

JEAN KRUTMANN und FRITZ BOEGE

**Das Graduiertenkolleg
„Molekulare Ziele von Alterungsprozessen und
Ansatzpunkte der Alterungsprävention“**

Zusammenfassung

Am 17. Oktober 2003 beschloss die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) die Einrichtung des Graduiertenkollegs 1033 „Molekulare Ziele von Alterungsprozessen und Ansatzpunkte der Alterungsprävention“. Es wird von Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern der Medizinischen und der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und des Instituts für umweltmedizinische Forschung (IUF) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH getragen. Sprecher des Graduiertenkollegs ist Univ.-Prof. Dr. Jean Krutmann, Direktor des IUF, stellvertretender Sprecher Univ.-Prof. Dr. Fritz Boege, Direktor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik (KCL).

Das Graduiertenkolleg konzentriert sich in seinem Forschungsprogramm auf den Zusammenhang von oxidativem Stress und Alterungsvorgängen bzw. entsprechenden therapeutischen Präventivstrategien. Nach unserer Auffassung des derzeitigen Wissensstandes sind hierbei folgende grundlegende mechanistische Prinzipien zu berücksichtigen: das Gleichgewicht aus Generierung und Beseitigung bzw. Reparatur defekter Makromoleküle, ein Mechanismus, der (a) für die Akkumulation pathologischer progerischer Proteinaggregate und die damit verbundenen degenerativen Prozesse verantwortlich ist und (b) auch die Funktion des Genoms und der Mitochondrien limitiert. Darüber hinaus entscheidet (c) die koordinierte Kontrolle von Zellzyklus und Zelltod, ob eine einzelne Zelle nach einer begrenzten Lebenszeit stirbt oder seneszent wird. Diese drei Kardinaltypen von Alterungsmechanismen werden in zehn Dissertationsprojekten exemplarisch thematisiert. Die einzelnen Forschungsprojekte sind sowohl durch die übergeordnete Thematik „oxidativer Stress und Alterungsvorgänge“ als auch durch gemeinsame Themenfelder (Akkumulation/Abbau defekter Proteine; Integrität des mitochondrialen Genoms; Apoptose und Seneszenz; Antioxidantien/Osmolyte und Prävention) inhaltlich miteinander verknüpft. Jedes Themenfeld wird von jeweils mehr als zwei Arbeitsgruppen unter verschiedenen Blickwinkeln erforscht.

Diesem sehr homogenen und in sich verschränkten Forschungsverbund entspricht die Struktur des Studienprogramms. So erfordert die Bearbeitung jedes Dissertationsprojektes die Durchführung der experimentellen Arbeiten in einem Primärlabor (Doktorvater) und in mindestens zwei weiteren Komplementärlabors (weitere Betreuer). Forschungs- und Studienprogramm spannen hierbei einen Bogen von den naturwissenschaftlichen Grundlagen bis hin zur klinischen Medizin.

Am Graduiertenkolleg 1033 sind folgende Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler beteiligt: Univ.-Prof. Dr. Fritz Boege, Institut für Klinische Chemie und Laborato-

riumsdiagnostik (Projekt 3), Univ.-Prof. Dr. Stefan R. Bornstein, Klinik für Endokrinologie (Projekt 7), Prof. Dr. Norbert Gattermann, Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie (Projekt 5), PD Dr. Tilman Grune, IUF (Projekt 2), Univ.-Prof. Dr. Dieter Häussinger und PD Dr. Ulrich Warskulat, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie (Projekt 10), Univ.-Prof. Dr. Jean Krutmann, IUF (Projekt 4), Univ.-Prof. Dr. Hans-Werner Müller und Dr. Patrick Küry, Neurologische Klinik (Projekt 8), Univ.-Prof. Dr. Guido Reifenberger, Institut für Neuropathologie (Projekt 1), Univ.-Prof. Dr. Ulrich Rütter, Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere, und PD Dr. Hans Arno Müller, Institut für Genetik (Projekt 6), Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Helmut Sies, Univ.-Prof. Dr. Wilhelm Stahl und PD Dr. Christina Polidori, Institut für Physiologische Chemie I (Projekt 9).

Forschungsprogramm

Molekulare Alterungsvorgänge und oxidativer Stress

Im Rahmen des Alterungsprozesses, dem alle lebendigen Organismen unterliegen, kommt es zu einer zunehmenden Einschränkung physiologischer Funktionen und zu einer erhöhten Inzidenz für bestimmte Erkrankungen. So treten degenerative Erkrankungen des neuromuskulären Gewebes und Krebserkrankungen, z. B. klonale Knochenmarkserkrankungen, mit steigendem Lebensalter gehäuft auf. Die hohe Relevanz des Themas Alterung für die Grundlagenforschung bis hin zur klinischen Medizin ergibt sich aus der demographischen Entwicklung, auf Grund derer mit einem erheblich steigenden Anteil alter Menschen an der Gesamtbevölkerung und den damit verbundenen medizinischen Konsequenzen zu rechnen ist. Dies spiegelt sich in der zunehmenden Thematisierung dieses Forschungsgebietes sowohl in der Laienpresse¹ als auch in der internationalen Fachpresse² wider.

In zahlreichen Arbeiten der letzten Jahrzehnte ist eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bzw. oxidativem Stress sowohl beim Alterungsvorgang selbst als auch in der Pathophysiologie der damit assoziierten Erkrankungen nachgewiesen worden.³ Auf Grund dessen nimmt die Untersuchung der reaktiven Sauerstoffspezies und ihrer Auswirkungen auf die Zellen bzw. den Organismus eine zentrale Rolle in der molekularen Alterungsforschung ein und steht konsequenterweise thematisch im Zentrum dieses Graduiertenkollegs. Ziel dieser Untersuchungen ist letztendlich die Entwicklung neuer therapeutischer und präventiver Strategien. Durch die Einbettung der zehn Dissertationsprojekte in diesen Kontext ergibt sich vor dem gemeinsamen Hintergrund der Untersuchung der Regulation von zellulären Prozessen durch oxidativen Stress und deren Bedeutung beim Alterungsvorgang ein hoher Grad der Vernetzung innerhalb des Graduiertenkollegs.

