten aus alten im Vergleich zu jungen Spendern (Petropoulos, Conconi et al. 2000; Carrard, Dieu et al. 2003).

Zusammengefasst zeigen diese Arbeiten einen tendenziellen Verlust der proteasomalen Aktivität, jedoch ergeben die o.g. Untersuchungen kein einheitliches Bild für die Veränderungen der chymotryptischen, tryptischen und Caspase-ähnlichen Aktivität der untersuchten Proteasomen. In verschiedenen, bereits veröffentlichten Arbeiten, die Proteasomen aus unterschiedlichen Arealen des ZNS untersuchten, konnte ebenfalls ein tendenzieller Verlust der proteasomalen Aktivität im Alter beobachtet werden. Keller et al. zeigten für Proteasomen aus Rückenmark von alten und jungen Ratten eine altersabhängige Reduktion der chymotryptischen, tryptischen und Caspase-ähnlichen Aktivität. Die deutlichsten Unterschiede konnten hierbei zwischen den Proteasomen drei Wochen alter und 28 Monate alter Ratten beobachtet werden. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte in einer weiteren Arbeit, dass in Hippocampus, Cortex und Rückenmark eine deutliche Abnahme der proteolytischen Aktivität vorliegt, während in Hirnstamm und Kleinhirn keine altersassoziierten Unterschiede beobachtet werden konnten (Keller, Hanni et al. 2000; Keller, Huang et al. 2000). Zeng et al. untersuchten Proteasomen aus unterschiedlichen Regionen des ZNS verschiedener Spezies wie Ratte, Maus und Primaten. Die erhobenen Befunde in Gewebehomogenaten zeigten ebenfalls einen Verlust der proteasomalen Aktivität unter anderem in den Geweben von Ratte und Maus. Dabei war die chymotryptische Aktivität in verschiedenen Basalkern-Arealen von Rattenhirnen vermindert, jedoch konnte keine Abnahme dieser Aktivitäten im Kleinhirn derselben Tiere nachgewiesen werden. Die Veränderungen der tryptischen und Caspase-ähnlichen Aktivitäten wiederum beschränkten sich auf das Striatum und Kleinhirn. Ausschließlich in der Substantia nigra waren alle drei Aktivitäten im Alter reduziert (Zeng, Medhurst et al. 2005). Eine weitere Arbeit von Mohsen et al. untersuchte, wie auch in der vorliegenden Arbeit, altersabhängige Veränderungen der peptidspaltenden Aktvität von Proteasomen aus Gewebehomogenaten von Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus. In dieser Studie konnte in keinem der drei untersuchten Hirnregionen ein altersabhängiger Unterschied der chymotryptischen, tryptischen und Caspase-ähnlichen Aktivität beobachtet werden (Abd El Mohsen, Iravani et al. 2005). In den oben genannten Studien wurde überwiegend mit Gewebehomogenaten als Probenmaterial gearbeitet. Eine Differenzierung der verschiedenen Proteasomen, wie 20S und 26S Proteasomen, erfolgte hierbei nicht. Diese sehr heterogene Datenlage in der aktuellen Literatur zeigt, dass die Veränderungen, denen Proteasomen im Laufe der Alterung unterliegen, kein allgemeingültiges Phänomen darstellen, sondern von der untersuchten Spezies, den verwendeten Gewebetypen und sogar einzelner Organregionen abhängig sind. Dazu kommen Unterschiede in der experimentellen Durchführung der jeweiligen Arbeitsgruppe, die zusätzlich unterschiedliche Ergebnisse begünstigen und die Interpretation und Schlussfolgerung der Daten erschweren.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine optimierte Durchführung der Aktivitätsmessung mit fluorogenen Substraten. Alle Messungen erfolgten aus diesem Grund nicht nur in Gewebextrakten, sondern auch in angereicherter Proteasomproben nach Dichtegradienten-Zentrifugation im Glycerol-Gradienten, wodurch die individuelle Untersuchung von 20S und 26S Proteasomen ermöglicht wurde. Die Messungen in den Gewebeextrakte dienten vor allem zum Vergleich mit den Daten der oben erwähnten Literatur, in denen die Bestimmung der proteasomalen Gesamtaktivität vornehmlich in Gewebehomogenaten durchgeführt worden ist. Die so gemessenen Aktivitäten können jedoch auch nicht proteasomale Aktivitäten enthalten, da andere Proteasen im Gewebehomogenat, beispielsweise Calpaine und TPPII, ebenfalls eine Aktivität gegenüber den fluorogenen Substraten Suc-LLVY und Bz-VGR aufweisen. In einigen Veröffentlichungen dienten spezifische Proteasominhibitoren zur Differenzierung zwischen proteasomfremder und proteasomaler Aktivität (Abd El Mohsen, Iravani et al. 2005). In der vorgelegten Arbeit konnte jedoch in allen drei untersuchten Hirnarealen eine 105 kDa große Protease identifiziert werden, die über eine hohe chymotryptische und mäßige Caspase-ähnliche Aktivität verfügt und durch den Proteasom-spezifischen Inhibitor, Lactacystin, ebenfalls hemmbar ist (Abbildung 3-3). Eine Diskriminierung zwischen proteasomaler Aktivität und der 105 kDa großen Protease ist im Gewebehomogenat somit nicht einfach möglich und kann Ursache für eine ungenaue und fehlerhafte Aktivitätsbestimmung sein.

Um einerseits nicht-proteasomale Proteasen aus der jeweiligen Probe zu entfernen und andererseits eine separate Untersuchung vom 20S und 26S Proteasomen zu gewährleisten, wurden die Gewebeextrakte mittels eines Glycerol-Dichtegradienten getrennt und die 20S und 26S Komplexe anschließend durch die Rocket-Immunelektrophorese quantifiziert. Die Berechnung der spezifischen Aktivität mit Bezug auf die tatsächliche Proteasommenge (pmol/µg Proteasom x min) ist vor allem deshalb wichtig, da in dieser Arbeit keine altersabhängigen Unterschiede in der Gesamtmenge von 20S und 26S Proteasomen nachgewiesen werden konnten. sehr wohl aber Verringerung eine der Proteasomkonzentration, was auf einen signifikant erhöhten Gesamtproteingehalt und ein erhöhtes Organgewicht zurückzuführen ist (siehe Kapitel 3.2).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen der proteasomalen Aktivitäten mittels fluorogener Peptidsubstrate legten tatsächlich altersabhängige Veränderungen der spezifischen Aktivitäten für 20S und 26S Proteasomen (pmol/µg Proteasom x min.) im

Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus offen. Prinzipiell war die spezifische chymotryptische Aktivität von 20S und 26S Proteasomen aus allen drei Hirnbereichen in den Geweben alter im Vergleich zu jungen Tieren geringer, erreichte aber bei 20S Proteasomen nur im Großhirn und Kleinhirn und bei 26S Proteasomen nur im Kleinhirn und Hippocampus statistische Signifikanz. Diese Aktivitätsunterschiede waren in den Messungen mit den Gewebextrakten nicht sichtbar und lassen sich wahrscheinlich vor allem auf die Präsenz der 105 kDa-Protease zurückführen. Auch die beiden anderen proteasomalen Aktivitäten, tryptische und Caspaseähnliche, waren bei den alten Tieren geringer als bei den jungen. Obwohl diese Unterschiede keine statistische Signifikanz erreichten, entsteht der Gesamteindruck, dass 20S und 26S Proteasomen aus den drei untersuchten Hirnarealen alter Tiere im Vergleich zu jungen Tieren eine geringere spezifische Aktivität gegenüber fluorogenen Substraten aufweisen. Die hier erhobenen Daten untermauern somit die Befunde der Arbeitsgruppen, die eine alterabhängige Aktivitätsabnahme von neuronalen Proteasomen gemessen haben. Diese Erkenntnis wird darüber hinaus erhärtet, als die hier gemessenen spezifischen Aktivitäten sich auf absolute Mengen von Proteasom und nicht allgemein von Protein beziehen, und sogar erweitert, weil die Aktivitätsabnahme sowohl für 20S als auch für 26S Proteasomen gilt. Es ist zu vermuten, dass die hiervon abweichenden Resultate verschiedener oben erwähnter Arbeiten auf Inkonsistenzen in der experimentellen Durchführung beruhen.

