Aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz

Untersuchungen zu den molekularen und protektiven Wirkungen von Catechin und seinen Derivaten in *Caenorhabditis elegans*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Stephan Hendrik Tanner
2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: PD Dr. rer. nat. Andreas Kampkötter

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Bartholome, A., Kampkötter, A., Tanner, S., Sies, H., Klotz, LO. (2010) Epigallocatechin gallate-induced modulation of FoxO signaling in mammalian cells and *C. elegans*: FoxO stimulation is masked via PI3K/Akt activation by hydrogen peroxide formed in cell culture. *ABB* 501, 58–64

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 4

1.1 Flavonoide……....4

1.1.1 Stoffklasse der Flavanole……..….4

1.1.2 Vorkommen und Aufnahme von Flavonoiden……...6

1.1.3 Untersuchungen zu den Wirkungen von Catechinen im Menschen……..7

1.2 Oxidativer Stress und Alterung……..9

1.2.1 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies…….9

1.2.2 Zelluläre Schädigung durch ROS……11

1.2.3 Zelluläre Schutzmechanismen……12

1.3 *Caenorhabditis elegans*……...15

1.3.1 *C.elegans* als Modellorganismus……15

1.3.2 Insulin/IGF-1 ähnliche Signalweg in *C.elegans*……..18

1.3.3 Bekannte Wirkungen von Flavonoiden in *C.elegans*……...20

1.4 Zielsetzung……..23

2 Material und Methoden 25

2.1 Abkürzungen…….……..……25

2.2 Material…….…26

2.2.1 Bakterienstämme…….……26

2.2.2 *C. elegans* Stämme……..……26

2.2.3 Medien…….27

2.2.3.1 Medien zur Kultivierung von Bakterienstämmen…….27

2.2.3.2 Medien zur Kultivierung von *C. elegans*……..27

2.2.4 Chemikalien…….28

2.2.5 Lösungen und Puffer……29

2.2.6 Sonstige Materialien……31

2.2.7 Geräte……...31

2.2.8 Computerprogramme……...31

2.3 Methoden……32

2.3.1 Bakterienkultivierung……...32

2.3.1.1 *E. coli* OP50 Kultivierung…….32
2.3.1.2 *E. coli* OP50-1 Kultivierung…….32
2.3.1.3 *E. coli* HT115 Kultivierung……..32
2.3.1.4 Bestimmung der Dichte einer Bakterienkultur…….33
2.3.2 Kultivierung von *C. elegans*……33
2.3.2.1 Festmedium……...33
2.3.2.2 Flüssigmedium……..33
2.3.2.3 Semisynchronisation von *C. elegans*……34
2.3.3 Flavonoid-Inkubation……...35
2.3.4 Lebensspanneuntersuchungen unter normalen Bedingungen……..35
2.3.5 Oxidativer Stress……..36
2.3.6 Thermaler Stress……..36
2.3.6.1 Manuelle Untersuchung der Thermoresistenz……..36
2.3.6.2 Sytox-Green-Assay……...37
2.3.7 Messung der intrazellulären ROS-Akkumulation in *C. elegans*…….….39
2.3.8 Untersuchungen zur Lipofuszin-Akkumulation……...40
2.3.9 DAF-16 Lokalisation……...41
2.3.10 Expression der SOD-3 ……..42
2.3.11 SKN-1 Lokalisation unter oxidativem Stress…….43
2.3.12 Expression der GST-4……43
2.3.13 Lebensspanneuntersuchungen unter RNAi-Behandlung……...44
2.3.14 Fluoreszenzmikroskopie von *C. elegans*……...45
2.3.15 Densitometrische Auswertung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen…….46

3 Ergebnisse 47

3.1 Untersuchungen von Catechin und seinen Derivaten auf Parameter der Stressresistenz von *C. elegans*…….47

3.1.1 Oxidativer Stress……..47
3.1.2 Thermaler Stress……..48
3.1.3 Akkumulation radikaler Sauerstoffspezies……..51
3.1.4 Akkumulation von Lipofuszin…….52

3.2 Einfluss von Catechin und seinen Derivaten auf die subzelluläre Lokalisation von Transkriptionsfaktoren……..54

3.2.1 DAF-16 Lokalisation…….....54
3.2.1 SKN-1 Lokalisation unter oxidativem Stress……..56

3.3 Einfluss von Catechin und seinen Derivaten auf die Expression von Zielgenen…….58

3.3.1 SOD- 3 Expression……...58

3.3.2 GST- 4 Expression……...59

3.4 Untersuchungen zur Lebenspanne……...63

3.4.1 Lebensspanneuntersuchungen unter normalen Bedingungen……..63

3.4.2 Lebensspanneuntersuchungen unter leer-RNAi Bedingungen……65

3.4.3 Lebensspanneuntersuchungen unter DAF-16-RNAi Bedingungen…….68

3.4.4 Lebensspanneuntersuchungen unter SKN-1-RNAi Bedingungen……...70

4 Diskussion 69

4.1 Beschreibende protektive Eigenschaften von Catechin und seinen Derivaten in *C. elegans*……..72

4.1.1 Thermaler und oxidativer Stress……..72

4.1.2 Lebensverlängerung……76

4.2 Wirkungen von Catechin und seinen Derivaten auf molekularer Ebenene……...77

4.2.1 Lipofuszinakkumulation und ROS Akkumulation……..78

4.2.2 Beeinflussung von Transkriptionfaktoren und deren Zielgenen……..79

5. Zusammenfassung 85

6. Literatur 87

7. Danksagung 94

8. Eidestattliche Versicherung 95

1 Einleitung

1.1 Flavonoide

Catechin und seine Derivate gehören zu der Gruppe der Flavonoide. Dies sind polyphenolische Substanzen, die in nahezu allen pflanzlichen Nahrungsstoffen vorhanden sind. Sie gehören zu den sekundären Nahrungsstoffen, d.h. sie übernehmen keine nutritiven Funktionen. Pflanzen synthetisieren Flavonoide, v. a. zur Abwehr von Fressfeinden (Bitterstoffe) und zum Schutz gegen die UV-Strahlung des Sonnenlichts (Farbstoffe). Werden diese Substanzen vom Menschen mit der Nahrung aufgenommen, können Flavonoide metabolische Prozesse beeinflussen und somit einen Einfluss auf die Gesundheit haben. Daher besteht großes Interesse daran, die genauen Wirkmechanismen dieser Substanzen zu identifizieren, um diese gezielt im medizinischen Sinn einsetzen zu können.

1.1.1 Stoffklasse der Flavanole

Flavonoide sind die in der Nahrung am häufigsten vorkommenden Polyphenole. Strukturelle Gemeinsamkeit der Flavonoide ist das Flavangerüst, welches aus zwei aromatischen (A, B) und einem O-heterozyklischen Ring (C) besteht (s. Abb. 1.1). Es sind über 6500 verschiedene Flavonoide bekannt. Die Vielfalt lässt sich aus Modifizierungen am Grundgerüst in Form von Hydroxylierungen, Methylierungen und vor allem Glykosylierungen erklären. Die grobe Einteilung in Subgruppen erfolgt anhand ihrer strukturellen Unterschiede am Ring C. So ist die einfache Hydroxylierung an Position 3 charakteristisch für die Subgruppe der Flavanole, zu

denen Catechin und seine Derivate gehören. Fünf weitere Subgruppen werden zu den Flavonoiden gezählt. Das Flavonoid Quercetin gehört beispielsweise mit seiner zusätzlichen Doppelbindung zum Sauerstoff an Position 4 zur Subgruppe der Flavonole (s. Tab. 1.1).

Das (+)-Catechin weist neben der klassifizierenden Hydroxylgruppe an Position 3 weitere Hydroxylierungen an Position 5, 7, 3´ und 4´ auf. Die Derivate des Catechins unterscheiden sich durch eine abweichende Stereochemie bzgl. der räumlichen Anordnung des B-Rings zum AC-Ringsystem ((-)-Epicatechin), durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe an Position 5´ des B-Rings ((-)-Epigallocatechin) und einen an Position 3 angelagerten Gallat-Rest ((-)-Epicatechingallat und (-)-Epigallocatechingallat, s. Abb. 1.1).