Reaktive Sauerstoffspezies entstehen im Organismus hauptsächlich bei der in den Mitochondrien ablaufenden Atmungskette. Hierbei wird der Organismus mit einer schädlichen Form des Sauerstoffs, dem Superoxidanionradikal, konfrontiert.⁴ Als Folge chemischer Umsetzungen im Organismus entstehen aus dem Superoxid weitere reaktive Sauerstoffspezies (ROS), das relativ langlebige Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das sehr kurz-

¹ Vgl. z. B. *Die Zeit* vom 23. Januar 2003: „Das Projekt Unsterblichkeit“.

² Vgl. z. B. die Zeitschriften *Science Knowledge Environments* und *Science of Ageing Knowledge Environment*.

³ Vgl. Wallace (1992).

⁴ Vgl. Chance *et al.* (1979), Loschen *et al.* (1974) sowie Sies (1986).

lebige und hochreaktive Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$); in der Reaktion mit dem Stickstoffmonoxid (NO) entsteht Peroxynitrit (ONOO^-), eine ebenfalls hochreaktive Verbindung.⁵

Diese reaktiven Spezies können jedoch auch nach Exposition gegenüber extrazellulären Stimuli wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren bzw. Umwelttoxinen wie UV-Strahlung entstehen. Auf Grund ihrer Reaktivität führen die reaktiven Spezies zu einer oxidativen Modifikation zellulärer Bestandteile wie Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden. In der Folge kann es zu einer Störung zellulärer Funktionen durch Proteolyse⁶ und Akkumulation von Proteinen⁷ sowie zu Mutationen nukleärer und mitochondrialer DNS⁸ kommen. Neben dieser eher ungerichteten Schädigung zellulärer Funktionen führen reaktive Spezies jedoch auch zur Aktivierung spezifischer Signalwege und zur Modulation der Genexpression.⁹ Die Aktivierung spezifischer Signalkaskaden und das Ausmaß der Schädigung zellulärer Makromoleküle regulieren im Folgenden die Stressantwort, in deren Rahmen es zu Proliferation, Seneszenz oder Apoptose kommt. Über diese Mechanismen spielen reaktive Spezies eine zentrale Rolle beim Alterungsprozess, der eng mit den eingangs genannten Erkrankungen assoziiert ist.

Zum Schutz vor der toxischen Wirkung von ROS hat der Organismus im Laufe der Evolution sowohl ein komplexes enzymatisches als auch ein nicht-enzymatisches antioxidatives System entwickelt.¹⁰ Antioxidantien sind aber nicht nur ein Bestandteil des endogenen Metabolismus, sondern finden sich in Form von Carotinoiden, Flavonoiden, Vitamin E u. a. in verschiedenartigen Nahrungsmitteln. Die protektiven Effekte derartiger Antioxidantien eröffnen die Möglichkeit eines präventiven und therapeutischen Einsatzes der antioxidativen Nahrungsbestandteile.¹¹ Zudem weisen neueste Untersuchungen darauf hin, dass Osmolyte, wie z. B. Taurin, zytoprotektive Wirkungen haben, die sowohl an die Effekte von Chaperonen als auch an die von Antioxidantien erinnern und durch die sich für den Alterungsprozess wesentliche zelluläre Funktionen beeinflussen lassen, wie z. B. Apoptose oder die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität.¹²

Kommt es zu einem Überwiegen der reaktiven Spezies und einem Versagen dieses antioxidativen Systems, spricht man von oxidativem Stress.¹³ Die Bedeutung von oxidativem Stress in der Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen ist in den letzten Jahren zunehmend deutlich geworden. Zuerst formulierte Denham Harman 1956 diese Theorie des Alterns durch freie Radikale, die davon ausgeht, dass endogen erzeugte ROS kumulative Schäden im Organismus auslösen, die zu Alterung und Tod führen.¹⁴ Obwohl der Zusammenhang von oxidativem Stress und zellulärem Alterungsvorgang durch zahlreiche Studien nahe gelegt wurde,¹⁵ sind wesentliche Aspekte der oben genannten Hypothese noch unbekannt. Insbesondere sind auch heute noch die mechanistischen Grundlagen des

⁵ Übersicht in Halliwell und Gutteridge (1999: 36-104).

⁶ Vgl. Davies und Goldberg (1987) sowie Giulivi *et al.* (1994).

⁷ Vgl. Stadtman (1992) sowie Grune *et al.* (2001).

⁸ Vgl. Wallace (1992), Berneburg *et al.* (1999) sowie Epe (2002).

⁹ Vgl. Allen und Tresini (2000) sowie Guyton *et al.* (1996).

¹⁰ Übersicht in Arteel *et al.* (1999), Brigelius-Flohè (1999) sowie Nordberg und Arner (2001).

¹¹ Vgl. Sies und Stahl (1995).

¹² Vgl. Graf *et al.* (2002).

¹³ Vgl. Sies (1985) und (1986).

¹⁴ Vgl. Harman (1956); Übersicht in Beckman und Ames (1998).

¹⁵ Übersicht in Beckman und Ames (1998).

postulierten Kausalzusammenhangs zwischen oxidativem Stress und Zell- bzw. Gewebeeralterung nicht aufgeklärt.

Die Bearbeitung dieser Fragestellung ist das zentrale Anliegen dieses Graduiertenkollegs. Wichtig ist hierbei die Frage, wie zelluläre Mechanismen, die von entscheidender Bedeutung für den Alterungsprozess von Zellen zu sein scheinen, durch oxidativen Stress beeinflusst werden. Hierzu gehören vor allem die Akkumulation und der Abbau defekter Proteine, die Aufrechterhaltung der Integrität des mitochondrialen Genoms und das Gleichgewicht von Apoptose und replikativer Seneszenz. Vor diesem Hintergrund bietet zudem der gezielte Einsatz von Antioxidantien und anderer zytoprotektiver Moleküle die Möglichkeit einer präventiven Intervention.