4.3.2 Vergleichende Untersuchungen des Abbaus poly-ubiquitinierter-Substrate

Obwohl zur Bestimmung der proteasomalen Aktivität allgemein fluorogene Peptidsubstrate eingesetzt werden, ist die Aussagekraft der hiermit erzielten Ergebnisse jedoch eingeschränkt, da die Mehrzahl der intrazellulären Substratproteine eine Polyubiquitinierung als Abbaumakierung erfordert, um vom 26S Proteasom als ein solches erkannnt zu werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit zusätzlich der Abbau mit Poly-Ubiquitin markierten Substraten getestet. Dabei handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes, pentaubiquitiniertes Tetramer eines Mucin-Fragments, Ub₅-(MUC)₄, sowie um das sich selbst ubiquitinierende Fusionsprotein GST-UbcH5, ein Ubiquitin-konjugierendes E2 Enzym, welche ATP-abhängig von 26S Proteasomen abgebaut werden und eine weiterführende Charakterisierung altersabhängiger Veränderungen der 26S Proteasomaktivität ermöglichen (Bech-Otschir, Helfrich et al. 2009). Untersuchungen hinsichtlich altersabhängiger Unterschiede im Abbau poly-ubiquitinierter Substrate sind bislang in der Literatur nicht gezeigt worden, so dass die hier generierten Daten des Verdaus poly-ubiquitinierter Substrate

83

durch 26S Proteasomen aus Großhirn- und Kleinhirngewebe alter und junger Ratten zu völlig neuen Ergebnissen führten. Im Gegensatz zu den zuvor erhobenen Daten mit fluorogenen Substraten wiesen die Proteasomen der alten Tiere eine schnellere Degradationrate des Ub₅-(MUC)₄-Substrates und des polyUb-GST-UbcH5a-Proteins auf. Dies galt sowohl für 26S Proteasomen aus Großhirn als auch aus Kleinhirn. Diese Daten unterstreichen, dass die ausschließliche Messung der proteasomalen Aktivität mit fluorogenen Tripeptiden keine valide Aussagen zum funktionellen Status von Proteasomen erlauben.

Um Hinweise zu erhalten, aus welchem Grund 26S Proteasomen aus Großhirn und Kleinhirn alter Tiere einen schnelleren Abbau des poly-ubiquitinierten Substrates aufweisen, wurde die Anwesenheit von zwei proteasomassoziierten Deubiquitinasen mittels Western-Blot-Analyse untersucht. UCH37 und USP14 werden in der Literatur als proteasomassoziierte Enzyme beschrieben und können durch ihre Anwesenheit die Deubiquitinierung von proteasomalen Substraten bewirken. Peth et. al zeigten, dass die Interaktion von ubiquitinierten Substraten mit USP14 zu einer Steigerung der hydrolytischen Aktivität von 26S Proteasomen für fluorogene Substrate führt. Kausal wurde eine ATP-abhängige Beteiligung von USP14 am *gate opening* Prozess des 19S Regulators diskutiert (Peth, Besche et al. 2009). Der spezifische Nachweis von UCH37 und USP14 in der Western-Blot-Analyse von Großhirn- und Kleinhirn-Extrakten ergab keine altersabhängigen Veränderungen für beide Proteine. Noch wichtiger, in den gereinigten 26S Proteasomen waren die beiden Enzyme nicht mehr nachweisbar, so dass die beobachtete Steigerung der Abbaurate von poly-ubiqitinierten Substraten durch 26S Proteasomen aus Großhirn und Kleinhirn alter Tiere somit nicht auf die Anwesenheit der Deubiquitinasen zurückgeführt werden kann.

4.4 Untereinheiten-Zusammensetzung und Subtypen der Proteasomen aus Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus junger und alter Ratten

Proteasomen in neuronalem Gewebe sind vornehmlich Proteasomen vom Standardtyp, d.h. sie enthalten die konstitutiven β -Untereinheiten. Verschiedene Arbeiten haben jedoch gezeigt, dass unter besonderen Umständen eine Zunahme der induzierbaren Untereinheiten und damit Bildung von Immunoproteasomen erfolgen kann. Hierbei handelt es sich um entzündliche Prozesse und neuronale Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose, Amyotrophen Lateralsklerose, Alzheimersche Erkrankung und der Huntington Erkrankung (Diaz-Hernandez, Hernandez et al. 2003; Mishto, Santoro et al. 2003; Mishto, Bellavista et al. 2006; Mishto, Bellavista et al. 2010). Untersuchungen von Proteasomen aus Drosophila

84

melanogaster haben gezeigt, dass sich die Untereinheiten-Zusammensetzung der Enzymkomplexe im Laufe der ontogenetischen Entwicklung verändert und Proteasomen somit altersabhängigen Veränderungen unterliegen (Falkenburg and Kloetzel 1989). Eine altersabhängige Zunahme von Immunoproteasomen wurde im Rattenmuskel und humaner Retina nachgewiesen. Auch in verschiedenen Regionen des ZNS unterschiedlicher Spezies wurde die Präsenz von Immunoproteasomen beschrieben (Hussong, Kapphahn et al. 2010). In humanem Hirngewebe wurden Immunoproteasomen z.B. im Hippocampus und Kleinhirn alter Individuen, nicht aber im Gewebe junger Probanden nachgewiesen (Mishto, Bellavista et al. 2006). In Hirngewebe von *Macaca fascicularis* konnten keine altersabhängigen Veränderungen im Immunoproteasomgehalt festgestellt werden (Bellavista, Mishto et al. 2008). Die altersabhängige Zunahme von Immunoproteasomen scheint demnach ebenfalls in Abhängigkeit vom Gewebetyp und der untersuchten Spezies zu erfolgen und stellt somit kein generelles Phänomen im Alter dar.

Verschiedene Gründe könnten zu einer alterbedingten Synthese von Immunoproteasomen führen. Harman stellte 1956 die free radical theory of aging auf, in welcher er freien Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species, ROS) eine kausale Rolle im Zellalterungsprozess zuschrieb (Harman 1956). Laut dieser Theorie kommt es durch eine kumulative Wirkung freier Radikale zu unterschiedlichen zellulären Schäden bis hin zum Zelltod. Seither wird oxidativer Stress als kausale Komponente des Alterungsprozesses und in der Entstehung von degenerativen Erkrankungen diskutiert. Die oxidativ veränderten und funktionslosen Proteine müssen durch proteasomalen Abbau eliminiert werden, um die Proteinhomöostase erhalten zu können. Durch anhaltenden, oxidativen Stress, wie er zum Beispiel im Alter vorliegt, werden die geschädigten Proteine nicht mehr ausreichend abgebaut, akkumulieren und fungieren als erheblicher Stressor für die Zelle. Es resultiert ein chronischer Inflammationszustand, der pathologische Phänomene begünstigt und unter dem Begriff des "Inflammaging" zusammengefasst wird und zu einer altersbedingten Bildung von Immunoproteasomen führen kann (Franceschi, Capri et al. 2007). Seifert et al. zeigten im Zusammenhang mit einer gesteigerten de novo Synthese von Immunoproteasomen einen vermehrten Abbau oxidativ veränderter Proteine durch diese Enzymkomplexe und schrieben dem zur Folge Immunoproteasomen eine protektive Rolle unter oxidativem Stress zu (Seifert, Bialy et al. 2010).