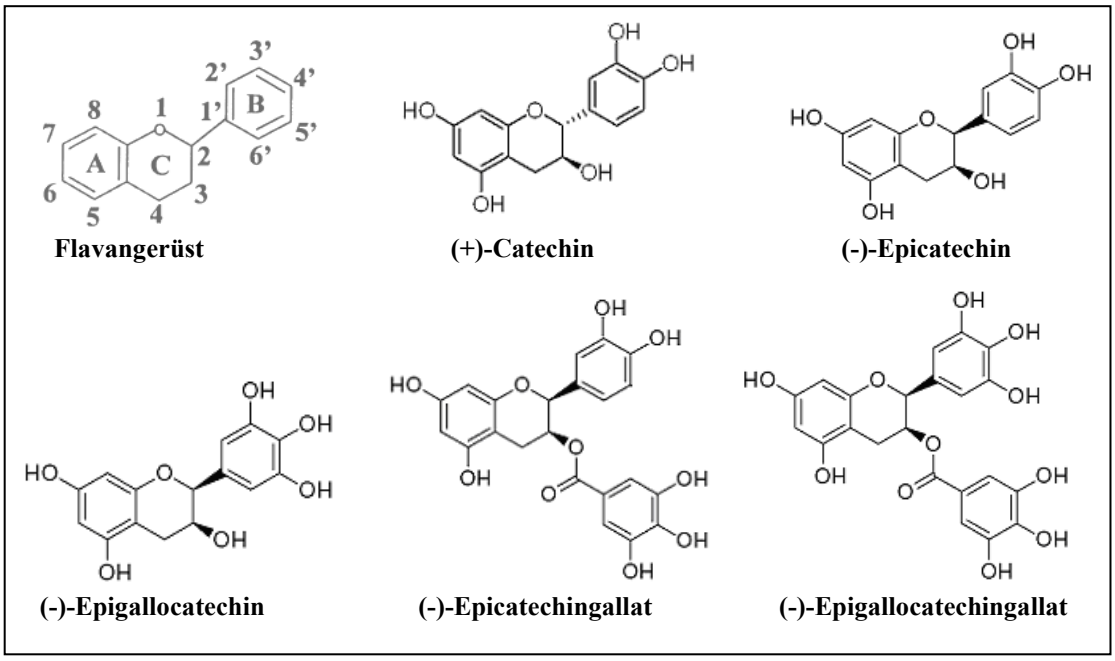


Abb. 1.1: Das Flavangerüst und in der Arbeit verwendete Catechinderivate (Heim et al., 2002)

Aufgrund der chemischen Struktur können Catechin und seine Derivate antioxidativ wirken (Rice-Evans et al., 1996). Dies wird durch die Verfügbarkeit der Hydroxylgruppen als Protonendonatoren erklärt. Dabei spielt die Anordnung sowie die Anzahl der Hydroxylgruppen eine wichtige Rolle. Nach Guo et al. (1999) weisen gallolylierte Catechinderivate eine höhere antioxidative Kapazität auf als nicht-gallolylierte Derivate, und Stoffe mit Gallat-Rest höhere als ohne Gallat-Rest. Analog dazu konnte diese Arbeitsgruppe für EGCG die höchste antioxidative Aktivität *in vitro* ermitteln.

1.1.2 Vorkommen und Aufnahme von Flavonoiden

Täglich werden Flavonoide mit der pflanzlichen Nahrung aufgenommen. Dabei enthalten bestimmte Pflanzen einen besonders hohen Anteil an einzelnen Subgruppen von Flavonoiden (s. Tab. 1.1).

Verbindung	**Beispiele**	**Vorkommen**
Flavanole	Epigallocatechin, Catechin	Grüner Tee, Rotwein
Flavonole	Myricetin, Quercetin	Rotwein, Zwiebeln
Flavanone	Naringenin, Hesperidin	Grapefruit, Orange
Flavone	Luteolin, Apigenin	Sellerie
Anthocyane	Malvidin, Cyanidin	Blaue Trauben, Kirschen
Isoflavonoide	Genistein, Daidzein	Sojabohnen

Tab. 1.1: Vorkommen von Flavonoiden in Nahrungsmittel unterteilt nach Subgruppen (Watzl & Rechkemmer, 2001)

Hauptvorkommensquelle der Catechine ist der Grüne Tee. 36 % des Trockengewichts der Teepflanze *Camilla sinensis* sind Polyphenole, wovon bis zu 30 % Catechine ausmachen. Dabei ist der Anteil an EGCG am höchsten (7-13 %), gefolgt von ECG und EGC (je 3-6 %) (Graham, 1992). Diese Polyphenole bleiben bei der industriellen Herstellung des Grünen Tees erhalten, da dieser im Gegensatz zum Schwarzen Tee nicht fermentiert, sondern gerade vor Oxidation geschützt wird. Catechinderivate sind daher besonders in Grünem Tee enthalten und können vom menschlichen Organismus aufgenommen werden. Im fertig zubereiteten Tee können Catechine 30 - 42 % der festen Bestandteile des Getränks ausmachen (Graham, 1992). Eine Tasse Grünen Tees kann somit etwa 100 – 200 mg EGCG enthalten (Zaveri, 2006). Catechin und Epicatechin finden sich ebenfalls vermehrt in dunkler Schokolade, wo Mengen von etwa 450 mg/kg Gesamtcatechin nachweisbar sind (Arts et al., 2000). Weitere Nahrungsmittel mit hohem Anteil an Catechinen sind rote Trauben, Rotwein oder Äpfel.

Die aufgenommene Menge an Flavonoiden variiert in Abhängigkeit von Ernährungsgewohnheiten. Bevölkerungen in Länder mit hohem Konsum von beispielsweise Sojabohnen und Tee, wie in Japan oder Holland, haben daher eine höhere totale Flavonoidaufnahme. Für ausgesuchte Flavonoide wurde in verschiedenen Ländern eine tägliche Aufnahmemenge von 20 – 73 mg Flavonoid

ermittelt (Beecher, 2003). Andere Studien zeigen, dass bei einer ausgewogenen Ernährung reich an Gemüse und Obst die Aufnahme an Polyphenolen um 1 g betragen kann (Scalbert & Williamson, 2000).

Viele Studien stellen eine geringe Bioverfügbarkeit und einen hohen Metabolismus der Flavonoide fest. So konnte gezeigt werden, dass die Spitzenplasmakonzentration von EGCG nach Applikation von Mengen äquivalent zu bis zu neun Tassen Grünen Tee unter 1 µM lag (Tachibana, 2011). 1,5-2,5 h nach Teekonsum wurden die höchsten Flavonoidkonzentrationen festgestellt und nach 24 h wurde kein Catechin mehr detektiert (Lee et al., 1995). Zusätzlich konnte für Flavanole gezeigt werden, dass nur 1-2 % der oral aufgenommenen Mengen mit intakter Grundstruktur ausgeschieden werden (Watzl & Rechkemmer, 2001).

1.1.3 Untersuchungen zu den Wirkungen von Catechinen im Menschen

Verschiedene Studien stellen einen Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Flavonoiden und gesundheitsfördernden Effekten auf. So wird der hohe Konsum von Obst und Gemüse im Rahmen einer mediterranen Kost als gesund dargestellt. Evidenz hierfür gibt die epidemiologische Studie von Renaud & de Lorgeril (1992), die zeigen konnte, dass die Bevölkerung im Süden Frankreichs trotz fettreicher Ernährung und einem hohen Anteil an Rauchern eine geringe Inzidenz für koronare Herzerkrankungen aufweist. Der hohe Verzehr von Rotwein, Olivenöl, frischem Obst und Gemüse wird für dieses Phänomen verantwortlich gemacht (Zern & Ferndandez, 2005). Ebenfalls konnten Hertog et al. (1997) eine inverse Korrelation zwischen dem Auftreten von ischämischen Herzerkrankungen und der Aufnahme von Flavonoiden feststellen.

Die Wirkungen von Catechin und seinen Derivaten im Menschen wurden besonders in Studien bezüglich des Konsums von Grünem Tee untersucht, da dieser zu einem großen Anteil Catechinderivate enthält (s. Kapitel 1.1.2). So konnten einige epidemiologische Studien gesundheitsförderliche Effekte von Grünem Tee bei Krebserkrankungen, kardiovaskulären und neurologischen Erkrankungen aufzeigen (Zaveri, 2006). In der sog. Ohsaki Studie wurden über 40.000 Probanden in Japan über einem Zeitraum von bis zu 11 Jahren auf Gesamtmortalität untersucht. Dabei zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen dem Konsum von Grünem Tee und der

Gesamtmortalität (Kuriyama et al., 2006). Zusätzlich stellte diese Studie eine signifikante Abnahme der Todesfälle aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen fest, währenddessen die Sterberate aufgrund von Krebserkrankungen nicht durch Grünen Tee beeinflusst wurde. Auch Sano et al. (2004) machen den Konsum von Grünem Tee für die niedrigere Inzidenz von koronarer Herzkrankheit bei der japanischen Bevölkerung verantwortlich.