Akkumulation und Abbau defekter Proteine

Die Anhäufung pathologischer Proteinaggregate ist ein charakteristisches gemeinsames Merkmal verschiedener altersassoziierter und/oder progerischer neurodegenerativer Erkrankungen, wie z. B. dem Morbus Alzheimer, dem Morbus Parkinson oder auch den Prionerkrankungen.¹⁶ Alle diese Krankheiten manifestieren sich typischerweise im fortgeschrittenen Lebensalter, und es ist völlig unklar, warum die entsprechenden Proteinablagerungen während der ersten Lebensjahrzehnte noch nicht auftreten. Man vermutet, dass molekulare und/oder zelluläre *Clearance*-Mechanismen von Bedeutung sind, die im Alter zunehmend an Effizienz verlieren. Hierbei könnte das Ubiquitin/Proteasomensystem eine Rolle spielen, das den zellulären Abbau fehlgefalteter Proteine in der Zelle steuert.¹⁷ Diese Hypothese wird im Dissertationsprojekt 1 am Prionenmodell überprüft, wobei nicht nur auf ein besseres Verständnis des pathophysiologischen Zusammenhangs zwischen Proteinfehlfaltung, Alter und Neurodegeneration abgezielt wird, sondern auch auf die Erschließung neuer Therapieansätze, die auf der unlängst nachgewiesenen¹⁸ prinzipiellen Reversibilität der pathologischen Proteinablagerungen aufbauen.

Wahrscheinlich spielt die zelluläre Akkumulation defekter Proteine nicht nur bei neurodegenerativen Alterungsprozessen, sondern auch bei der Hautalterung eine Rolle, wobei es sich hier primär nicht um fehlgefaltete, sondern um oxidierte Proteine handelt, die überwiegend durch photooxidativen Stress hervorgerufen und dann als Vorstufen des Alterspigments Lipofuszin in Hautfibroblasten abgelagert werden.¹⁹ Auch in diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, warum dieser Prozess erst in der Altershaut quantitativ signifikant wird und nicht schon beim jungen Menschen, und auch hier wird ein Nachlassen der proteasomalen Aktivität diskutiert.²⁰ Diese Hypothese wird im Dissertationsprojekt 2 überprüft, das einerseits die Proteasomenaktivität in verschiedenen fibroblastären Alterungsmodellen untersucht und andererseits die Proteinakkumulation durch experimentelle Manipulationen des proteolytischen Systems beeinflussen will. Zudem sollen in Zusammenarbeit mit den Projekten 9 und 10 mögliche präventive Strategien untersucht werden, die einen Schutz vor der Akkumulation von pathologischen Proteinaggregaten bieten. Hierzu wird im Projekt 9 der präventive Effekt verschiedener Carotinoide auf Abbau und

¹⁶ Vgl. Prusiner (2001) sowie Taylor *et al.* (2002).

¹⁷ Vgl. Bence *et al.* (2001), Johnston *et al.* (1998) sowie Peters *et al.* (2002).

¹⁸ Vgl. Yamamoto *et al.* (2000) sowie Schenk *et al.* (1999).

¹⁹ Vgl. Stadtman (1992).

²⁰ Vgl. Grune *et al.* (2001).

Akkumulation von Proteinen untersucht. Parallel dazu soll im Projekt 10 der Einfluss von Taurin, einem endogenen Metaboliten, ermittelt werden.

Integrität des mitochondrialen Genoms

Reaktive Sauerstoffspezies sind nicht nur für die Oxidation von Proteinen, sondern auch für die Schädigung der DNS von zentraler Bedeutung.²¹ Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang die Integrität des mitochondrialen Genoms. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen der mtDNS im normalen Alterungsprozess akkumulieren und die Atmungskettenkapazität von Zellen parallel dazu abnimmt. Zusammenfassend wird heute davon ausgegangen, dass diese Mutationen Folge eines *Circulus vitiosus* sind, in dem oxidativer Stress zur Bildung mitochondrialer DNS-Mutationen führt, die wiederum durch Störung der oxidativen Phosphorylierung zu einer vermehrten ROS-Bildung und damit zu verstärkter Mutagenese führen.

In welchem Maße oxidativer Stress in permanente DNS-Schäden und letztendlich in den Verlust genomischer Funktionen umgesetzt wird, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Hierzu gehören protektive Effekte von Antioxidantien, die entweder exogen mit der Nahrung zugeführt werden (z. B. Carotinoide) oder dem endogenen Stoffwechsel entstammen (z. B. der Osmolyt Taurin). Darüber hinaus sind hier zu nennen: die Kapazität des DNS-Reparatursystems sowie aggravierende Prozesse des DNS-Metabolismus, die geringfügige (reparierbare) DNS-Primärläsionen (z. B. Basenfehlpaarungen) in großräumige (irreparable) genomische Schäden (z. B. Chromosomentranslokationen) umsetzen.

Diese Zusammenhänge werden im Rahmen des Graduiertenkollegs durch fünf Dissertationsprojekte beleuchtet: Das Dissertationsprojekt 3 untersucht die Aggravation von photooxidativen DNS-Läsionen durch die Interaktion mit DNS-Topoisomerasen und die damit verbundene Übersetzung der oxidativen Primärläsionen in großräumige genomische Rekombinationsdefekte. Die Rolle des *Circulus vitiosus* bei der Akkumulation von DNS-Schäden im mitochondrialen Genom, die resultierenden Konsequenzen für mitochondriale Funktionen, Hautalterung, Apoptose sowie die protektive Rolle verschiedener Schutzmechanismen werden im Dissertationsprojekt 4 untersucht. Es bildet damit eine Brücke zum Dissertationsprojekt 5, das die Akkumulation von Punktmutationen der mitochondrialen DNS und ihre funktionellen Konsequenzen im Rahmen der Alterung hämatopoetischer Vorläuferzellen untersucht.