Vor diesem Hintergrund und den in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen altersabhängigen Aktivitätsveränderungen neuronaler 20S als auch 26S Proteasomen war es von großem Interesse, dass diese auch hinsichtlich ihres Gehalts an Immuno-Untereinheiten untersucht wurden. Die Western/Immunblot-Analysen der konstitutiven Untereinheiten (B1 und β 5) und induzierbaren Untereinheiten (β 1i und β 5i) zeigten eine deutliche Signalzunahme der Letzteren in den Proteasomen alter Ratten (siehe Abb. 3.10). Die Signalstärke der konstitutiven β-Untereinheiten änderte sich jedoch nicht wesentlich. Am deutlichsten waren diese Veränderungen im Gewebe der hippocampalen Region zu beobachten. Hier zeigte sich bei den jungen Tieren nur ein äußerst schwaches Signal für die Untereinheit β 5i, wohingegen bei den alten Tieren ein deutliches Signal zu erkennen war. Ähnliche Daten konnten für die Untereinheit ß1i erhoben werden. Diese Beobachtung stimmt mit den bereits vorhandenen Daten von Gavilan et al. überein, die eine altersbedingte Zunahme der Expression von Immunoproteasom-Untereinheiten im Hippocampus der Ratte nachweisen konnten (Gavilan, Castano et al. 2009). In humanem Gewebe konnten Mishto et al. die Präsenz der Immunountereinheit ßli im Hippocampus und Kleinhirn gesunder alter Individuen und im Gewebe von Alzheimer Patienten belegen (Mishto, Bellavista et al. 2006). In den hier durchgeführten Western-Blot-Analysen konnte im Gewebe des Großhirns und Kleinhirns die Immuno-Untereinheiten ß1i und ß5i bereits in jungem Gewebe gefunden werden, jedoch lag ihre Konzentration unter der des alten Gewebes. Die hier erhobenen Befunde der Western-Blot-Analysen zeigen demnach, dass bereits im Großhirn- und Kleinhirngewebe der jungen Tiere Immunoproteasomen vorhanden sind. Ihre Konzentration scheint jedoch sehr gering, da in der 2D-Gel-Elektrophorese der gleichen Proben mittels Proteinfärbung keine Immuno-Untereinheiten in Kleinhirn und Großhirngewebe der jungen Tiere nachweisbar waren. Die entsprechenden Proteine (β 1i und β 5i) waren jedoch in den Proben der alten Tiere, wenn auch nur dezent, sichtbar (Abb. 3.11). Demnach ist die Konzentration von ßli und ß5i in Proteasomen neuronalen Gewebes extrem gering, nimmt jedoch altersabhängig geringfügig zu. Da die Quantifizierungsdaten eine allgemeine Abnahme der Proteasomkonzentration im Alter in allen drei untersuchten Hirnarealen offenbarten, könnte die gemessene die altersabhängige Zunahme an Immunoproteasomen und damit verbundene Kapazitätssteigerung für den Abbau poly-Ub-konjugierten von Substraten ein Kompensationsmechanismus des UPS im Alterungsprozess sein.

Standard- und Immuno- β -Untereinheiten unterscheiden sich beträchtlich hinsichtlich ihrer Oberflächen-exponierten Aminosäure-Reste (Huber, Basler et al. 2012), so dass sich 20S

Standard- von Immuno- sowie Intermediärtyp-Proteasomen auf Grund unterschiedlicher Oberflächenladung chromatographisch voneinander trennen lassen.

Proteasomen aus verschiedenen Geweben bzw. Zellen, die einer hochauflösenden Anionenaustausch-Chromatographie unterzogen werden, zeigen aufgrund dessen unterschiedliche und jeweils charakteristische Spektrem an Proteasomen-Subtypen (Dahlmann, Ruppert et al. 2000; Klare, Seeger et al. 2007; Kloss, Meiners et al. 2010). Als weitere Ursache für die Trennbarkeit von Proteasomen in ihre Subtypen werden auch posttranslationale Modifikationen der einzelnen Proteine, z.B. Glykosylierungen, Phosphorylierungen, Acetylierungen etc. vermutet.

In dieser Arbeit konnten, ähnlich wie bei Proteasomen aus human-Cerebrum (Gillardon et al, 2007), die Proteasomen aus Ratten-Großhirn in drei Subtypen (I-III) aufgetrennt werden. Die Spektra alter und junger Tiere unterschieden sich nicht in der Anzahl (I-III) der Subtypen, jedoch wiesen beide Altersgruppen eine unterschiedliche Verteilung dieser auf. Während bei den jungen Tieren Subtyp I und II deutlich dominierend gegenüber Subtyp III waren, zeigte sich ein fast spiegelbildliches Spektrum bei den Proteasomen aus Großhirngewebe der alten Tiere mit den dominanten Subtypen II und III. Da Untersuchungen von Proteasomen aus verschiedenen Rattengeweben gezeigt haben, dass Standardproteasomen, Intermediär- oder Immunoproteasomen mit steigender Salzkonzentration der von Anionenaustauschchromatographie Säule eluieren (Dahlmann, Ruppert et al. 2000; Kloss, Meiners et al. 2010) liegt es nahe, zu schlussfolgern, dass demzufolge im Alter der Gehalt an Immunoproteasomen im Großhirn zunimmt. Die Anzahl der Intermediärproteasomen scheint Änderungen unterliegen, wohingegen keinen sonderlichen zu die Anzahl der entsprechend abnimmt. Insgesamt stimmen Standardproteasomen die Daten der Subtypenanalyse mit den Ergebnissen der Westernblotanalyse und 2D-Elektrophorese überein, konnten aber wegen zu geringer Proteinmenge nach Chromatographie an Mini Q mittels Immunblot nicht überprüft werden. Ein ähnliches Bild konnte für die Proteasomen aus Kleinhirn junger und alter Tiere gewonnen werden. Die Probe der jungen Tiere wies, ebenso wie in den Versuchen mit Großhirnproteasomen, ein Subtypenspektrum von I-III auf. Der Schwerpunkt der Subtypen lag auch hier auf Typ I und II. Bei den Proben der alten Tiere ergab sich jedoch ein erweitertes Spektrum auf Subtyp I-V. Während Subtyp I deutlich vermindert vorlag, nahmen die Subtypen in höheren Salzkonzentrationen zu und teilten sich in III-V auf. Der Subtyp II veränderte sich in seiner Ausprägung kaum (siehe Abbildung 3-13). Dieses erweiterte Spektrum lässt sich vermutlich auf zusätzliche, z.B. posttranslationale

Modifikationen, der Proteasomen zurückführen und weist ingesamt ebenfalls auf eine Zunahme an Immunoproteasomen im Alter hin.

In der vorgelegten Arbeit wurden keine Analysen zur genauen Herkunft der detektierten Immunoproteasomen im Gewebe der alten Tiere durchgeführt. So könnten die Immunoproteasomen aus Neuronen, Gliazellen oder Endothelzellen stammen. Alle genannten Zelltypen sind zur Expression von Immunoproteasomen befähigt (Stohwasser, Giesebrecht et al. 2000; Mishto, Bellavista et al. 2006; Kremer, Henn et al. 2010; Mishto, Bellavista et al. 2010). Eine veränderte Zellzusammensetzung des ZNS im Alter erschwert zudem Einschätzungen über den wahrscheinlichsten Ursprung der detektieten Immunoproteasomen. Im Allgemeinen ist die Anzahl der Neurone um ein Vielfaches niedriger als die im ZNS vertretenden Gliazellen, welche Astrozyten, Mikrogliazellen und Oligodentrozyten beinhaltet. Studien von Pelvig et al. untersuchten altersabhängige Veränderungen der neocortikalen Gliazellanzahl in humanem Hirngewebe. Sie fanden neben einer verminderten Oligodentrozytenzahl eine gleichbleibende Menge an Astrozyten (Pelvig, Pakkenberg et al. 2008). Mouton et al. zeigten jedoch in Gewebe aus Maus eine Zunahme der Mikrogliazellen und Astrozyten in der hippocampalen Region (Mouton, Long et al. 2002). Diese Beobachtung von Mouton und Mitarbeitern könnte im Rahmen des "Inflammaging" Prozesses eine Reaktion des ZNS Gewebes auf einen chronisch vorherrschenden Entzündungsprozess im Alter darstellen (Franceschi, Capri et al. 2007). Neben der fehlenden Information, welchen neuronalen Zellen die nachgewiesenen Immunoproteasomen entstammen, liegen keine Daten vor, welche die genaue subzelluläre Lokalisation der Immunoproteasomen in neuronalen Zellen zeigen.