Grüner Tee kann gegen Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Zellschäden, hervorgerufen durch Ischämie, schützen (Mandel & Youdim, 2004). Epidemiologische Studien zur Prävalenz von Morbus Parkison und Konsum von Grünem Tee zeigen eine fünf bis zehnfach niedrigere Inzidenz dieser Krankheit in asiatischen Ländern (Pan et al., 2003). Dafür werden vor allem die antioxidativen und metallchelatorischen Eigenschaften von Catechinderivaten verantwortlich gemacht, da andere Substanzen mit diesen Eigenschaften ebenfalls vor Morbus Parkinson schützen (Zheng et al., 2005) und oxidativer Stress eine der wichtigsten Ursachen in der Pathogenese des Morbus Parkinson darstellt.

Epidemiologische Studien zeigen, dass Grüner Tee auch gegen Haut-, Brust-, Prostata- und Lungenkrebs schützen kann (Yang et al., 2002) und ebenso die Angiogenese in Tumoren hemmt (Cao & Cao, 1999).

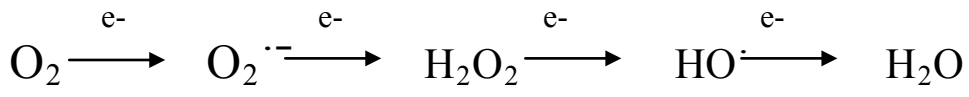
So wie auch die gesundheitsförderlichen Wirkungen variieren, werden sehr viele unterschiedliche Ansatzpunkte im Wirkungsmechanismus von Catechinen diskutiert. Besonders die antioxidative Aktivität von Catechin und seinen Derivaten wird meist in den Vordergrund gestellt. Auch bei den Krankheiten, bei denen Catechin und seine Derivate protektive Wirkungen zeigen, spielt die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, s. Kapitel 1.2) eine wichtige Rolle. Zusätzlich stellte man fest, dass Catechine nicht nur antioxidative Aktivität besitzen, sondern ebenfalls viele Signalwege beeinflussen können (Saul et al., 2009; Abbas & Wink 2010).

1.2 Oxidativer Stress und Alterung

Der Begriff *„Oxidativer Stress“* beschreibt ein Ungleichgewicht zwischen der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und physiologischen Abbaumechanismen, welches in einer erhöhten oxidativen Schädigung von zellulären Makromolekülen münden kann. Die *„free radical theory of aging“* (Harman, 1956) beschreibt einen kausalen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und dem Prozess des Alterns sowie der Entstehung zahlreicher degenerativer Krankheiten. Daher besteht großes Interesse, Substanzen zu identifizieren, die die Redox-Homöostase im lebenden Organismus positiv beeinflussen können, um diese gezielt in Hinsicht auf medizinische und pharmakologische Interventionen einzusetzen.

1.2.1 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

ROS sind äußerst reaktionsfreudige Metabolite von molekularem Sauerstoff. Zu ihnen zählen Radikale wie das Hydroxylradikal oder das Superoxidradikalanion und Wasserstoffperoxid, die bei der abgestuften Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser entstehen (Abb. 1.2). Reagieren ROS mit anderen Molekülen, können sich neue Radikale wie das Alkoxyl- oder Peroxylradikal bilden (Sies, 1993). Während das Peroxylradikal verhältnismäßig stabil ist, besitzt das Hydroxylradikal eine sehr kurze Halbwertszeit, was seine hohe Reaktivität anzeigt.



Reaktive Sauerstoffspezies		Halbwertzeit in s
$\mathbf{O_2^{\cdot -}}$	Superoxidradikalanion	- (enzymatisch)
$\mathbf{H_2O_2}$	Wasserstoffperoxid	- (enzymatisch)
$\mathbf{HO^{\cdot}}$	Hydroxylradikal	10^{-9}
$\mathbf{RO^{\cdot}}$	Alkoxylradikal	10^{-6}
$\mathbf{ROO^{\cdot}}$	Peroxylradikal	7

Abb. 1.2: Schrittweise Reduktion von Sauerstoff zu Wasser und ausgewählte ROS und Halbwertzeiten (Ames, 1993; Sies, 1993)

In allen aeroben Organismen entstehen ROS endogen als Nebenprodukt des Metabolismus (Halliwell & Gutteridge, 1984; Beckmann & Ames, 1998). Vor allem bei der ATP-Gewinnung über die oxidative Phosphorylierung, die in den Mitochondrien stattfindet, bilden sich ROS. Etwa 90 % der zellulären ROS entstehen bei diesem Prozess (Balaban, 2005). Die Komplexe der Atmungskette bauen, durch Elektronen getrieben, einen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran auf, der der ATP-Synthase als Antrieb dient. ROS entstehen v.a. an Komplex I und III aus dem Ubichinon-Kreislauf, der besonders unter Hitzestress (Flagnagan et al., 1998) keine 100 %-ige Effizienz aufweist.

Auch in den Peroxisomen können ROS endogen als Nebenprodukte der ß-Oxidation entstehen (Reddy & Rao, 1989). Des Weiteren können Enzyme der Cytochrom P450-Klasse während der Metabolisierung von endogenen oder exogenen Verbindungen ROS generieren (Gottlieb, 2003). Im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr werden reaktive Sauerstoffspezies von Phagozyten gezielt mit Hilfe der NADPH-Oxidase produziert, um Pathogene zu schädigen (Babior, 1984).

ROS haben weiterhin eine bedeutende Rolle als Botenstoff bei Signaltransduktionsprozessen: sie können den Aktivitätsstatus redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren beeinflussen (Dröge, 2002) und Phosphorylierungsreaktionen stimulieren oder hemmen (Heffetz et al., 1992). Durch den Einfluss von Antioxidantien können die Funktionen von ROS als Effektor der Signalübertragung beeinflusst und so indirekt auch Signaltransduktionskaskaden verändert werden.

Experimentell kann ein erhöhtes Maß an oxidativem Stress exogen durch Strahlung, Hitze oder Chemikalien erzeugt werden (Ames et al., 1998). In dieser Arbeit wurde dazu die Substanz Juglone (5-Hydroxy-1,4-naphtochinon), die in der Schale der Walnuss (Juglans nigra) enthalten ist, verwendet. Juglone induziert intrazellulär oxidativen Stress durch seine enzymatisch katalysierte Reduktion zu einem Semichinonradikal. Dieses Radikal reduziert Sauerstoff unter Regeneration des Chinons zum Superoxidanionradikal (O´Brien, 1991). Die ständige Wiederholung dieser Reaktion führt zu einem zytotoxischen hohen Level von Wasserstoffperoxid.

1.2.2 Zelluläre Schädigung durch ROS

ROS schädigen in der Zelle Lipide, Nukleinsäuren und Proteine und können dadurch zur Entstehung von Krankheiten und zur Zellalterung führen. Besonders die Lipide in Membranen von Zellen oder Zellorganellen stellen einen wichtigen Angriffspunkt für ROS dar. Bei der Reaktion einer mehrfach ungesättigten Fettsäure mit einem Hydroxylradikal kann es unter der Bildung des reaktiven Fettsäure-Peroxylradikals zur Auslösung einer Kettenreaktion kommen, in der dieses Radikal mit weiteren Fettsäuren oder anderen Makromolekülen reagiert, was zum Verlust der Membranintegrität und/oder -permeabilität und somit zum Zelltod führen kann (Girotti, 1998). Die Lipidperoxidation ist eine postulierte Grundlage der Pathogenese verschiedener Herzkreislauferkrankungen. Eine wichtige Rolle spielen ROS bei der Entstehung der Arteriosklerose, sowohl in der initialen Phase bei der Oxidation der Lipoproteine niedriger Dichte (low-density lipoprotein, LDL) zu minimal oxidierten LDL (MO-LDL) als auch bei der weiteren Oxidation zu hoch oxidierten LDL (HO-LDL) in der inflammatorischen Phase und damit bei der Schaumzellbildung. Zusätzlich können Superoxidanionradikale den endothelialen Vasodilatator NO inaktivieren und somit auf einem zweiten Weg zum pathogenen Umbau der Gefäße beitragen (Baretton et al., 2004).