Der protektiven Wirkung von nutritiven Antioxidantien wird im Dissertationsprojekt 9 nachgegangen, wobei über die Erforschung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen verschiedener semisynthetischer Carotinoide das präventiv-therapeutische Potenzial dieser Stoffgruppe beim Schutz des mitochondrialen Genoms aufgeklärt werden soll. Das Dissertationsprojekt 10 beschäftigt sich mit der Aufklärung der protektiven Wirkung des endogenen Metaboliten Taurin, die auf Grund des progerischen Phänotyps einer jüngst in dieser Arbeitsgruppe etablierten Taurin-Transporter-KO-Maus vermutet wird. Diese Vorbefunde deuten darauf hin, dass dem Taurin als Chaperon und/oder Antioxidans eine zentrale Rolle für den Schutz mitochondrialer DNS und mitochondrialer Proteine vor oxidativer Belastung zukommt.

²¹ Vgl. Grune *et al.* (2001).

Apoptose und replikative Seneszenz

Nicht-maligne, differenzierte Zellen besitzen in den meisten Fällen eine limitierte Lebensdauer. Sie sterben entweder durch programmierten Zelltod (Apoptose) oder fallen in einen Zustand der Wachstumsarretierung (replikative Seneszenz). Letztendlich ergibt sich die Überlebensdauer einer Zelle aus dem Zusammenspiel von Zellzykluskontrolle und Apoptoseregulation.

Dieser Zusammenhang zwischen Apoptose und zellulärer Alterung wird beispielhaft durch eine Reihe von Proteinen belegt, die offenbar bei beiden Prozessen eine Rolle spielen. So wurde in alternden Zellen eine Erhöhung der Konzentration des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 wie auch des Apoptose vermittelnden Proteins Bax gefunden.²² Interessanterweise wird der Schutz vor Bax-induzierter Apoptose als eine der Funktionen des zellulären Prionproteins diskutiert.²³ Auch andere Moleküle, die primär als „Alterungsmarker“ entdeckt wurden, regulieren die Apoptose. Die Konzentration des Calciumbindungsproteins SM30 nimmt mit dem Alter ab. Durch Inaktivierung des SM30-Gens in der Maus konnte gezeigt werden, dass SM30-negative Zellen sehr empfänglich für die Induktion der Apoptose sind.²⁴ Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass die Lebensdauer von Zellen sehr wahrscheinlich von der Stärke antiapoptotischer Signale abhängig ist. Diese Vermutung wird durch neuere Daten aus der *Drosophila*-Genetik unterstützt, die eine klare Korrelation zwischen der Lebensdauer von Fliegen und der Mutagenese von apoptotischen und antiapoptotischen Faktoren zeigen.²⁵

Der offenbar zentralen Bedeutung der Apoptose bei der Zellalterung wird im Forschungsprogramm des Graduiertenkollegs durch zwei Dissertationsprojekte Rechnung getragen: Das Dissertationsprojekt 6 untersucht den Wnt-Inhibitor Dkk-1 sowie Caspasen und deren Substrate. Dkk1 ist als Modulator für eine übergeordnete Koordination des Netzwerkes von Apoptoseeffektoren und -effektorinhibitoren verantwortlich und hat ein diskontinuierliches, zeitlich und räumlich sehr scharf umgrenztes Expressionsmuster. Damit sind Dkk-1 und seine stromaufwärts gelegenen Regulatoren wichtige Kandidaten für die Lebenszeitregulation der Zelle. Die Regulation von Dkk-1 soll in der transgenen Maus durch Reporterkonstrukte untersucht werden. Es soll ermittelt werden, welche Proteine in die Regulation der Dkk-1-Expression eingeschaltet sind und in welcher Weise diese durch (photo-)oxidativen Stress zu beeinflussen sind (Zusammenarbeit mit den Projekten 3 und 4). Weiterhin soll in Kooperation mit den Projekten 9 und 10 der Effekt von nutritiven Antioxidantien und Osmolyten auf eine oxidativ bedingte Aktivierung von Dkk1 und auf die dadurch induzierte Apoptose untersucht werden. Zudem beschäftigt sich das Projekt in einem zweiten Teil mit Caspasen als den exekutierenden Faktoren der apoptotischen Maschinerie, die zelluläre Substrate spalten und damit zu den spezifischen morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zellen führen. Bislang sind nur sehr wenige zelluläre Substrate der Caspasen gefunden worden, deren Spaltung eindeutig mit den typischen apoptotischen Zellveränderungen in Verbindung steht. Das Dissertationsprojekt 6 will deshalb weitere Caspasesubstrate identifizieren und deren Spaltung ursächlich der Erzeugung des apoptotischen Phänotyps zuordnen. Die Identifizierung neuer Proteine ist

²² Vgl. Wagner *et al.* (2001).

²³ Vgl. Bounhar *et al.* (2001).

²⁴ Vgl. Ishigami *et al.* (2002).

²⁵ Vgl. Moskalev und Zainullin (2001).

wichtig für das Verständnis ihrer Funktion für die Aufrechterhaltung der Zellintegrität und der damit verbundenen Lebensdauer. Im Dissertationsprojekt 7 wird am Beispiel der Endokrinoseneszenz der Nebenniere ein neuer Mechanismus des MHC-Klasse-II/Fas-rezeptorvermittelten Zelltodes untersucht.²⁶ Bislang sind die Mechanismen unbekannt, die im Rahmen des Alterungsvorgangs zu einer Involution der Androgen produzierenden Zone (*Zona reticularis*) der Nebenniere führen. Die zentrale Bedeutung der adrenalen Mitochondrienstruktur und der antioxidativ wirksamen Faktoren beim Alterungsprozess der *Zona reticularis* stellt gleichzeitig die Verbindung zu den oben aufgeführten Projekten der oxidativen DNS-Schädigung und Mitochondrienalterung dar (Kooperation mit Projekt 4). Im Rahmen dieses Graduiertenkollegs soll ermittelt werden, welchen Einfluss oxidativer Stress bzw. Antioxidantien auf die Apoptose und den Alterungsprozess in der Nebenniere haben (Projekt 9).