Der Alterungsprozess geht mit einer allmählichen Abnahme kognitiver Leistungen einher. Nach neusten Erkenntnissen ist ein Verlust von Neuronen im Bereich der hippocampalen Region und des Neocortex kein charakteristisches Merkmal der physiologischen Alterung des Hirngewebes. Vielmehr scheint eine veränderte Dendritenmorphologie und vor allem eine Abnahme der Synapsendichte und -funktion eine Rolle im physiologischen Alterungsprozess und der damit assoziierten kognitiven Leistungsabfall zu spielen. Diese Veränderungen werden unter der Bezeichnung einer veränderten bzw. verminderten neuronalen Plastizität zusammengefasst (Burke and Barnes 2006).

Synapsen sind spezielle intrazelluläre Verbindungen zwischen Neuronen, aber auch zwischen Neuronen und nicht neuronalen Zellen, die elektrische Signale weiterleiten können. Das UPS konnte in Synapsen nachgewiesen werden und ist an der Regulation von

89

Synapsenausbildungen, Struktur und Funktion regulierend beteiligt (Ding and Shen 2008). Nicht nur die Neubildung synaptischer Verbindungen stellt einen essentiellen Vorgang der neuronalen Plastizität dar. Die Auflösung obsoleter Zellverbindungen ist eine ebenfalls essentielle Funktion. Es konnte gezeigt werden, dass ein lokal kontrollierter Proteinabbau zur Eliminierung von Synapsen führt (Ding, Chao et al. 2007). Auch präesynaptische Prozesse sind mit dem UPS assoziiert. In Experimenten mit Drosophila konnte ein Protein (Dunc-13), welches im Vesikeltransport des präsynaptischen Bereiches eine wichtige Funktion einnimmt, als proteasomales Substrat identifiziert werden (Speese, Trotta et al. 2003). Zudem scheinen in hippocampalen Neuronen Proteasomen wesentlich am Vesikel-Recycling-Prozess beteiligt zu sein (Hegde and Upadhya 2011). Es wird postuliert, dass Proteasomen eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Vesikelhomoeostase spielen, da im postsynaptischen Bereich unter anderem Neurotransmitter-Rezeptoren und verschiedene regulatorische Proteine durch das UPS abbgebaut werden (Willeumier, Pulst et al. 2006; Hegde and Upadhya 2011). Welche Funktion Immunoproteasomen in der synaptischen Region einnehmen und ob sie überhaupt in Synapsen oder eher Somata der Neuronen lokalisiert sind, ist bisher nicht bekannt. Der Abbau der obengenannten Proteine erfolgt – soweit bekannt – nach ihrer Konjugation mit polyUb. Die Tatsache, dass in den hier untersuchten Tieren die Konzentration der polyUb-Protein-Konjugate im Cerebrum der alten Tiere eher geringer ist als in den jungen, deutet auf einen effektiven, ungestörten Abbaumechanismus dieser Proteine hin. Es ist vorstellbar, dass hierbei Immunoproteasomen in Neuronen eine entscheidende Rolle spielen, um einen komplikationslosen Alterungsprozesses zu gewährleisten.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die durchgeführten Experimente dieser Arbeit und die damit verbundenen Analysen zeigen, dass die Konzentration von 20S und 26S Proteasomen im Alter in allen drei Hirnarealen abnimmt. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass 26S Proteasomen aus neuronalem Gewebe alter Ratten eine erhöhte proteolytische Kapazität für die getesteten poly-ubiquitinierten Substrate aufweisen. Dazu kommt eine erhöhte Aktivierbarkeit der hydrolytischen Aktivität von 26S Proteasomen z.B. durch das poly-ubiquitinierte MUC-Proteine-Substrat. Diese Aktivierbarkeit und eine Zunahme an Immunoproteasomen könnten den beschleunigten Abbau der poly-ubiquitinierten Substrate durch die 26S Proteasomen aus altem Gewebe zumindest partiell erklären und einen Kompensationsmechanismus für die detektierte Konzentrationsminderung der Enzymkomplexe im Alter darstellen. Seifert et al. konnten

sowohl in Zellexperimenten als auch in vitro zeigen, dass Immunoproteasomen einen um ca. zwei- bis dreifach höheren Abbau von poly-ubiquitinierten Substraten aufweisen und eine Schlüsselrolle in der Beseitigung von oxidativ veränderten Proteinen einnehmen (Seifert, Bialy et al. 2010). Dies scheint von großer Bedeutung, da auch andererorts gezeigt wurde, dass oxidativ veränderte Proteine einem proteasomalen Abbau und damit einer Eliminierung unterliegen (Medicherla and Goldberg 2008).

Die Daten dieser Arbeit deuten somit auf einen essentiellen präventiven Vorgang gegen die Ablagerung von fehlerhaften Proteinen in neuralem Gewebe hin und könnten eventuell erklären, warum eine erhöhte proteolytische Aktivität von 26S Proteasomenzymen in einen direkten Zusammenhang mit einem physiologischen Alterungsprozess gestellt werden muss (Abd El Mohsen, Iravani et al. 2005).

Zugleich stehen die gewonnenen Ergebnisse im Widerspruch zu anderen Arbeiten, die eine allgemeine Abnahme der proteolytischen Aktivität von vornehmlich 20S Proteasomen, aber auch 26S Proteasomen im Alter beschreiben. Diese Arbeiten beziehen sich jedoch lediglich auf Messungen der proteolytischen Aktivitäten, mit fluorogenen Peptidsubstraten, die zu der Vorstellung führten, dieses Phänomen zeige einen potentiellen Funktionsverlust des UPS im Alter an und stehe damit in einem kausalen Zusammenhang mit der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen. Messungen der proteasomalen Aktivität mit fluorogenen Peptidsubstraten werden jedoch berechtigtermaßen kritisch diskutiert, da der Abbau dieser Tripeptide entscheidende molekulare Prozesse des proteasomalen Substratabbaus nicht einbezieht. So können diese Substrate von 20S und 26S Proteasomen abgebaut werden, da weder der Prozess der Ubiquitinerkennung und Bindung, noch der Deubiquitinierung für den Abbau der fluorogenen Substrate benötigt werden. Somit ist die Aussagekraft der Aktivitätsmessungen mit diesen Substraten limitiert. Da der Abbau poly-ubiquitinierter Substrate durch das 26S Proteasom erfolgt und einen ATP-abhängigen Vorgang darstellt, sind Abnahmen der proteolytischen Aktivität jedoch weiterhin denkbar. Diese wären z.B. auf eine generelle Reduktion der ATP-Konzentration im Alter zurückzuführen, die durch altersabhängige Störungen der ATP-Bereitstellung durch Mitochondrien zu erklären wäre, welche ebenfalls in einem kausalen Zusammenhang mit Neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert werden (Bueler 2009; Chakrabarti, Munshi et al. 2011). So tragen die altersabhängigen Veränderungen der Proteasomen zum Alterungsprozess bei und stellen einen weiteren Bestandteil des komplexen molekularen Netzwerkes dar. Verschiedene Arbeiten konnten zudem zeigen, dass je nach Untereinheiten-Zusammensetzung der Proteasomen und damit Anteil an konstitutiven und induzierbaren β -Untereinheiten, die proteolytische Aktivität wesentlichen Veränderungen unterliegt (Boes, Hengel et al. 1994; Bochtler, Ditzel et al. 1999; Rock and Goldberg 1999). Die nachgewiesene Zunahme an Immunoproteasomen in Großhirn und Kleinhirn der alten Tiere könnte die gemessenen Aktivitätsunterschiede in den jeweiligen Geweben erklären. Es wurde verschiedentlich gezeigt, dass Immunoproteasomen aus Rattenskelettmuskel im Vergleich zu Standardproteasomen eine niedrigere chymotryptische und Caspase-ähnliche Aktivität aufweisen, gleichzeitig aber eine höhere Abbaurate langkettiger Polypeptide zeigen (Dahlmann, Ruppert et al. 2000).

Insgesamt könnten die hier vorgestellten Daten hinweisend auf einen wichtigen Autoregulationsmechanismus der Zelle zur Prävention einer Akkumulierung von Polyubiquitin- Konjugaten sein. Möglicherweise stellen die gewonnenen Daten darüberhinaus einen essentiellen Vorgang in der physiologischen Alterung des Organismus dar. Die Ergebnisse dieser Abeit bieten somit potentiell neue Erkenntnisse zur Alterung und könnten Impuls für weiterführende Experimente in diesem Bereich sein.