Bei der Schädigung von Proteinen durch ROS kommt es vor allem zur Oxidation von Sulfhydroxygruppen, zur Peptidfragmentierung und zur Veränderung der Proteinfaltung. Neurodegenerative Krankheiten wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer sind mit dieser Schädigung assoziiert (Choi, 2005). Veränderte Proteine können aber auch mit anderen oxidativ geschädigten zellulären Bestandteilen unlösliche Aggregate bilden. Solch ein Aggregat ist das Alterspigment Lipofuszin, welches speziesübergreifend als Alterungsmarker eingesetzt werden kann (Klass et al., 1977). Auf zellulärer Ebene akkumuliert dieses Pigment in Lysosomen postmitotischer Zellen als gelb-bräunliches Aggregat. Es wird als die stabilste und phylogenetisch konstanteste morphologische Änderung des Alterns angesehen (Porta, 2002).

Durch die Reaktion mit Nukleinsäuren können ROS die Basen der Nukleotide oxidieren, wodurch falsche Basenpaarungen, Einzel- oder Doppelstrangbrüche sowie Vernetzungen mit anderen Molekülen ausgelöst werden können. Dies ist ein Mechanismus für die Entstehung von Mutationen, wodurch ROS zu den

Kanzerogenen gezählt werden müssen (Beckmann & Ames, 1998). Besonders anfällig für die Oxidation durch ROS ist die mitochondriale DNA aufgrund der räumlichen Nähe zur Atmungskette sowie schwächer ausgebildeten Schutz- und Reparatursysteme. Hier auftretende Schädigungen verringern die Effizienz der Elektronenübertragung und ATP-Gewinnung, was wiederum zu einem erhöhten ROS-Niveau führt. Dieser Kreislauf wird als einer der Hauptgründe für die Zellalterung diskutiert (Harman, 1956; Balaban et al., 2005; Ott et al., 2007).

1.2.3 Zelluläre Schutzmechanismen

Es existieren verschiedene Schutzmechanismen, um zelluläre Schäden durch ROS zu verhindern: die Prävention der zellulären Bildung von ROS, das Abfangen entstandener ROS in den Zellen und die Entgiftung von reaktiven Reaktionsprodukten. Metallchelatoren nehmen in der ROS-Prävention eine wichtige Rolle ein, da sie freie Metalle binden können, die über die sog. *Fenton-Reaktion* zur Bildung von ROS führen können. Moleküle wie Ferritin, Transferrin und Coeruloplasmin sind Beispiele für Proteine mit solcher Funktion. Sie sind damit Haupteffektoren, um Lipidperoxidation und DNA-Brüche zu vermeiden (Sies, 1993). Die zentrale Abwehr von ROS ergibt sich aus Mitteln, bereits gebildete ROS in weniger reaktionsfreudige Verbindungen umzuwandeln. Diese Abfangmechanismen können enzymatisch oder durch endogene oder exogene Antioxidantien geschehen. Als drei Hauptenzyme in der Beseitigung oxidativer Belastung sind die Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase zu nennen (s. Abb.1.3).

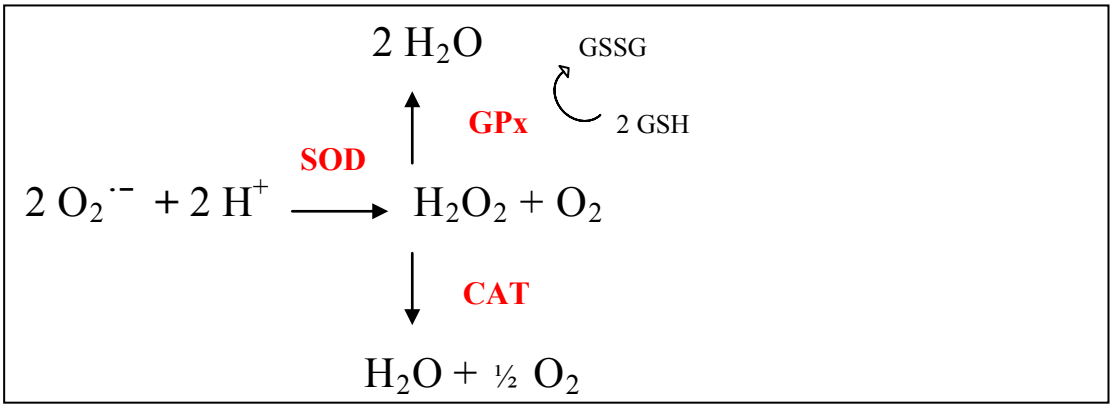


Abb. 1.3 Katalysierte Reaktionen der Abwehr oxidativer Belastung.
SOD=Superoxiddismutase; CAT=Katalase; GPx=Glutathion-Peroxidase; GSH=Glutahion; GSSG= Glutathiondisulfid (Schartl, 2009)

Die SOD katalysiert die Disproportionierung vom Superoxidanionradikal zum Wasserstoffperoxid. Im Säuger existieren drei Formen der SOD, die sich durch die Lokalisation und den Aufbau unterscheiden: Die mitochondriale manganhaltige SOD und zwei Kupfer/Zink-SOD, die cytosolisch und extrazelluär vorkommen. Die in dieser Arbeit im Modellorganismus *C. elegans* untersuchte SOD-3 entspricht der manganhaltigen SOD im Säuger. Es konnte gezeigt werden, dass die SOD wichtige lebenserhaltende Funktionen besitzt, da ein Ausschalten dieses Enzyms in *knock-out*-Mäusen eine verkürzte Lebensspanne zur Folge hat (Reaume et al., 1996). Die SOD-3 wird unter anderem über den Insulin/IGF-1 (*insulin like growth factor-I*) -ähnlichen Signalweg reguliert (s. Kapitel 1.3.2). Mutationen, die zu einer Abschwächung der Effektoren in diesem Signalweg führen, können die Lebensspanne von *C. elegans* verlängern, was zum Teil durch die dadurch bedingte erhöhte SOD-Aktivität erklärt wird (Honda & Honda, 1999). Diese Vermutung wird auch durch die Lebensverlängerung von *C. elegans* durch die Gabe von synthetischen SOD/CAT Mimetika unterstützt (Melov et al., 2000).

Ein Weg, das ebenfalls toxische Wasserstoffperoxid abzubauen, bietet die Katalase, welche es in einer Disproportionierungsreaktion zu Wasser und Sauerstoff abbaut. Die Katalase kommt vor allem in den Peroxisomen vor, wo sie bis zu 40 % des peroxisomalen Proteins ausmachen kann. Außerdem kann H_2O_2 von zwei Glutathation-Molekülen (GSH) abgefangen werden, welche zu Glutathiondisulfid (GSSG) reagieren. Diese Reaktion wird durch die Glutathionperoxidase katalysiert und spielt besonders in den Erythrozyten eine wichtige Rolle, um H_2O_2 abzubauen. GSSG kann durch die Glutathionreduktase $NADPH/H^+$ -abhängig wieder zu zwei GSH-Molekülen reduziert werden.

Ebenso wie das GSH spontan als Radikalfänger wirken kann, gibt es viele andere endogene Stoffwechselprodukte wie Bilirubin, Cystein oder Harnsäure, die die Funktion als Radikalfänger übernehmen können. Neben endogenen Quellen spielt die nahrungsabhängige Aufnahme exogener Radikalfänger eine wichtige Rolle. So ist Vitamin C (Ascorbinsäure) ein hydrophiler und Vitamin E (Tocopherol) ein lipophiler Vertreter dieser Gruppe. Neben Vitaminen gibt es noch zahlreiche weitere Nahrungsinhaltsstoffe, die als Radikalfänger wirken können. Für Catechin und seine Derivate konnte sogar eine höhere Radikalfänger-Aktivität als für Vitamin C und E gezeigt werden (Rice-Evans et al., 1996).

Oxidative Reaktionsprodukte wie ungesättigte Aldehyde, Chinone, Epoxide und Hydroperoxide können als Folge nicht ausreichender Abwehr von ROS entstehen oder aber exogen als Xenobiotika aufgenommen werden. Solche Moleküle können wiederum zur ROS-Entstehung beitragen, da sie elektrophil und häufig toxisch sind. Zum Abbau dieser Substanzen stellen Enzyme der Phase II einen wichtigen Schutzmechanismus dar (Bock et al., 1987). Neben vielen anderen spielen bei diesem Prozess die Glutathion S-Transferasen (GST) eine wichtige Rolle, indem sie die Konjugation von GSH an verschiedene oxidative Reaktionsprodukte katalysieren (Pickett & Lu, 1989). Sie werden durch eine katalysierte Thioesterbildung in hydrophile Substanzen umgewandelt, wodurch sie dem weiteren Zellmetabolismus zugeführt oder durch ATP-abhängige Transporter aus der Zelle herausgeschleust werden können (Hayes et al., 2005). Auch die bereits oben erwähnte Glutathionperoxidase kann oxidative Reaktionsprodukte umsetzen.