Neben dem programmierten Zelltod bzw. dessen Unterdrückung sind an der Zellalterung aber wohl auch Faktoren beteiligt, die den Zustand der replikativen Seneszenz auslösen oder unterhalten, indem sie in die Zellzykluskontrolle eingreifen (ohne dabei notwendigerweise das regulatorische Netzwerk der Apoptose zu tangieren). Eine Reihe von Befunden lässt vermuten, dass solche Mechanismen bei der Alterung des peripheren Nervensystems und speziell der Schwann'schen Zellen eine Rolle spielen. Diese Zellen zeigen im Kontext spontaner altersbedingter Neuropathien ein verändertes Migrationsverhalten²⁷ sowie eine erhöhte Proliferationsrate *in vivo*.²⁸ Im Gegensatz dazu hat eine jüngste ausführliche Studie an kultivierten Schwann-Zellen gezeigt, dass diese Zellen *in vitro* praktisch unbeschränkt vermehrungsfähig sind; der gealterte Phänotyp kann hier jedoch künstlich über einen S-Phase-Arrest induziert werden.²⁹ Man vermutet, dass bei der Vermittlung dieses Effektes zellzyklusabhängige Kinase-Inhibitoren (CDKI) eine zentrale Rolle spielen, denn viele primäre wie auch immortalisierte und transformierte Zellen altern, wenn sie erhöhte Mengen solcher Inhibitoren produzieren. Dies wurde kürzlich z. B. für die Expression des CDKI p57kip2 in humanen Astrozytomzellen gezeigt.³⁰ Im Dissertationsprojekt 8 wird dieser Frage nachgegangen, und es soll näher untersucht werden, ob auch die (replikativen) Alterungsprozesse von Gliazellen, insbesondere von Schwann'schen Zellen, über den zellzyklusabhängigen Kinase-Inhibitor p57kip2 bzw. den p57kip2 regulierenden Transkriptionsfaktor Mash2 vermittelt werden und welche Bedeutung oxidative Prozesse hierbei haben. In Zusammenarbeit mit den Projekten 2 und 6 soll darüber hinaus geklärt werden, ob (a) eine Korrelation mit der Proteasomenaktivität beobachtet werden kann und (b) Wnt-abhängige Signalkaskaden an der Regulation von p57kip2 und Mash2 beteiligt sind.

Antioxidantien/Osmolyte und Prävention

Auf Grund des zunehmenden Anteils alter Menschen an der Gesamtbevölkerung ist eine präventive bzw. therapeutische Intervention beim Alterungsvorgang und der damit assoziierten Erkrankungen von zentraler Bedeutung. Antioxidantien bieten wegen ihrer Pro-

²⁶ Vgl. Marx *et al.* (1998).

²⁷ Vgl. Santos *et al.* (2000).

²⁸ Vgl. Tabata *et al.* (2000).

²⁹ Vgl. Mathon *et al.* (2001).

³⁰ Vgl. Tsugu *et al.* (2000).

tektion gegenüber oxidativem Stress ein hohes präventives und therapeutisches Potenzial. So konnte in einer Reihe von Studien belegt werden, dass Carotinoide als nutritive Antioxidantien vor oxidativer Schädigung schützen, die beispielsweise in der Haut nach UV-Bestrahlungen auftritt.³¹ Im Dissertationsprojekt 9 soll daher die protektive Wirkung der nutritiven Antioxidantien systematisch untersucht werden, wobei über die Erforschung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen verschiedener semisynthetischer Carotinoide das präventiv-therapeutische Potenzial dieser Stoffgruppe im Modellsystem der unilamellaren Liposome beurteilt werden soll. Im Zellkulturmodell soll die Wirkung von Carotinoiden auf UV-induzierte Schädigungen und zelluläre Stressantworten untersucht werden. Dabei sollen in Kooperation mit den Projekten 2 und 4 auch Mutationen der mitochondrialen DNS und die oxidative Modifikation von Proteinen als zelluläre Biomarker verwendet werden. Darüber hinaus werden die so charakterisierten Antioxidantien den anderen Teilprojekten zur Verfügung gestellt, um die funktionelle Relevanz von oxidativem Stress bzw. die protektive Wirkung der Antioxidantien auch in diesen Systemen zu untersuchen (Projekte 1 bis 8 und 10).

Im Dissertationsprojekt 10 soll das präventive und therapeutische Potenzial des endogenen Osmolyten Taurin untersucht werden. Grundlage hierfür stellt ein von dieser Arbeitsgruppe etabliertes KO-Mausmodell für den Taurintransporter dar.³² So zeigen diese Mäuse einen progerischen Phänotyp, aus dem sich erste Hinweise auf eine protektive Wirkung von Taurin im Zusammenhang mit Alterungsvorgängen ergeben. Diese Vorbefunde deuten darauf hin, dass dem Taurin als Chaperon und/oder Antioxidans eine zentrale Rolle im Schutz vor oxidativer Modifikation von Proteinen und mitochondrialer DNS zukommt. Dieses Mausmodell soll zunächst im Hinblick auf die auftretenden Herz- und Skelettmuskelschäden und die damit verbundene oxidative Schädigung von Proteinen und Mitochondrienveränderungen in Kooperation mit den Projekten 2, 4 und 5 genauer charakterisiert werden. In Interventionsstudien soll der mögliche protektive Einfluss auf Herz- und Skelettmuskelalterung von Nicht-Taurin-Osmolyten und nutritiven Antioxidantien (Kooperation mit Projekt 9) überprüft werden. Auf Grund der erhobenen Befunde werden die charakterisierten Osmolyte den anderen Teilprojekten zur Untersuchung der protektiven Wirkung zur Verfügung gestellt (Projekte 1 bis 8).