Zusammenfassung

Die Lebensfähigkeit einer Zelle beruht auf der örtlich und zeitlich koordinierten Funktionsfähigkeit ihrer diversen Proteine, d.h. deren Biogenese, Faltung, Lokalisation, Aktivierung und Inaktivierung sowie Elimination. Diese Protein-Homöostase oder Proteostase wiederum wird ebenfalls durch ein Netzwerk von Proteinen gesteuert und katalysiert, so dass jede Störung dieses Gleichgewichts pathologische Konsequenzen bis hin zum Zelltod nach sich ziehen kann. Da jedes einzelne Protein einem Alterungsprozess unterliegt, liegt es nahe, dass auch die Proteinhomöostase alterungsabhängige Veränderungen zeigt. Untersuchungen der an ihr beteiligten Enzyme können somit Einblicke in den Alterungsprozess *per se* und möglicherweise in damit einhergehende pathologische Prozesse bieten.

Die intrazelluläre Elimination von Proteinen wird zu einem großen Teil von dem Ubquitin-Proteasome-System katalysiert, dessen Veränderungen im Alterungsprozess bisher zum Teil widersprüchlich dargestellt wurden. Seit einiger Zeit wird jedoch ein möglicher Zusammenhang zwischen verschiedenen altersbedingten, vor allem neurodegenerativen Erkrankungen und einer im Alter veränderten proteasomalen Aktivität diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Proteasomen aus Hirngewebe (Cerebrum, Cerebellum und Hippocampus) junger und alter Ratten hinsichtlich ihrer Quantität, Aktivität und Struktur untersucht.

Die gewonnenen Daten zeigen einen unveränderten absoluten Gehalt und ein ebenso gleich bleibendes Verhältnis von 20S und 26S Proteasomen in den drei untersuchten Hirnbereichen alter und junger Tiere. Die Proteasomkonzentration reduziert sich allerdings deutlich im Alter auf Grund einer im Vergleich zu jungen Tieren höheren Gesamtproteinmenge in den Geweben der alten Tiere. Zusätzlich zeigte sich eine altersabhängige Umstrukturierung des Proteasomspektrums. Die grundsätzlich niedrige Konzentration an Immunoproteasomen im neuronalen Gewebe der alten Tiere war höher als in dem der jungen, was sich auch in unterschiedlichen Proteasom-Subtypen-Spektren zeigte. Diese Veränderungen waren begleitet von einer in den alten Tieren signifikant reduzierten Aktivität der 20S und 26S Proteasomen gegenüber fluorogenen Peptidsubstraten, vor allem der chymotryptischen Aktivität. Demgegenüber konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die proteolytische Aktivität der 26S Proteasomen alter im Vergleich zu jungen Ratten höher ist, wenn physiologisch relevante, nämlich poly-ubiquitinierte Proteine als Substrate verwendet wurden. Da die Konzentration poly-ubiquitinierter Proteine im Cerebrum alter im Vergleich zu jungen Tieren niedriger war, weisen diese Daten auf einen wichtigen altersabhängigen Autoregulationsmechanismus des neuronalen Proteasomsystems zur Prävention einer Akkumulierung von Polyubiquitin-Konjugaten hin. Dieser Mechanismus könnte zusätzlich Voraussetzung für einen unkomplizierten, physiologischen Alterungsprozess sein.

Literaturverzeichnis

- Abd El Mohsen, M. M., M. M. Iravani, et al. (2005). "Age-associated changes in protein oxidation and proteasome activities in rat brain: modulation by antioxidants." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 336(2): 386-391.
- Adams, G. M., B. Crotchett, et al. (1998). "Formation of proteasome-PA700 complexes directly correlates with activation of peptidase activity." <u>Biochemistry</u> 37(37): 12927-12932.
- Akopian, T. N., A. F. Kisselev, et al. (1997). "Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from Thermoplasma acidophilum." <u>J Biol Chem</u> 272(3): 1791-1798.
- Askanas, V., W. K. Engel, et al. (1993). "Enhanced detection of congo-red-positive amyloid deposits in muscle fibers of inclusion body myositis and brain of Alzheimer's disease using fluorescence technique." <u>Neurology</u> 43(6): 1265-1267.
- Barrett, A. J. (1980). "Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates." <u>The Biochemical journal</u> **187**(3): 909-912.
- Bech-Otschir, D., A. Helfrich, et al. (2009). "Polyubiquitin substrates allosterically activate their own degradation by the 26S proteasome." <u>Nat Struct Mol Biol</u> **16**(2): 219-225.
- Bellavista, E., M. Mishto, et al. (2008). "Immunoproteasome in Macaca fascicularis: no agedependent modification of abundance and activity in the brain and insight into an in silico structural model." <u>Rejuvenation Res</u> **11**(1): 73-82.
- Bochtler, M., L. Ditzel, et al. (1999). "The proteasome." <u>Annu Rev Biophys Biomol Struct</u> 28: 295-317.
- Boes, B., H. Hengel, et al. (1994). "Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes." J Exp Med **179**(3): 901-909.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." <u>Analytical biochemistry</u> **72**: 248-254.
- Bregegere, F., Y. Soroka, et al. (2003). "Cellular senescence in human keratinocytes: unchanged proteolytic capacity and increased protein load." <u>Exp Gerontol</u> **38**(6): 619-629.
- Brzovic, P. S. and R. E. Klevit (2006). "Ubiquitin transfer from the E2 perspective: why is UbcH5 so promiscuous?" Cell cycle **5**(24): 2867-2873.
- Bueler, H. (2009). "Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease." <u>Exp Neurol</u> **218**(2): 235-246.
- Bulteau, A. L., L. I. Szweda, et al. (2002). "Age-dependent declines in proteasome activity in the heart." <u>Arch Biochem Biophys</u> **397**(2): 298-304.
- Bulteau, A. L., L. I. Szweda, et al. (2006). "Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging." <u>Exp Gerontol</u> **41**(7): 653-657.
- Burke, S. N. and C. A. Barnes (2006). "Neural plasticity in the ageing brain." <u>Nat Rev</u> <u>Neurosci</u> 7(1): 30-40.
- Carrard, G., M. Dieu, et al. (2003). "Impact of ageing on proteasome structure and function in human lymphocytes." Int J Biochem Cell Biol **35**(5): 728-739.
- Chakrabarti, S., S. Munshi, et al. (2011). "Mitochondrial Dysfunction during Brain Aging: Role of Oxidative Stress and Modulation by Antioxidant Supplementation." <u>Aging Dis</u> **2**(3): 242-256.
- Chondrogianni, N. and E. S. Gonos (2005). "Proteasome dysfunction in mammalian aging: steps and factors involved." <u>Exp Gerontol</u> **40**(12): 931-938.