1.3 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabitis elegans gehört zum Stamm der Fadenwürmer (Nematoda), die mit 20.000 Arten zu den größten Stämmen vielzelliger Tiere zählen. Fadenwürmer kommen in nahezu jedem Lebensraum (Boden, Salz- oder Süßwasser) vor. Viele Arten leben als Parasit von Pflanzen oder Tieren einschließlich Menschen. Im Gegensatz zu anderen Vertretern dieses Stammes wie z.B. *Ascaris lumbricoides* (Spulwurm) oder *Wuchereria bancrofti* (Mikrofilaria) lebt *C. elegans* nicht parasitär und ist nicht humanpathogen. Durch die Arbeiten von Sydney Brenner wurde er ab den sechziger Jahren zu einem weltweit stark verbreiteten Modellorganismus.

1.3.1 *C. elegans* als Modellorganismus

In dieser Arbeit wurde *C. elegans* als Modellorganismus benutzt, um die Wirkungen von Catechin und seinen Derivaten *in vivo* zu untersuchen. Dieser Organismus weist hierfür viele Vorteile auf. Er kann auf speziellem Fest- oder in Flüssigmedium kultiviert werden. Bei der Behandlung mit Catechinen wurde das Flüssigmedium verwendet, da die Catechine in dem NGM (*nermatode growth medium*) löslich sind, so dass der Wurm einer definierten Konzentration der Testsubstanz vollständig exponiert wurde. *E. coli* Bakterien wurden als Nahrung in das Flüssigmedium hinzugegeben, sodass der Wurm auch bei der Nahrungsaufnahme die jeweilige Testsubstanz oral aufnahm.

C. elegans eignet sich aufgrund seiner im Vergleich zu anderen vielzelligen Modellorganismen kurzen Lebensspanne von zwei bis drei Wochen gut zur Überprüfung von protektiven Wirkungen einer Testsubstanz. So kann mit vergleichbar geringem zeitlichem Aufwand der Einfluss einer Substanz auf die Lebensspanne untersucht werden.

Der biologische Aufbau (Abb. 1.4) zeigt einen einfachen auf Reproduktion ausgerichteten Organismus. Die feste Cuticula macht den etwa 1 mm langen runden fadenförmigen Wurm resistenter gegen Austrocknung und andere äußere Schädigungen. Der Pharynx stellt lichtmikroskopisch einen kranialen Orientierungspunkt dar. Er befördert ununterbrochen Bakterien durch die Bulbi in das Darmlumen.

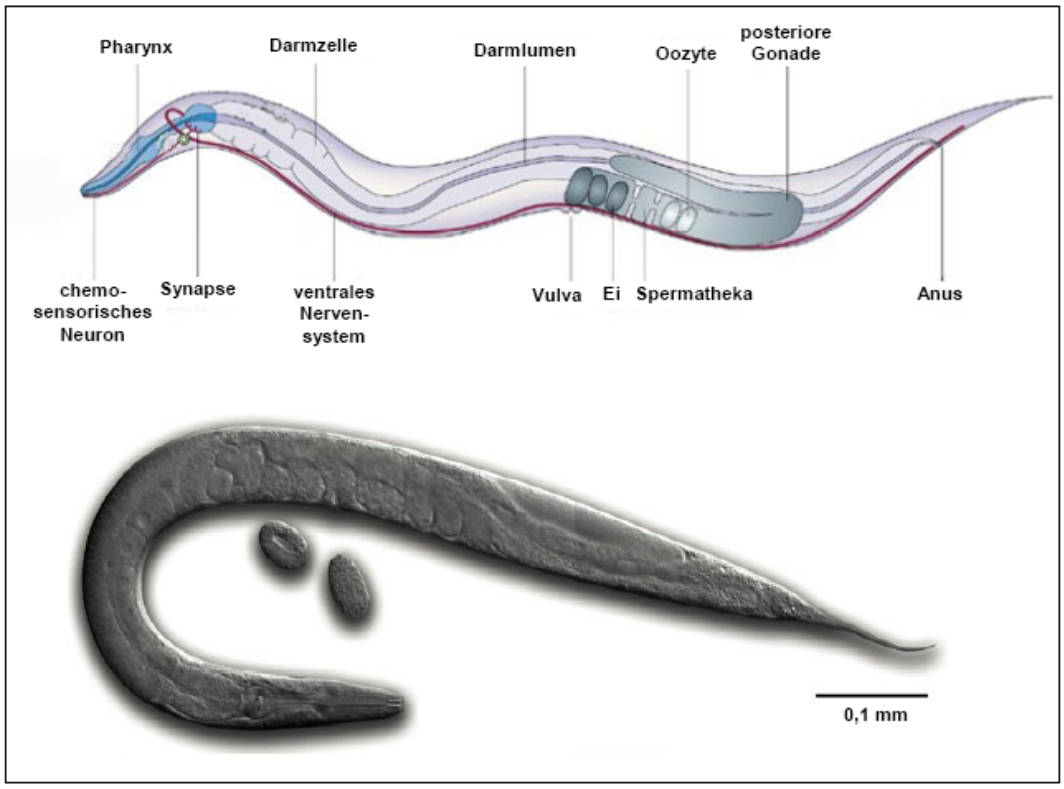


Abb. 1.4: Schematische und lichtmikroskopische Aufnahme von *C. elegans* (modifiziert nach Kaletta & Hengartner, 2006)

Die Entwicklung verläuft vom chitinhaltigen Ei über vier Larvenstadien zu den adulten Nematoden und ist mit vier Häutungen verbunden (Altun & Hall, 2006). Dieser Zyklus dauert bei 20-25°C etwa drei Tage. Dieser kurze Entwicklungszyklus zum adulten Wurm und die hohe Reproduktivität von etwa 300 Nachkommen pro Individuum (Schierenberg, 1986) erlauben ein schnelles Anzüchten von Populationen.
C. elegans eignet sich durch seine Transparenz besonders zur Mikroskopie. Diese Untersuchungstechnik stellt einen wichtigen Grund für die Popularität dieses Organismus dar. So können auch verhaltensbiologische Versuche, wie beispielsweise die Bestimmung der Pumprate des Pharynx, untersucht werden (Brown et al., 2006). Zusätzlich können mit Hilfe der Technik der Mikroinjektion in das Synzytium der Gonade transgene Stämme hergestellt werden. So können Fusionsprodukte mit GFP (grünfluoreszierendes Protein) entstehen, die es möglich machen, eine Proteinexpression fluoreszenzmikroskopisch zu analysieren.
Bei *C. elegans* tritt in der Regel Hermaphroditismus und Autogamie auf. Daher ist es einfach, homozygote Stämme zu gewinnen und beizubehalten. Dies ist gerade bei transgenen Stämmen ein Vorteil. Genetische Rekombinationen können durch Kreuzung von Hermaphroditen mit der männlichen Geschlechtsform, welche mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,05 % auftritt, erreicht werden.

Zusätzlich zum Hermaphroditismus stellt die regelhaft vorkommende Eutilie ein entscheidendes Merkmal dar, welches *C. elegans* als Modellorganismus v. a. für die Genetik prädestiniert. Von der Befruchtung bis zum Schlüpfen des Wurms kann das Schicksal jeder entstehenden Zelle nachverfolgt werden.

C. elegans ist der erste vielzellige Organismus, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Es besteht aus 97 Megabasen, die für etwa 19.000 Gene kodieren, wovon über 60 % Homologien zu humanen Genen aufweisen (Kuwabara & O'Neil, 2001). Dies spricht für eine hohe Konserviertheit vieler biologischer Prozesse zwischen *C. elegans* und Säugern, die auch Rückschlüsse in Bezug auf molekulare und protekive Wirkungen von Testsubstanzen auf den Menschen zulässt. Mit Hilfe der RNA vermittelten Interferenz (RNAi) als Methode der reversen Genetik lassen sich Gene auf ihre Funktionen hin untersuchen. Gerade für homologe Gene ist diese Technik besonders interessant. Auch im Modellorganismus *C. elegans* kommt diese Methode erfolgreich zur Anwendung (Timmons & Fire, 1998). Sie ermöglicht es, anhand einer Gensequenz auf die Ausprägung eines Gens auf Ebene der RNA negativ Einfluss zu nehmen. Die doppelsträngige RNA (dsRNA) wirkt dabei als Effektormolekül der RNAi (Fire et al., 1998). Es gibt Datenbänke wie die „wormbase“ (www.wormbase.com), wo man gezielt dsRNA zur Degradierung eines Proteins suchen kann, auch wenn die Nullmutante nicht verfügbar ist. RNAi kann auf unterschiedlichen Arten durchgeführt werden: durch direkte Mikroinjektion von dsRNA in einen adulten Wurm, durch Baden eines Wurms in einer Lösung mit dsRNA oder durch Fütterung von *C. elegans* mit *E.coli* Bakterien, welche dsRNA des zu degradierenden Proteins exprimieren (Kamath & Ahringer, 2003).