Innovatives Potenzial des Forschungsprogramms

Durch die enge thematische und methodische Verzahnung und Interaktion dieser zehn Dissertationsprojekte entsteht an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ein einzigartiges wissenschaftliches Umfeld zur Erforschung der molekularen Grundlagen des Alterungsvorgangs. Das hieraus resultierende hohe innovative Potenzial lässt sich beispielhaft an folgenden, nur in der geplanten Kooperation zu bearbeitenden Fragestellungen darstellen:

- Funktionelle Charakterisierung von am *Clearance*-Prozess von Prionproteinen beteiligten Molekülen anhand von transgenen bzw. Knock-out-Mäusen (Projekte 1 und 6);
- Untersuchung der Relevanz mitochondrialer Mutagenese und des daraus resultierenden oxidativen Stresses für die Oxidation von Proteinen und die Funktion des proteasomalen Systems (Projekte 1, 2, 3, 4, 5, 9 und 10);

³¹ Vgl. Lee *et al.* (2000) sowie Sies und Stahl (1995).

³² Vgl. Heller-Stilb *et al.* (2000).

- Untersuchung der protektiven Wirkung von Antioxidantien und katalytischer Inhibitoren der Topoisomerase II auf die Generation lichtalterungsinduzierter mitochondrialer DNS-Mutationen und der daraus resultierenden funktionellen Konsequenzen (Projekte 3, 4, 5 und 9)
- Untersuchung der *Anti-ageing*-Wirkung von Osmolyten im Vergleich zu Antioxidantien im Hinblick auf die mechanistischen Aspekte von Proteinoxidation, Integrität des mitochondrialen Genoms, Apoptose und Seneszenz (Projekte 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10)
- Bedeutung oxidativer DNS-Schäden und der Mitochondrialalterung für die Endokrinoseneszenz der Nebennieren (Projekte 4, 7 und 9).

Studienprogramm

Die Ausbildung gliedert sich in einen allgemeinen Teil, der die regelmäßige Teilnahme an Ringvorlesungen und Seminaren sowie die erfolgreiche Teilnahme an Methodenpraktika umfasst, und einen speziellen Teil, der die Orientierungsphase und die Projektarbeit beinhaltet. Hinzu kommen gemeinsame Seminare, Kongressveranstaltungen, Präsentationsstraining und die Ausbildung in *Grantmanship* und anderen editorischen Techniken. Jedem Kollegiaten bzw. Stipendiaten werden aus dem Kreis der Antragsteller neben seinem/ihrer Doktorvater/-mutter (Primärlabor) zwei weitere Betreuer zugeordnet. Diese Betreuer sind die Projektleiter und/oder Nachwuchswissenschaftler der zum jeweiligen Primärlabor komplementären Arbeitsgruppen, mit denen zur Durchführung der Disserationsarbeit eine Kooperation notwendig ist. Diese haben gemeinsam die Aufgabe, das Projekt über alle Phasen der Promotion zu begleiten, insbesondere zu Beginn des Projektes das Konzept zu diskutieren und sich regelmäßig (alle sechs bis zwölf Monate) mit dem Fortschritt des Projektes auseinander zu setzen.

Zu den Kernthemen des Forschungsprogramms wird eine *Ringvorlesung* aus Vorlesungen der am Graduiertenkolleg beteiligten Dozenten organisiert. In diese Vorlesungsreihe werden jährlich zwölf Gastvorträge sowie weitere thematisch angrenzende Vorträge und Seminare der beteiligten Sonderforschungsbereiche integriert. Diese Veranstaltungen werden wenigstens einmal pro Semesterwoche als Pflichtveranstaltungen für alle Stipendiaten und Kollegiaten stattfinden. Daneben werden die Stipendiaten und Kollegiaten in Absprache mit den jeweiligen Betreuern Wahlpflichtveranstaltungen aus dem Vorlesungsangebot der Universität auswählen, die thematisch die Projektarbeit ergänzen.

Zudem werden den Stipendiaten und Kollegiaten unterschiedliche *Methodenpraktika* in den Labors der teilnehmenden Wissenschaftler angeboten. Diese Praktika vermitteln Labortechniken und weitere für Stipendiaten und Kollegiaten zur Realisierung ihrer Projekte notwendige praktische Fähigkeiten. Sie beginnen mit einer theoretischen Einführung; es wird ein Ausbildungsprotokoll erstellt und die Teilnahme wird benotet und testiert. Nach Beratung mit den Betreuern wird jeder Stipendiat bzw. Kollegiat pro Jahr wenigstens zwei solcher Methodenpraktika belegen, die bezüglich ihrer Ausbildungsinhalte die Projektarbeit ergänzen. Die Auswahl der Methodenpraktika erfolgt hierbei aus den zur Expertise des Primärlabors komplementären Themenfeldern. Hierdurch ist gewährleistet, dass die Stipendiaten und Kollegiaten optimal auf die Kooperation mit den Komplementärlabors vorbereitet werden. Besonders wichtig sind für jeden Teilnehmer die Beherrschung der elektronischen Datenverarbeitung, der Gebrauch elektronischer Online-Datenbanken so-

wie die Aneignung von Grundlagen zur Erstellung von wissenschaftlichen Publikationen, Anträgen und Präsentationen. Deshalb werden diese Ausbildungseinheiten für alle Kollegiaten und Stipendiaten zwingend vorgeschrieben. Die Präsentations- und Vortragstechnik wird im Rahmen der Projektvorstellung und während einer Klausurtagung trainiert.