- Ciechanover, A. (2006). "The ubiquitin proteolytic system: from a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting." <u>Neurology</u> **66**(2 Suppl 1): S7-19.
- Cooper, H. J., J. K. Heath, et al. (2004). "Identification of sites of ubiquitination in proteins: a fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry approach." <u>Analytical chemistry</u> **76**(23): 6982-6988.
- Coux, O., K. Tanaka, et al. (1996). "Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes." <u>Annu Rev Biochem</u> **65**: 801-847.
- da Fonseca, P. C., J. He, et al. (2012). "Molecular model of the human 26S proteasome." <u>Mol</u> <u>Cell</u> **46**(1): 54-66.
- Dahlmann, B., L. Kuehn, et al. (1995). "Studies on the activation by ATP of the 26 S proteasome complex from rat skeletal muscle." <u>The Biochemical journal</u> **309 (Pt 1)**: 195-202.
- Dahlmann, B., T. Ruppert, et al. (2000). "Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties." J Mol Biol **303**(5): 643-653.
- Dasuri, K., L. Zhang, et al. (2009). "Aging and dietary restriction alter proteasome biogenesis and composition in the brain and liver." <u>Mech Ageing Dev</u> **130**(11-12): 777-783.
- DeMartino, G. N. and C. A. Slaughter (1999). "The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms." J Biol Chem 274(32): 22123-22126.
- Deshaies, R. J. and C. A. Joazeiro (2009). "RING domain E3 ubiquitin ligases." <u>Annu Rev</u> <u>Biochem</u> **78**: 399-434.
- Diaz-Hernandez, M., F. Hernandez, et al. (2003). "Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease." J Neurosci 23(37): 11653-11661.
- Dick, L. R., C. R. Moomaw, et al. (1991). "Degradation of oxidized insulin B chain by the multiproteinase complex macropain (proteasome)." <u>Biochemistry</u> **30**(10): 2725-2734.
- Ding, M., D. Chao, et al. (2007). "Spatial regulation of an E3 ubiquitin ligase directs selective synapse elimination." <u>Science</u> **317**(5840): 947-951.
- Ding, M. and K. Shen (2008). "The role of the ubiquitin proteasome system in synapse remodeling and neurodegenerative diseases." <u>Bioessays</u> **30**(11-12): 1075-1083.
- Ding, Q., V. Cecarini, et al. (2007). "Interplay between protein synthesis and degradation in the CNS: physiological and pathological implications." <u>Trends Neurosci</u> **30**(1): 31-36.
- Ditzel, L., R. Huber, et al. (1998). "Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome." J Mol Biol **279**(5): 1187-1191.
- Dubiel, W., G. Pratt, et al. (1992). "Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease." J Biol Chem **267**(31): 22369-22377.
- Epel, E. S., E. H. Blackburn, et al. (2004). "Accelerated telomere shortening in response to life stress." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **101**(49): 17312-17315.
- Falkenburg, P. E. and P. M. Kloetzel (1989). "Identification and characterization of three different subpopulations of the Drosophila multicatalytic proteinase (proteasome)." J <u>Biol Chem</u> 264(12): 6660-6666.
- Ferrell, K., C. R. Wilkinson, et al. (2000). "Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem." <u>Trends Biochem Sci</u> **25**(2): 83-88.
- Ferrington, D. A., A. D. Husom, et al. (2005). "Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle." FASEB J 19(6): 644-646.
- Franceschi, C., M. Capri, et al. (2007). "Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans." <u>Mechanisms of ageing and development</u> **128**(1): 92-105.
- Fu, H., S. Sadis, et al. (1998). "Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1." J Biol Chem 273(4): 1970-1981.

- Gavilan, M. P., A. Castano, et al. (2009). "Age-related increase in the immunoproteasome content in rat hippocampus: molecular and functional aspects." Journal of <u>neurochemistry</u> **108**(1): 260-272.
- Glickman, M. H., D. M. Rubin, et al. (1998). "A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3." Cell **94**(5): 615-623.
- Griffin, T. A., D. Nandi, et al. (1998). "Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits." J Exp Med **187**(1): 97-104.
- Groettrup, M., A. Soza, et al. (1996). "A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation." <u>Nature</u> **381**(6578): 166-168.
- Groll, M., M. Bajorek, et al. (2000). "A gated channel into the proteasome core particle." <u>Nat</u> <u>Struct Biol</u> **7**(11): 1062-1067.
- Groll, M. and R. Huber (2003). "Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle." Int J Biochem Cell Biol **35**(5): 606-616.
- Groll, M. and R. Huber (2004). "Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach." <u>Biochimica et biophysica acta</u> **1695**(1-3): 33-44.
- Groll, M. and R. Huber (2005). "Purification, crystallization, and X-ray analysis of the yeast 20S proteasome." <u>Methods Enzymol</u> **398**: 329-336.
- Grune, T., D. Botzen, et al. (2010). "Tau protein degradation is catalyzed by the ATP/ubiquitin-independent 20S proteasome under normal cell conditions." <u>Arch Biochem Biophys</u> **500**(2): 181-188.
- Guterman, A. and M. H. Glickman (2004). "Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome." J Biol Chem **279**(3): 1729-1738.
- Hanisch, F. G. and S. Muller (2000). "MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin." <u>Glycobiology</u> **10**(5): 439-449.
- Hanna, J., A. Meides, et al. (2007). "A ubiquitin stress response induces altered proteasome composition." <u>Cell</u> **129**(4): 747-759.
- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J <u>Gerontol</u> **11**(3): 298-300.
- Hayashi, T. and S. Goto (1998). "Age-related changes in the 20S and 26S proteasome activities in the liver of male F344 rats." <u>Mech Ageing Dev</u> **102**(1): 55-66.
- Hegde, A. N. and S. C. Upadhya (2011). "Role of ubiquitin-proteasome-mediated proteolysis in nervous system disease." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1809**(2): 128-140.
- Heinemeyer, W., M. Fischer, et al. (1997). "The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing." J Biol Chem **272**(40): 25200-25209.
- Hendil, K. B., S. Khan, et al. (1998). "Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes." <u>Biochem J</u> **332** (**Pt 3**): 749-754.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." <u>Annu Rev Biochem</u> 67: 425-479.
- Hipkiss, A. R. (2006). "Accumulation of altered proteins and ageing: causes and effects." <u>Exp</u> <u>Gerontol</u> **41**(5): 464-473.
- Hochstrasser, M. (1996). "Protein degradation or regulation: Ub the judge." <u>Cell</u> **84**(6): 813-815.
- Hoeijmakers, J. H. (2009). "DNA damage, aging, and cancer." <u>N Engl J Med</u> **361**(15): 1475-1485.
- Houtkooper, R. H., C. Argmann, et al. (2011). "The metabolic footprint of aging in mice." <u>Sci</u> <u>Rep</u> 1: 134.

- Huber, E. M., M. Basler, et al. (2012). "Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity." <u>Cell</u> **148**(4): 727-738.
- Husnjak, K., S. Elsasser, et al. (2008). "Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor." <u>Nature</u> **453**(7194): 481-488.
- Husom, A. D., E. A. Peters, et al. (2004). "Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle." <u>Arch Biochem Biophys</u> **421**(1): 67-76.
- Hussong, S. A., R. J. Kapphahn, et al. (2010). "Immunoproteasome deficiency alters retinal proteasome's response to stress." J Neurochem **113**(6): 1481-1490.
- Jack, C. R., Jr. (2012). "Alzheimer disease: new concepts on its neurobiology and the clinical role imaging will play." <u>Radiology</u> **263**(2): 344-361.
- Jahngen, J. H., A. L. Haas, et al. (1986). "The eye lens has an active ubiquitin-protein conjugation system." The Journal of biological chemistry **261**(29): 13760-13767.
- Julian, J., N. Dharmaraj, et al. (2009). "MUC1 is a substrate for gamma-secretase." Journal of cellular biochemistry **108**(4): 802-815.
- Kaltoft, M. B., C. Koch, et al. (1992). "Monoclonal antibodies to the human multicatalytic proteinase (proteasome)." <u>Hybridoma</u> **11**(4): 507-517.
- Kapphahn, R. J., B. M. Giwa, et al. (2006). "Retinal proteins modified by 4-hydroxynonenal: identification of molecular targets." <u>Exp Eye Res</u> **83**(1): 165-175.
- Keck, S., R. Nitsch, et al. (2003). "Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease." J Neurochem **85**(1): 115-122.
- Keller, J. N., K. B. Hanni, et al. (2000). "Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress." <u>Mech Ageing Dev</u> 113(1): 61-70.
- Keller, J. N., F. F. Huang, et al. (2000). "Decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord." <u>Neuroscience</u> **98**(1): 149-156.
- Kerscher, O., R. Felberbaum, et al. (2006). "Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins." <u>Annu Rev Cell Dev Biol</u> **22**: 159-180.
- Klare, N., M. Seeger, et al. (2007). "Intermediate-type 20 S proteasomes in HeLa cells: "asymmetric" subunit composition, diversity and adaptation." J Mol Biol **373**(1): 1-10.
- Kloetzel, P. M. (2001). "Antigen processing by the proteasome." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **2**(3): 179-187.
- Kloetzel, P. M. (2004). "The proteasome and MHC class I antigen processing." <u>Biochim</u> <u>Biophys Acta</u> 1695(1-3): 225-233.
- Kloss, A., S. Meiners, et al. (2010). "Multiple cardiac proteasome subtypes differ in their susceptibility to proteasome inhibitors." <u>Cardiovasc Res</u> **85**(2): 367-375.
- Koga, H., S. Kaushik, et al. (2011). "Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control." <u>Ageing research reviews</u> **10**(2): 205-215.
- Kohler, A., M. Bajorek, et al. (2001). "The substrate translocation channel of the proteasome." <u>Biochimie</u> **83**(3-4): 325-332.
- Komander, D. (2009). "The emerging complexity of protein ubiquitination." <u>Biochem Soc</u> <u>Trans</u> **37**(Pt 5): 937-953.
- Kopp, F., B. Dahlmann, et al. (2001). "Reconstitution of hybrid proteasomes from purified PA700-20 S complexes and PA28alphabeta activator: ultrastructure and peptidase activities." J Mol Biol 313(3): 465-471.
- Kostova, Z. and D. H. Wolf (2003). "For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection." <u>EMBO J</u> **22**(10): 2309-2317.
- Kowald, A. and T. B. Kirkwood (2011). "The evolution and role of mitochondrial fusion and fission in aging and disease." <u>Commun Integr Biol</u> **4**(5): 627-629.