Bislang wurden drei Nobelpreise für Arbeiten im Zusammenhang mit *C. elegans* vergeben. So erhielten Sydney Brenner, H. Robert Horvitz und John E. Sulston 2002 für ihre entwicklungsbiologischen Pionierarbeiten sowie Andrew Fire zusammen mit Craig Mello 2006 für die Erforschung der RNA-Interferenz den Nobelpreis für Medizin und Physiologie. Im Jahr 2008 wurde Martin Chalfie zusammen mit anderen Wissenschaftlern mit dem Nobelpreis für Chemie für die Einführung des grün fluoreszierenden Proteins in die biomedizinische Grundlagenforschung ausgezeichnet, wobei Chalfie *C. elegans* als Modellorganismus nutzte.

1.3.2 Insulin/IGF-1 ähnliche Signalweg in *C. elegans*

Die Regulierung des Insulin/IGF-1 (*insulin like growth factor-I*) Signalwegs (s. Abb. 1.5) im Modellorganismus *C. elegans* ist ein wichtiger bestimmender Faktor der endokrinen Kontrolle von Stressabwehr und Alterung. Schon Ende der 80ziger Jahre wurde durch die Entdeckung der ersten langlebigen Mutante, der AGE-1 (*ageing alteration-1*) Mutante, eine Beziehung zwischen genetischer Variation und Langlebigkeit hergestellt (Friedman & Johnson, 1988). Durch die gezielte Suche nach weiteren Mutanten mit vom Wildtyp abweichenden Lebensspannen konnten weitere Gene entdeckt werden, die bei der Kontrolle des Alterns eine Rolle spielen. Zahlreiche dieser Gene konnten in den Insulin/IGF-1 Signalweg eingeordnet werden.

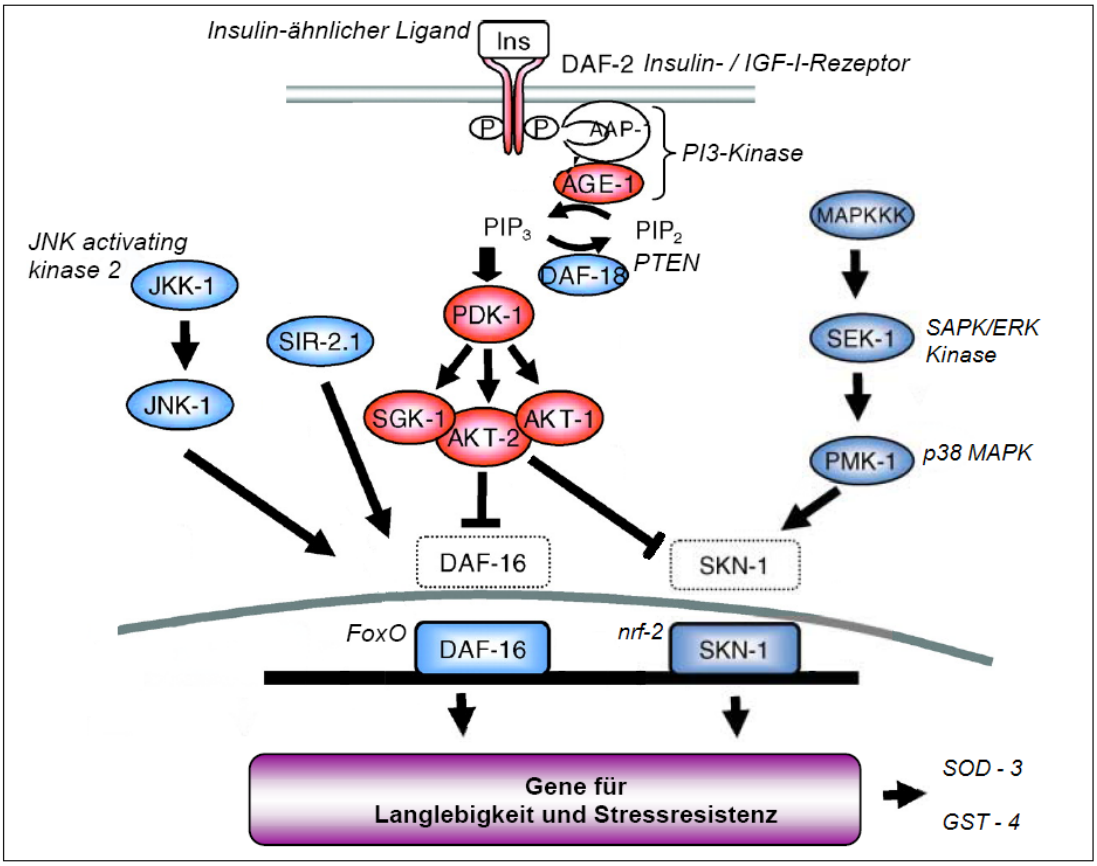


Abb. 1.5: DAF-2 Insulin/IGF-ähnlicher Signalweg und seine Modulatoren (modifiziert aus Baumeister et al., 2006)
In rot dargestellte Gene führen bei einem Funktionsverlust zu einer Zunahme der Lebensspanne, blau dargestellte zu einer Verkürzung. Bei Unterschieden in der Nomenklatur zwischen *C. elegans* und Säugern sind die Namen der Säuger-Homologe bzw. eine funktionelle Beschreibung angegeben. AAP-1: *phosphoinositide kinase adapter subunit*-1, AGE-1: *ageing alteration*-1, AKT-1/2=PKB: *Protein Kinase B*, DAF-x: *abnormal dauer formation*-x, FoxO: *forkhead box, subgroup O*, IGF-I: *insulin-like-growth factor*-I, Ins: Insulin, JKK-1: *JNK Kinase-1*, JNK-1: *Jun N-terminale Kinase-1*, PDK-1: *phosphoinositol-dependent kinase*-1, PI3-Kinase: *Phosphatidylinositol-3-Kinase*, PIP2: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat*, PIP3: *Phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphat*, PTEN: *phosphatase and tensin homolog*, SGK-1: *serum- and glucocorticoid- inducible kinase homolog*-1, SIR-2.1: *silent mating typeinformation regulation*-2.1, SKN-1: *SKiNhead-1*, Nrf-2: *NF-E2-related factor 2*, Pmk-1: *P38 Map Kinase family-1*, P38-MAPK: *P38 Mitogen-activated protein kinase*, SAPK/ERK Kinase: *stress-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase*, SEK-1: *SAPK/ERK kinase*

Die Bedeutung von Komponenten dieser Signalkaskade konnte eindrucksvoll durch Kenon et al. (1993) belegt werden. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass DAF-2 (*abnormal dauer formation-2)*-Mutanten eine im Vergleich zum Wildtyp verdoppelte Lebensspanne aufweisen. Fehlt der Transkriptionsfakor DAF-16, zeigt sich eine verkürzte Lebensspanne (Lin et al., 2001).

Die Aktivität des Rezeptors DAF-2 determiniert die subzelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 und dadurch seine transkriptionsaktivierende Funktion. Nach Ligandenbindung an DAF-2 wird eine Kaskade in Gang gesetzt, die zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors und zu dessen Ausschluss aus dem Zellkern führt. Unterbleibt eine Phosphorylierung, transloziert der Transkriptionsfaktor in den Zellkern und initiiert dort die Transkription von Zielgenen, z. B. der SOD-3. Kenyon et al. (1993) konnten ebenfalls zeigen, dass DAF-2 defiziente Würmer eine starke Kernlokalisation von DAF-16 aufweisen, welches einen Grund für die verlängerte Lebensspanne sein könnte. Auch ein Mitglied der *Sirtuin-Familie* von NAD^+-abhängigen Protein-Deacetylasen, SIR-2.1 (*silent mating typeinformation regulation-2.1*), ist an der Kontrolle der Aktivität von DAF-16 beteiligt. Anders als bei der Insulin/IGF-1-Kaskade bewirkt eine Phosphorylierung von DAF-16 durch JNK-1 (*c-Jun N-terminale Kinase-1*) die Translokation dieses Transkriptionsfaktors in den Zellkern. Obwohl eine Kernlokalisation für Transkriptionsfaktoren eine notwendige Bedingung ist, bedeutet dies nicht zwingend eine transkriptionale Aktivität. So konnte für DAF-16 die Beteiligung gewisser Kofaktoren, wie 14-3-3-Proteine, als notwendig für die transkriptionelle Aktivität ausgemacht werden (Berdichevsky et al., 2006). Seit der Arbeit von Tullet et al., 2008 ist bekannt, dass eine Inhibition des Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalwegs auch eine Translokation von SKN-1 (*SKiNhead-1*) in den Zellkern hervorruft. SKN-1 kann ebenfalls über die MAPK (*Mitogen-activated protein Kinase*)-Kaskade positiv reguliert werden (An & Blackwell, 2003).