Die Teilnahme an einem *Graduiertenseminar*, das in etwa sechswöchigem Turnus abgehalten wird, ist für Stipendiaten, Kollegiaten und Dozenten obligatorisch. Hier wird der Fortschritt der einzelnen Projekte von den Teilnehmern ab dem zweiten Ausbildungsjahr in kongressfähiger Form und möglichst in Englisch vorgestellt und diskutiert. Es ist angestrebt, dass die Stipendiaten gegen Ende des zweiten Ausbildungsjahres einen nationalen oder internationalen Kongress besuchen und dort ihre Daten präsentieren. Das Graduiertenseminar wird einmal jährlich durch eine *Klausurtagung* des Graduiertenkollegs ergänzt, in dem neben einem thematisch fokussierten Vortragsprogramm Projektpräsentationen in kompetitiver Form zur Bewertung kommen. Außerdem ist der gegenseitige Besuch einer entsprechenden Veranstaltung des Graduiertenkollegs „Pathologische Prozesse des Nervensystems: Vom Gen zum Verhalten“ und des International Graduate College „Molecular Mechanisms of Food Toxicology“ geplant.

Zugangsvoraussetzungen

Das Graduiertenkolleg 1033 ist mit einer detaillierten Darstellung des Forschungs- und Ausbildungsprogramms im Internet vertreten.³³ Interessenten können sich hier umfassend informieren und sich mit dem Sprecher oder gezielt mit den Projektleitern der einzelnen Forschungsprojekte in Verbindung setzen. Bewerbungen sollten über den jeweiligen prospektiven Projektleiter an den Sprecher gerichtet werden und zumindest einen Lebenslauf sowie die bisherigen Zeugnisse und Studienabschlüsse enthalten. Vor einer Bewerbung sollte möglichst früh Kontakt zu dem jeweiligen Projektleiter hergestellt werden.

In der ersten Stipendiatenkohorte müssen die Bewerber das Diplom der Biologie besitzen oder das Medizinische Staatsexamen absolviert plus eine experimentelle Doktorarbeit abgeschlossen haben. Die nötige überdurchschnittliche Qualifikation der Bewerber/innen wird zunächst anhand belegbarer Größen (Studiendauer, Fächerkombinationen, Noten) überprüft und dann zusätzlich durch ein Aufnahmegespräch mit zwei beteiligten Hochschullehrern beurteilt. Auch bei Bewerbungen aus dem Ausland werden die oben genannten belegbaren Größen und außerdem die Äquivalenzbewertung der ausbildenden Institutionen herangezogen.

In späteren Stipendiatenkohorten werden Bewerber aus der Medizin, die nach neuer Approbationsordnung studieren, anhand der Studienleistungen im ersten und zweiten Studienjahr und eines persönlichen Gesprächs zunächst als Kollegiaten und dann für ein Jahr als Forschungsstudierende rekrutiert; sie erhalten schließlich nach interner Evaluation ihrer Leistungen während dieser Orientierungsphase durch ein Gremium, das aus dem Betreuer und zwei weiteren beteiligten Hochschullehrern besteht, ein weiterführendes Doktorandenstipendium.

Postgraduierte Stipendiaten werden im dritten und vierten Bewilligungsjahr aus der ersten Stipendiatenkohorte auf Grund besonderer Leistungen ausgewählt. Hierbei werden sowohl herausragende Leistungen auf dem Gebiet der Projektpräsentation bewertet als auch

³³ Vgl. <http://www.iuf.uni-duesseldorf.de/GRK1033/> (05.08.2004).

eine exzellente Projektarbeit, die sich z. B. auf Grund von Publikationen, Kongressbeiträgen und auswärtigen Posterpräsentationen objektivieren lässt. Die Vergabe der Postgraduiertenstipendien wird von allen beteiligten Wissenschaftlern des Graduiertenkollegs gemeinsam mehrheitlich beschlossen.

Literatur

- ALLEN, R. G. und M. TRESINI. „Oxidative stress and gene regulation“, *Free Radical Biological Medicine* 28 (2000), 463-499.
- ARTEEL, G. E., K. BRIVIBA und H. SIES. „Protection against peroxynitrite“, *Federation of European Biochemical Societies Letters* (1999), 226-230.
- BECKMAN, K. B. und B. N. AMES. „The free radical theory of ageing matures“, *Physiological Review* 78 (1998), 547-581.
- BENCE, N. F., R. M. SAMPAT und R. R. KOPITO. „Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation“, *Science* 292 (2001), 1552-1555.
- BERNEBURG, M., S. GREETHER-BECK, V. KÜRTEIN, T. RUZICKA, K. BRIVIBA, H. SIES und J. KRUTMANN. „Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoageing-associated mitochondrial common deletion“, *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), 15345-15349.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R. „Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases“, *Free Radical Biological Medicine* 262 (1987), 8220-8226.
- BOUNHAR, Y., Y. ZHANG, C. GOODYER und A. LEBLANC. „Prion protein protects human neutrons against Bax-mediated apoptosis“, *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), 39145-39149.
- CHANCE, B., H. SIES und A. BOVERIS. „Hydroperoxide metabolism in mammalian organs“, *Physiological Review* 59 (1979), 527-605.
- DAVIES, K. J. A. und A. L. GOLDBERG. „Oxygen radicals stimulate proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes“, *Journal of Biological Chemistry* 262 (1987), 8220-8226.
- EPE, B. „Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice?“, *Biological Chemistry* 383 (2002), 467-475.
- GIULIVI, D., A. K. KURZ, R. FISCHER und K. J. A. DAVIES. „Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxide-modified hemoglobin by multicatalytic proteinase complex proteasome“, *Archives of Biochemical Biophysics* 311 (1994), 329-341.
- GRAF, D., A. K. KURZ, R. FISCHER und D. HÄUSSINGER. „Tauroursodesoxycholate prevents taurolithocholic acid-3-sulfate induced apoptosis independent of PI-3 kinase and upstream of caspase 8 activation“, *Gastroenterology* 122 (2002), 1411-1427.
- GRUNE, T. R. SHRINGARPURE, N. SITTE und K. J. A. DAVIES. „Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells“, *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 56A (2001), B459-B367.
- GUYTON, K. Z., Y. LIU, M. GOROSPE, Q. XU und N. J. HOLBROOK. „Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury“, *Journal of Biological Chemistry* 271 (1996), 4138-4142.
- HALLIWELL, B. und J. M. GUTTERIDGE. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford und New York 1999.
- HARMAN, D. „Ageing: a theory based in free radical and radiation chemistry“, *Journal of Gerontology* 2 (1956), 298-300.