- Kremer, M., A. Henn, et al. (2010). "Reduced immunoproteasome formation and accumulation of immunoproteasomal precursors in the brains of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice." J Immunol **185**(9): 5549-5560.
- Kriegenburg, F., E. G. Poulsen, et al. (2011). "Redox control of the ubiquitin-proteasome system: from molecular mechanisms to functional significance." <u>Antioxid Redox</u> <u>Signal</u> 15(8): 2265-2299.
- Kuckelkorn, U., S. Frentzel, et al. (1995). "Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma." <u>Eur J</u> <u>Immunol</u> 25(9): 2605-2611.
- Kuehn, L. and B. Dahlmann (1997). "Structural and functional properties of proteasome activator PA28." <u>Mol Biol Rep</u> 24(1-2): 89-93.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." <u>Nature</u> **227**(5259): 680-685.
- Lam, Y. A., G. N. DeMartino, et al. (1997). "Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of 26 S proteasomes." J Biol Chem **272**(45): 28438-28446.
- Lander, G. C., E. Estrin, et al. (2012). "Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle." <u>Nature</u> **482**(7384): 186-191.
- Laurell, C. B. (1965). "Antigen-Antibody Crossed Electrophoresis." <u>Anal Biochem</u> **10**: 358-361.
- Levine, R. L. and E. R. Stadtman (2001). "Oxidative modification of proteins during aging." <u>Exp Gerontol</u> **36**(9): 1495-1502.
- Li, J. and M. Rechsteiner (2001). "Molecular dissection of the 11S REG (PA28) proteasome activators." <u>Biochimie</u> **83**(3-4): 373-383.
- Li, X. and G. N. Demartino (2009). "Variably modulated gating of the 26S proteasome by ATP and polyubiquitin." <u>Biochem J</u> **421**(3): 397-404.
- Liu, C. W., X. Li, et al. (2006). "ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome." <u>Mol Cell</u> **24**(1): 39-50.
- Macagno, A., M. Gilliet, et al. (1999). "Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation." <u>Eur J Immunol</u> **29**(12): 4037-4042.
- Medicherla, B. and A. L. Goldberg (2008). "Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins." <u>J Cell Biol</u> 182(4): 663-673.
- Mishto, M., E. Bellavista, et al. (2010). "Immunoproteasome LMP2 60HH variant alters MBP epitope generation and reduces the risk to develop multiple sclerosis in Italian female population." <u>PLoS One</u> **5**(2): e9287.
- Mishto, M., E. Bellavista, et al. (2006). "Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains." <u>Neurobiol Aging</u> **27**(1): 54-66.
- Mishto, M., F. Luciani, et al. (2008). "Modeling the in vitro 20S proteasome activity: the effect of PA28-alphabeta and of the sequence and length of polypeptides on the degradation kinetics." J Mol Biol **377**(5): 1607-1617.
- Mishto, M., A. Santoro, et al. (2003). "Immunoproteasomes and immunosenescence." <u>Ageing</u> <u>Res Rev</u> 2(4): 419-432.
- Mori, H., J. Kondo, et al. (1987). "Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease." <u>Science</u> **235**(4796): 1641-1644.
- Mouton, P. R., J. M. Long, et al. (2002). "Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice." <u>Brain Res</u> **956**(1): 30-35.

- Noda, C., N. Tanahashi, et al. (2000). "Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **277**(2): 348-354.
- Nussbaum, A. K., T. P. Dick, et al. (1998). "Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **95**(21): 12504-12509.
- Nussbaum, A. K., M. P. Rodriguez-Carreno, et al. (2005). "Immunoproteasome-deficient mice mount largely normal CD8+ T cell responses to lymphocytic choriomeningitis virus infection and DNA vaccination." J Immunol **175**(2): 1153-1160.
- O'Farrell, P. Z., H. M. Goodman, et al. (1977). "High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins." <u>Cell</u> **12**(4): 1133-1141.
- Oliveira, B. F., J. A. Nogueira-Machado, et al. (2010). "The role of oxidative stress in the aging process." <u>ScientificWorldJournal</u> **10**: 1121-1128.
- Orlowski, M. and S. Wilk (2000). "Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex." <u>Arch Biochem Biophys</u> **383**(1): 1-16.
- Pamer, E. and P. Cresswell (1998). "Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing." <u>Annu Rev Immunol</u> 16: 323-358.
- Pan, J. X., S. R. Short, et al. (1993). "Ubiquitin pools, ubiquitin mRNA levels, and ubiquitinmediated proteolysis in aging human fibroblasts." <u>Experimental gerontology</u> 28(1): 39-49.
- Pelvig, D. P., H. Pakkenberg, et al. (2008). "Neocortical glial cell numbers in human brains." <u>Neurobiol Aging</u> **29**(11): 1754-1762.
- Petersen, A., A. Honarvar, et al. (2010). "Changes in Activity and Kinetic Properties of the Proteasome in Different Rat Organs during Development and Maturation." <u>Curr</u> <u>Gerontol Geriatr Res</u>: 230697.
- Peth, A., H. C. Besche, et al. (2009). "Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening." <u>Mol Cell</u> **36**(5): 794-804.
- Petropoulos, I., M. Conconi, et al. (2000). "Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **55**(5): B220-227.
- Preckel, T., W. P. Fung-Leung, et al. (1999). "Impaired immunoproteasome assembly and immune responses in PA28-/- mice." <u>Science</u> **286**(5447): 2162-2165.
- Ravid, T. and M. Hochstrasser (2008). "Diversity of degradation signals in the ubiquitinproteasome system." <u>Nature reviews. Molecular cell biology</u> **9**(9): 679-690.
- Realini, C., S. W. Rogers, et al. (1994). "KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors." <u>FEBS Lett</u> **348**(2): 109-113.
- Rechsteiner, M., C. Realini, et al. (2000). "The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation." <u>Biochem J</u> 345 Pt 1: 1-15.
- Reyes-Turcu, F. E. and K. D. Wilkinson (2009). "Polyubiquitin binding and disassembly by deubiquitinating enzymes." <u>Chem Rev</u> **109**(4): 1495-1508.
- Riou, P., R. Saffroy, et al. (2002). "Investigation in liver tissues and cell lines of the transcription of 13 genes mapping to the 16q24 region that are frequently deleted in hepatocellular carcinoma." <u>Clin Cancer Res</u> **8**(10): 3178-3186.
- Rocha, E. M., C. R. Carvalho, et al. (2003). "The influence of ageing on the insulin signalling system in rat lacrimal and salivary glands." <u>Acta Ophthalmol Scand</u> **81**(6): 639-645.
- Rock, K. L. and A. L. Goldberg (1999). "Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides." <u>Annu Rev Immunol</u> **17**: 739-779.
- Sahakian, J. A., L. I. Szweda, et al. (1995). "Aging of the liver: proteolysis of oxidatively modified glutamine synthetase." <u>Arch Biochem Biophys</u> **318**(2): 411-417.