Der Insulin/IGF-1 Signalweg ist für den Organismus äußerst wichtig und evolutionär stark konserviert. Für die Forschung ist diese Kaskade auch deshalb sehr von Interesse, da es für viele Komponenten in menschlichen Zellen Homologe zu den einzelnen Proteinkinasen gibt (Kenyon, 2005; Morris, 2005). So ist DAF-16 in *C. elegans* homolog zu der Gruppe der FoxO-Transkriptionsfaktoren (*forkhead box, subgroup O*) im Säuger (Ogg et al., 1997). Dort unterscheidet man mehrere Gruppen vor allem FoxO1a, FoxO3a und FoxO4, welche ubiquitär exprimiert werden. Es

konnte gezeigt werden, dass sich gerade FoxO1a zu DAF-16, v. a. nach Stressreiz, sehr ähnlich verhält (Walter et al., 2006). SKN-1 ist das *C. elegans*-Ortholog zu den humanen Transkriptionsfaktoren Nrf-1 (*NF-E2-related factor*) und Nrf-2 und reguliert v.a. Enzyme der Phase II des Fremdstoffmetabolismus (An & Blackwell, 2003; Baumeister et al., 2006). Veränderungen dieser Kaskade in *C. elegans* lassen durch diese Homologien auch Rückschlüsse auf Säuger einschließlich den Menschen zu.
SKN-1 und DAF-16 lassen sich als Endpunkte des Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalwegs in *C. elegans* sehr gut untersuchen, da für diese Transkriptionsfaktoren Reportergenstämme vorhanden sind. Solche Stämme exprimieren ein an einen Marker gekoppeltes Protein. Häufig wird als solcher Marker GFP (grün fluoreszierendes Protein) eingesetzt, welches es ermöglicht, die Expression des gekoppelten Proteins unter dem Fluoreszenzmikroskop quantitativ auszuwerten. Des Weiteren kann beurteilt werden, ob ein zu untersuchendes Protein im Zellkern oder im Zytosol vermehrt lokalisiert ist.
Der Insulin/IGF-1 ähnliche Signalweg spielt außerdem eine Rolle in weiteren vielfältigen Zellfunktionen wie der Energiegewinnung, der Immunantwort, der Detoxifikation (Gems & McElwee, 2005) sowie beim Eintritt in das Dauerlarvenstadium (Baumeister, 2006). Die Dauerlarve stellte eine Larvenform von *C. elegans* dar, in der keine Entwicklung stattfindet. Sie bildet sich unter schlechtem Nahrungsangebot und Überbevölkerungssituation und ist sehr langlebig (Riddle, 1988).

1.3.3 Bekannte Wirkungen von Flavonoiden in *C. elegans*

Das meiste Wissen über Flavonoide stammt aus *in vitro* Studien, währenddessen Daten aus *in vivo* Studien, die komplexe Interaktionen wie Aufnahme, Metabolismus und Organ- sowie Gewebeinteraktion in Betracht ziehen, nur spärlich verfügbar sind (Williamson & Manach, 2005). Gründe hierfür sind beispielsweise ein Fehlen validierter Biomarker sowie der hohe Kosten- und Zeitaufwand von Studien an Menschen oder mammalischen Versuchstieren. Die Merkmale von *C. elegans* (s. Kapitel 1.3.1) haben ihn als Modell zur Untersuchung biologischer, medizinischer und

pharmakologischer Fragestellung populär gemacht (Voisine et al., 2007). *C. elegans* stellt dabei eine Ergänzung zu den etablierten Systemen dar. Mit ihm wird versucht, die systembedingten Nachteile der *in vivo* Tiermodelle auf der einen Seite und der *in vitro* Zellkulur auf der anderen Seite zu umgehen. Dabei wird *C. elegans* sowohl für Experimente für beschreibende protektive Wirkungen wie beispielsweise die Stressresistenz als auch zur Aufklärung molekularer Mechanismen benutzt.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Flavonoide die Lebensspanne sowie die Stressresistenz von *C. elegans* erhöhen können. Dabei stellen viele Autoren einen Zusammenhang zwischen erhöhter Stressresistenz und einer verlängerten Lebensspanne her (Johnson et al., 2001; Benedetti et al., 2008). Für das Flavonoid Quercetin sind eine Erhöhung der Resistenz gegenüber thermalem und oxidativem Stress sowie eine lebensverlängernde Wirkung bekannt (Kampkötter, 2008). Ebenso konnten diese Eigenschaften für das flavonoidhaltige Extrakt aus Ginkgo biloba EGb 761 gezeigt werden (Wu et al., 2002; Kampkötter 2007b). Untersuchungen zur Stressresistenz und Lebenspanne stellen daher etablierte Methoden zur Beschreibung protektiver Eigenschaften bestimmter Naturstoffe in *C. elegans* dar.

Seit langem werden antioxidativen Eigenschaften als Ursache zytoprotektiver Effekte von Flavonoiden diskutiert. Die antioxidative Aktivität von Flavonoiden konnte auch in *C. elegans* für viele Flavonoide gezeigt werden. Kampkötter et al. (2007a, 2007b, 2007c, 2008) konnten zeigen, dass EGb 761, Quercetin, Kaempferol, Fisetin und Rutin die intrazelluläre ROS-Akkumulation unter thermalem Stress senken können. Als zusätzlicher Marker für eine erhöhte ROS-Belastung, welche in oxidativen Stress mündet, dient Lipofuszin. Dieses Pigment entsteht bei oxidativer Degeneration zellulärer Komponenten. Eine verminderte Akkumulation dieses mit dem Alter korrelierenden Pigments konnte nach Quercetingabe experimentell belegt werden (Smith & Luo, 2003; Kampkötter 2007a). Es konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden, inwieweit dies direkte antioxidative Wirkungen (z.B. radikalfangend) oder indirekte antioxidative Wirkungen (z.B. über Veränderung der Genexpression) sind.

Vom heutigen Standpunkt aus werden den Flavonoiden nicht nur antioxidative Eigenschaften als protektiver Effekt, sondern auch eine zumindest teilweise antioxidativ unabhängige Wirkung zugesprochen (Maeta et al., 2007; Stevenson & Hurst, 2007). Dabei fällt auf, dass selbst für Flavonoide, die in der Strukturformel nur kleine Unterschiede aufweisen und ähnliche protektive und antioxidative

Wirkungsweisen haben, sehr verschiedene Ansatzpunkte zum Wirkmechanismus diskutiert werden.

Die Lebensverlängerung durch eine Testsubstanz stellt den aussagekräfigsten Parameter beschreibender protektiver Eigenschaften dar, da sie der Summe aller Wirkungen dieser Substanz entspricht. Als ein Erklärungsansatz für den Mechanismus einer solchen Wirkung können so wirkende Stoffe daher auch auf eine molekulare Beeinflussung von Proteinen, die mit Alterung in Verbindung stehen, untersucht werden. Allerdings sind viele Gene und Signalkaskaden für Einflüsse auf die Alterung von Nematoden bekannt (Kenyon, 2005), sodass die Alterungsforschung einen in der Biologie zwar viel untersuchten, aber bislang wenig verstandenen Prozess darstellt. Dies zeigt sich auch an der Zahl der etwa 300 bestehenden Alterungstheorien (Medvedev, 1990).