- HELLER-STILB, B., C. VAN ROEYEN, K. RASCHER, H. G. HARTWITZ, A. HUTH, M. W. SEELIGER, U. WARSKULAT und D. HÄUSSINGER. „Disruption of the taurine transporter gene (taut) leads to retinal degeneration in mice“, *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 16 (2000), 231-233.
- ISHIGAMI A., T. FUJITA, S. HANDA, T. SHIRASAWA, H. KOSEKI, T. KITAMURA, N. ENOMOTO, N. SATO, T. SHIMOSAWA und N. MARUYAMA. „Senescence marker protein-30 knockout mouse liver is highly susceptible to tumor necrosis factor-alpha- and fas-mediated apoptosis“, *American Journal of Pathology* 161 (2002), 1273-1281.
- JOHNSTON, J. A., C. L. WARD und R. R. KOPITO. „Aggresome: a cellular response to misfolded proteins“, *Journal of Cell Biology* 143 (1998), 1883-1898.
- LEE, J., S. JIANG, N. LEVINE und R. R. WATSON. „Carotenoid supplementation reduces erythema in human skin after simulated solar radiation exposure“, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 223 (2000), 170-174.
- LOSCHEN, G., A. AZZI, C. RICHTER und L. FLOHE. „Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide“, *Federation of European Biochemical Societies Letters* 42 (1974), 68-72.
- MARX, C., G. W. WOLKERSDÖRFER und S. B. BORNSTEIN. „A new view on immune-adrenal interactions role for Fas and Fas ligand?“, *Neuroimmunomodulation* 5 (1998), 5-8.
- MATHON, N. F., D. S. MALCOLM, M. C. HARRISINGER, I. CHENG und A. C. LLOYD. „Lack of replicative senescence in normal rodent glia“, *Science* 291 (2001), 972-875.
- MOSKALEY, A. A. und V. G. ZAINULLIN. „Role of apoptotic cell death in radioinduced ageing in drosophila melanogaster“, *Radiatsionnaia biologii radioecologii* 41 (2001), 650-652.
- NORDBERG, J. und E. S. ARNER. „Reactive oxygen species antioxidants, and the mammalian thiodoxin system“, *Free Radical Biological Medicine* 31 (2001), 1287-1312.
- PETERS, P. J., K. NING, F. PALACIOS, R. L. BOSHANS, A. KAZANTSEV, L. M. THOMPSON, B. WOODMAN, G. P. BATES und C. D' SOUZA-SCHOREY. „Arfaptin 2 regulates the aggregation of mutant huntingtin protein“, *Natural Cell Biology* 4 (2002), 240-245.
- PRUSINGER, S. B. „Shattuck lecture – neurodegenerative diseases and proteins“, *The New England Journal of Medicine* 344 (2001), 1516-1526.
- SANTOS, A. R., M. L. WADA, F. LANGONE und A. L. OLIVERA. „Differential schwann cell migration in adult and old mice: an in vitro study“, *Brain Research* 881 (2000), 73-76.
- SCHENK, D., R. BARBOUR, W. DUNN, G. GORDON, H. GRAJEDA, T. GUIDO, K. HU, J. HUANG, K. JOHNSON-WOOD, K. KHAN, D. KHOLODENKO, M. LEE, Z. LIAO, I. LIEBERBURG, R. MOTTER, L. MUTTER, F. SORIANO, G. SHOPP, N. VASQUEZ, C. VANDEVERT, S. WALKER, M. WOGULIS, T. YEDNOCK, D. GAMES und P. SEUBERT. „Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse“, *Nature* 400 (1999), 173-177.
- SIES, H. „Oxidative Stress: introductory remarks“, in: H. SIES (Hrsg.). *Oxidative stress*. London 1985, 1-8.
- SIES, H. „Biochemie des oxidativen Stress“, *Angewandte Chemie* 98 (1986), 1061-1675.
- SIES, H. und W. STAHL. „Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants“, *The American Journal of Clinical Nutrition* 62 (6 Supplement) (1995), 1315S-1321S.
- STADTMAN, E. R. „Protein oxidation and ageing“, *Science* 257 (1992), 1220-1224.
- TABATA, H., H. Ikegami und K. Kariya. „Spontaneous age-related peripheral neuropathy in B6C3F1 mice“, *The Journal of Toxicological Science* 25 (2000), 95-104.
- TAYLOR, J. P., J. HARDY und K. H. FISCHBECK. „Toxic proteins in neurodegenerative disease“, *Science* 296 (2002), 1991-1995.

- TSUGU, A., K. SAKAI, P. B. DIRKS, S. JUNG, R. WEKSBERG, Y. L. FEI, S. MONDAL, S. IVANCHUK, C. ACKERLEY, P. A. HAMEL und J. T. RUTKA. „Expression of p57(KIP2) potentially blocks the growth of human astrocytomas and induces cell senescence“, *American Journal of Pathology* 157 (2000), 919-932.
- WALLACE, D. C. „Mitochondrial genetics: a paradigm for ageing and degenerative disease?“, *Science* 256 (1992), 628-632.
- WAGNER, M., B. HAMPEL, E. HUTTER, G. PFISTER, W. KREK, W. ZWERSCHKE und P. JANSEN-DURR. „Metabolic stabilization of p27 in senescent fibroblasts correlates with reduced expression of the F-box protein Skp2“, *Experimental Gerontology* 37 (2001), 41-55.
- YAMAMOTO, A., J. J. LUCA und R. HEN. „Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease“, *Cell* 100 (2000), 57-66.