- Schubert, U., D. E. Ott, et al. (2000). "Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 97(24): 13057-13062.
- Schwarz, K., M. Eggers, et al. (2000). "The proteasome regulator PA28alpha/beta can enhance antigen presentation without affecting 20S proteasome subunit composition." <u>Eur J Immunol</u> **30**(12): 3672-3679.
- Seemuller, E., A. Lupas, et al. (1995). "Proteasome from Thermoplasma acidophilum: a threonine protease." <u>Science</u> **268**(5210): 579-582.
- Seifert, U., L. P. Bialy, et al. (2010). "Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress." <u>Cell</u> **142**(4): 613-624.
- Shibatani, T., M. Nazir, et al. (1996). "Alteration of rat liver 20S proteasome activities by age and food restriction." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **51**(5): B316-322.
- Sijts, A., Y. Sun, et al. (2002). "The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing." Mol Immunol **39**(3-4): 165-169.
- Sijts, E. J. and P. M. Kloetzel (2011). "The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses." <u>Cell Mol Life Sci</u> **68**(9): 1491-1502.
- Smith, D. M., S. C. Chang, et al. (2007). "Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry." <u>Mol</u> <u>Cell</u> **27**(5): 731-744.
- Speese, S. D., N. Trotta, et al. (2003). "The ubiquitin proteasome system acutely regulates presynaptic protein turnover and synaptic efficacy." <u>Curr Biol</u> **13**(11): 899-910.
- Stohwasser, R., J. Giesebrecht, et al. (2000). "Biochemical analysis of proteasomes from mouse microglia: induction of immunoproteasomes by interferon-gamma and lipopolysaccharide." <u>Glia</u> 29(4): 355-365.
- Stohwasser, R., U. Salzmann, et al. (2000). "Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28." <u>Eur J Biochem</u> **267**(20): 6221-6230.
- Tanahashi, N., Y. Murakami, et al. (2000). "Hybrid proteasomes. Induction by interferongamma and contribution to ATP-dependent proteolysis." J Biol Chem 275(19): 14336-14345.
- Tanaka, K. (1995). "Molecular biology of proteasomes." Mol Biol Rep 21(1): 21-26.
- Tanaka, K., K. Ii, et al. (1986). "A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution." J Biol Chem 261(32): 15197-15203.
- Tanaka, K. and M. Kasahara (1998). "The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28." <u>Immunol Rev</u> 163: 161-176.
- Thrower, J. S., L. Hoffman, et al. (2000). "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal." <u>EMBO J</u> **19**(1): 94-102.
- Tseng, B. P., K. N. Green, et al. (2008). "Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation." <u>Neurobiol Aging</u> **29**(11): 1607-1618.
- Ustrell, V., G. Pratt, et al. (1995). "Effects of interferon gamma and major histocompatibility complex-encoded subunits on peptidase activities of human multicatalytic proteases." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **92**(2): 584-588.
- van Wijk, S. J. and H. T. Timmers (2010). "The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins." <u>FASEB journal : official</u> <u>publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology</u> 24(4): 981-993.
- Varshavsky, A. (1997). "The ubiquitin system." Trends Biochem Sci 22(10): 383-387.
- Verma, R., R. Oania, et al. (2004). "Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system." <u>Cell</u> **118**(1): 99-110.

- Vernace, V. A., T. Schmidt-Glenewinkel, et al. (2007). "Aging and regulated protein degradation: who has the UPPer hand?" <u>Aging Cell</u> **6**(5): 599-606.
- Vigouroux, S., Y. Furukawa, et al. (2003). "Peptidase activities of the 20/26S proteasome and a novel protease in human brain." Journal of neurochemistry **84**(2): 392-396.
- Voges, D., P. Zwickl, et al. (1999). "The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis." <u>Annu Rev Biochem</u> 68: 1015-1068.
- Wang, M. and C. M. Pickart (2005). "Different HECT domain ubiquitin ligases employ distinct mechanisms of polyubiquitin chain synthesis." <u>EMBO J</u> 24(24): 4324-4333.
- Weeke, B. (1973). "Rocket immunoelectrophoresis." <u>Scandinavian journal of immunology.</u> <u>Supplement</u> 1: 37-46.
- Whitby, F. G., E. I. Masters, et al. (2000). "Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators." <u>Nature</u> **408**(6808): 115-120.
- Willeumier, K., S. M. Pulst, et al. (2006). "Proteasome inhibition triggers activity-dependent increase in the size of the recycling vesicle pool in cultured hippocampal neurons." J <u>Neurosci</u> 26(44): 11333-11341.
- Wolf, D. H. and W. Hilt (2004). "The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1695**(1-3): 19-31.
- Yao, T. and R. E. Cohen (2002). "A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome." <u>Nature</u> **419**(6905): 403-407.
- Zeng, B. Y., A. D. Medhurst, et al. (2005). "Proteasomal activity in brain differs between species and brain regions and changes with age." <u>Mech Ageing Dev</u> **126**(6-7): 760-766.
- Zong, C., G. W. Young, et al. (2008). "Two-dimensional electrophoresis-based characterization of post-translational modifications of mammalian 20S proteasome complexes." <u>Proteomics</u> 8(23-24): 5025-5037.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Peter-Michael Kloetzel für die Überlassung des interessanten Themas und der Möglichkeit, meine Arbeit am Institut für Biochemie anfertigen zu können.

Einen besonderen Dank möchte ich an Prof. Burkhardt Dahlmann richten, seine hervorragende Betreuung war eine wichtige Vorraussetzung für das Gelingen dieser Arbeit. Darüber hinaus bedanke ich mich für das von ihm entgegengebrachte Vertrauen, diese Arbeit durchführen zu können und für die ausgesprochene Begeisterungsfähigkeit für die Thematik. Die ausgeprägte Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit eigenständig das Thema bearbeiten zu können, war stets eine große Motivation und Bereicherung für meine praktischen Fähigkeiten und mein wissenschaftliches Denken. Ich habe in den vergangenen Jahren sehr viel gelernt.

In diesem Zuge möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe Dahlmann bedanken, es war mir eine große Freude Teil des Teams zu sein. Bei Alexander Kloß möchte ich mich für die großartige und geduldige Lehre der Labortechniken bedanken, ohne seine Hilfe und tatkräftige Unterstützung wäre die Durchführung dieser Arbeit unmöglich gewesen.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Gruppenmitgliedern Dagmar Siele, Sabrina Gohlke, Thorsten Overath und Isabel Bochmann herzlich bedanken, sie waren ebenfalls durch unzählige Hilfestellungen im Labor und durch interessante Gesprächsrunden eine wichtige Stütze während meiner Zeit am Institut. Michele Mishto danke ich für die konstruktive Mitarbeit am Manuskript.

Dem gesamten Institut der Biochemie danke ich für die immerwährend freundliche Zusammenarbeit und kollegiale Hilfe aller Institutsmitglieder.

Der Forschungs-Förderung der Charité und der Sonnenfeld-Stiftung Berlin danke ich für die umfangreiche finanzielle Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für ihren uneingeschränkten familiären Rückhalt und die stetige Förderung meiner Interessen. Ohne sie wären mein sorgenloses Studium und meine Promotion nicht möglich gewesen. Ein großes Dankeschön gilt auch meiner Schwester Christine für das genaue Korrekturlesen der Arbeit. Ermanno Giannini danke ich ebenfalls für seine Hilfe und umfangreiche Unterstützung; besonders gegen Ende dieser Arbeit.

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Peer reviewed Manuskript eingereicht:

Baumann C., Kloß A., Gohlke S., Mishto M., Nicholson T., Sheppard P., Kloetzel PM., Dahlmann B. Poly-Ub-substrate-degradative activity of 26S proteasome is not impaired in the aging rat brain "

Peer reviewed Manuskrpit in Vorbereitung

Gohlke S., Mishto M., Baumann C., Textoris-Taube K., Keller C., Vasuri F., Capizzi E., Dèrrico-Grigioni A., Kloetzel PM., Dahlmann B.. "Molecular alterations in proteasomes of rat liver during aging".

Poster

Baumann C., Kloetzel P.-M., Dahlmann B. *Biochemical comparison of proteasomes in brain tissue from young and old rats*.19th European Student Conference, 2008, Berlin

Erklärung

"Ich, Carolin Baumann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Biochemischer Vergleich von Proteasomen aus Hirngewebe junger und alter Ratten selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

Datum

Unterschrift