

Jörg Heinrich Schimpf  
Dr. med.

### **Altern und altersabhängige Veränderungen polyanionischer Strukturen bei der Nematode *Caenorhabditis elegans***

Geboren am 23.01.1963 in Jugenheim  
Reifeprüfung am 26.05.1982 in Seeheim an der Bergstraße  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1985 bis WS 1994  
Physikum am 27.03.1987 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Bruchsal  
Staatexamen am 25.05.1994 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie  
Doktorvater: Professor Dr. med. Klaus Sames

*Caenorhabditis elegans* ist als sehr gutes Modell für Alternsstudien aufgrund seines kurzen Lebens, seiner einfachen Anatomie, seiner begrenzten Anzahl ausschließlich postmitotischer Zellen und seines völlig entschlüsselten zellulären Genoms bekannt. Ergebnisse bezüglich Proteoglykanen sind rar. Weil diese Substanzen im allgemeinen deutlichere altersabhängige Unterschiede aufweisen als andere molekulare Systeme, sind diese Veränderungen auf einem niedrigen evolutionären Niveau bei postmitotischen Zellen ohne Überlagerung intermitotischer Klone für die Gerontologie von außerordentlichem Interesse. Die verwendeten Methoden erlauben es nicht, Proteoglykane mit letzter Sicherheit zu unterscheiden, sind aber sehr gute Screeningmethoden und durchaus in der Lage Glykosaminoglykane aufzufinden. Es gibt jedoch Färbungen, die sich nicht einordnen lassen. Deshalb nennen wir unsere Substrate „Polyanionische Substanzen“.

*Caenorhabditis elegans* wurde auf Agar-Plattchen kultiviert und unter monoxenischen Bedingungen mit *E. coli*-Bakterien ernährt. Die Kulturen wurden durch Freisetzung der Eier gestartet, die Würmer mittels einer temperatursensitiven Mutante (DH 26) alterssynchron aufgezüchtet und nach 60 Stunden (jung), 144 Stunden (mittel) und 228 Stunden (alt) abgeerntet. Die Würmer wurden in einer modifizierten Fixationslösung nach Ito für die Elektronenmikroskopie fixiert. Bevor sie mit der CEC-Methode mit verschiedenen  $MgCl_2$ -Konzentration in Cuprolinic-Blue gefärbt wurden, wurden sie in der Körpermitte mittels einer Glaskörperschere quer durchtrennt. Aus jeder Altersgruppe wurde ein Teil der Tiere in Chondroitinase AC, Chondroitinase ABC, Hyaluronidase und Heparitinase inkubiert und schließlich eine Kontrollgruppe, ohne die vorhergehende Behandlung, mit Osmiumtetroxyd kontrastiert. Eingebettet wurden die Präparate in Epon 812. Die Ultradünnschnitte wurden zunächst ohne zusätzlichen Kontrast analysiert, ein Teil davon mittels Bleicitrat nachkontrastiert und nochmals analysiert.

Die am konstantesten gefärbten Strukturen zeigen sich in der Kutikula, im Bürstensaum des Intestinums und den Gonaden. Aufgrund der vorliegenden Befunde ist davon auszugehen, daß bei *Caenorhabditis elegans* Glykosaminoglykane bzw. Proteoglykane vorkommen.

Im einzelnen konnten Chondroitinsulfate in der externen Epikutikula, Chondroitinsulfate und Dermatansulfat in der Mesokutikula und den Mikrovilli der Intestinalzellen und Heparansulfat im „terminal web“ nachgewiesen werden. Nicht definitiv charakterisierbare Glykosaminoglykane mit hochspezifischer polyanionischer Anfärbbarkeit stellen sich in den Eizellen dar. Die Wirkung der Chondroitinasen in der externen Epikutikula nimmt mit zu-

nehmendem Alter ab, in der Mesokutikula zu. Die altersabhängigen Unterschiede sind möglicherweise durch eine veränderte Eluierbarkeit erklärbar, wobei in der Epikutikula die ältere, in der Mesokutikula eher die jüngere Matrix leichter eluierbar ist. Im „terminal web“ ist Heparansulfat altersabhängig vermindert. In der Mesokutikula zeigen sich altersabhängig destruktive Veränderungen, die wahrscheinlich Glykosaminoglykane einbeziehen. Das Ausmaß der Destruktion von Zellen intermitotischer Zellklone nimmt mit zunehmendem Alter zu. Die Gonadenzellen als einziger intermitotischer Zellklon ist einem signifikant geringeren Destruktionsprozess ausgesetzt.

Die in der Literatur beschriebenen Sitze von Polyanionen werden bestätigt. Die Ergebnisse bei Anwendung der CEC-Methode weisen auf das Vorkommen von Glykosaminoglykanen hin, was durch spezifische Glykosidasen erhärtet wird. Ob die Glykosaminoglykane in Proteoglykanen vorliegen, ist mit den hier verwendeten Methoden nicht überprüfbar. Die altersabhängigen Befunde im „terminal web“ können auf eine altersabhängige strukturelle Veränderung von Heparansulfat mit Resistenz gegen Heparitinase zurückzuführen sein. Bei dem in den Gonaden vorkommenden Polyanion, welches ebenso wie die Substanz im Bürstensaum alter Intestinalzellen auf keines der Enzyme reagiert, könnte es sich um das nach der Literatur bei Protostomata nicht vorkommende Keratansulfat handeln. Besonders interessant sind die altersabhängigen Veränderungen der Glykosaminoglykane der Darmepithelzellen, da beim Menschen der schnelle Ersatz der Zellen solche Beobachtungen verhindert. Alternde postmitotische Zellverbände sind offensichtlich in der Lage sehr lange eine hohe Konstanz der Lokalisation und Mengenverhältnisse von Glykosaminoglykanen zu erhalten. Strukturveränderungen im Sinne einer im Alter sich beschleunigenden Destruktion von Zellorganellen und Veränderung des Zytoplasmas sind zu beobachten aber nicht mit Veränderungen der polyanionischen Strukturen in Verbindung zu bringen. Ein interessanter Nebenfund sind Hinweise auf stark hydratisierte Glykosaminoglykane vom Chondroitinsulfat-Dermatansulfat-Typ, die der Mesokutikula prall elastische Eigenschaften (Formstabilität bei hoher Beweglichkeit) verleihen könnten.