Auch der Insulin/IGF-1 ähnliche Signalweg (siehe Kapitel 1.3.2) stellt eine Kaskade dar, welche in der Alterungsforschung eine wichtige Rolle spielt. Es konnten auch für Flavonoide Wirkungen auf den Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalweg nachgewiesen werden. Für beispielsweise Quercetin (Kampkötter et al., 2008) oder Fisetin (Kampkötter et al., 2007c) konnte eine Translokation von DAF-16 in den Kern gezeigt werden. DAF-16 gilt als ein Schlüsselmediator für Langlebigkeit (Gems & McElwee, 2005), daher wird eine Translokation von DAF-16 in den Kern als möglicher Wirkmechanismus von Flavonoiden diskutiert. Allerdings zeigte sich auch, dass DAF-16 Mutanten nach Quercetingabe eine verlängerte Lebensspanne aufweisen, was eine alleinige Wirkungsweise von Quercetin auf DAF-16 unwahrscheinlich macht (Saul et al., 2008). Eine DAF-16 Translokation in den Kern ist somit kein sicheres Zeichen zur Lebensverlängerung und erhöhter Stressresistenz (Wolff et al., 2006). Für Quercetin wird zusätzlich zur antioxidativen Aktivität eine Wirkung über den MAP-Kinase Signalweg, v.a. über SEK-1 diskutiert (Pietsch et al., 2009). Diese Wirkungsweise wird auch zur Erklärung der lebensverlängernden Wirkung des flavonoidhaltigen Blaubeerenextrakts hinzugezogen (Wilson et al., 2006).

1.4 Zielsetzung

Für Extrakte aus Grünem Tee reich an Catechinen sind zahlreiche epidemiologische Studien zu gesundheitsförderlichen Wirkungen auf den Menschen bekannt. Des Weiteren existieren viele Studien, die auch auf zellulärer Ebene protektive Effekte nachgewiesen haben. Wirkmechanismen vor allem *in vivo* sind aber bislang ungeklärt. In dieser Arbeit wurde daher der Fadenwurm *C. elegans* als gut etablierter, zusätzlicher Modellorganismus zur *in vivo* Untersuchung der protektiven und molekularen Wirkungen von Catechin und seinen Derivaten eingesetzt.

Aufgrund ihrer chemischen Struktur sind Catechin und seine Derivate in der Lage reaktive Sauerstoffspezies abzufangen. Zusätzlich können sie auch verschiedene Signalkaskaden modulieren. Es ist unbekannt, ob die protektive Wirkung von Catechinen durch alleinige Radikalfängeraktivität oder durch Modulation der zelleigenen Schutzmechanismen zu einer ROS-Detoxifikation hervorgerufen wird. Um Hinweise zur Beantwortung dieser Fragestellung zu bekommen, wurde zunächst untersucht, ob Catechin und seine Derivate auch in *C. elegans* protektive Wirkungen zeigen. Es wurde untersucht, ob diese Substanzen die Resistenz gegen thermalen und oxidativen Stress beeinflussen können. Oxidaitver Stress wurde durch die Substanz Juglone hervorgerufen, die durch s.g. Redoxcycling reaktive Sauerstoffspezies generiert. Auch bei thermalem Stress enstehen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies. Um einen möglichen Einfluss von Catechin und seinen Derivaten auf das Altern in seiner Gesamtheit zu untersuchen, wurde die Lebensspanne von wildtypischen Würmern bestimmt, die während ihrer gesamten adulten Lebenszeit mit Catechinen behandelt wurden. Eine Erhöhung der Lebensspanne stellt einen bedeutenden Parameter einer protektiven Wirkung dar. Da Catechin und seine Derivate eine antioxidative Wirkung zeigen, wurde deren Einfluss auf die intrazelluläre ROS-Akkumulation untersucht. Weiterhin wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie der Einfluss der Catechine auf die Akkumulation des Pigments Lipofuszin untersucht, welches als Resultat oxidativ geschädigter Makromoleküle entsteht. Lipofuszin stellt einen speziesübergreifenden Marker für das Altern dar.

Darüber hinaus sollten mögliche molekulare Wirkmechanismen auf die Effektoren des hoch konservierten Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalwegs der Catechinderivate untersucht und diskutiert werden. Manipulationen in diesem Signalweg haben Einfluss

auf die Lebensspanne von *C. elegans*, da sie u.a. wichtige Schutzsysteme vor ROS beeinflussen können. In transgenen Würmern, die ein Fusionsprodukt mit GFP exprimieren, wurden die Transkriptionsfaktoren DAF-16 und SKN-1 als Effektoren dieses Signalwegs auf deren subzelluläre Lokalisation hin untersucht. Eine mögliche Translokation vom Zytosol in den Zellkern ist eine notwendige Bedingung für die transkriptionale Aktivität dieser Proteine. Die Expression der SOD-3 und der GST-4 als Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren wurde ebenfalls mit Hilfe von GFP-Reportergen-Stämmen quantitativ bestimmt. Mit der RNAi Methodik sollte überprüft werden, ob bestimmte durch Catechinderivate hervorgerufene molekulare Veränderungen für die protektiven Eigenschaften dieser Derivate verantwortlich sind. Damit sollte ein Indiz zur Beantwortung der Frage nach alleiniger Radikalfängeraktivität oder aber gezielter Signalmodulation der Catechinderivate gegeben werden.

Da die hohe Konserviertheit der untersuchten Proteine Rückschlüsse aus Versuchen mit *C. elegans* auf den Menschen erlauben, soll diese Arbeit einen Beitrag dazu leisten, die Wirkweise dieser viel umforschten Substanzen näher zu erläutern, um gesundheitsförderliche Aspekte besser erklären zu können und eine gezielte pharmakologische und therapeutische Anwendung zu ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AGE-1	*AGEing-alteration*
Bkg	background, Hintergrund
bp	Basenpaar
BS	BSA und Streptomycin
BSA	*bovine serum albumin*, Rinder-Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad-Celsius
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
DAF	*abnormal DAuerFormation*
DCF	2´, 7´ - Dichlorofluorescein
d.h.	das heißt
dH_2O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	*Escherichia coli*
EC	(-) – Epicatechin
ECG	(-) – Epicatechingallat
EGC	(-) – Epigallocatechin
EGCG	(-) – Epigallocatchingallat
EtOH	Ethanol
g	Gramm
× g	Erdbeschleunigung
GFP	*Green Fluorescent Protein; grün fluoreszierendes Protein*
GST	Glutathion S- Transferase
h	Stunde
HCOOH	Ameisensäure
H_2DCF	2´, 7´ - Dichlorodihydrofluorescein
H_2DCF-DA	2´, 7´ - Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
IGF	*Insulin Growth Factor*
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-galactosid
Lsg.	Lösung
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NaN_3	Natriumazid
NGM	*nematode growth medium*; Nematoden Wachstumsmedium
OD_x	Optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge (x)
PBS	phosphate buffered saline

PBST	phosphate buffered saline mit Tween 20
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	*Reactive Oxygen Species*; reaktive Sauerstoffspezies
rpm	*rotations per minute*
s	Sekunde
SEM	*standard error of the mean;* Standardfehler
SKN	*SKiNhead*
SOD	*Superoxiddismutase*

2.2 Material

2.2.1 Bakterienstämme

E. coli - OP 50

E. coli - OP 50-1

[*Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota)]

E. coli - HT 115 pPD129.36 -- *Insert* leer

-- *Insert* gegen SKN-1

-- *Insert* gegen DAF-16

[Freundliche Gabe von S. Honnen, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf]

2.2.2 *C. elegans* Stämme

N2: *var.* Bristol – Wildtyp

(Brenner, 1974)

TJ356: Transgen zls356 [*daf-16::daf-16-gfp; rol-6*]

(Henderson & Johnson, 2001)

CF1553: Transgen muIs84 [*sod-3::gfp*]

(Libina et al, 2003)

LD001: Transgen is007 [*skn-1::gfp*]

(An & Blackwell, 2003)

Alle oben aufgeführten Stämme wurden über das Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota) bestellt. Für eine detailliertere Beschreibung der Stämme vgl. http://www.wormbase.org/

BL1: [*gst-4::gfp; rol-6*] nicht integriert
[Dieser Stamm ist von B. Leiers unter Aufsicht von PD Dr. rer. nat. Kampkötter generiert worden (Leiers et al., 2003)]

2.2.3 Medien

2.2.3.1 Medien zur Kultivierung der Bakterienstämme

Name	**Zusammensetzung**
OP 50 Minimalmedium:	195,6 ml M9-Puffer 2 ml 2 M NH_4Cl 2 ml 20 % D-Glukose 0,4 ml 2 mg/ml Uracil
OP 50-1 Minimalmedium	200 ml OP 50 Minimalmedium 0,1 ml 100 mg/ml Streptomycin
LB-Medium:	5 g Hefeextrakt 10 g Trypton 5 g NaCl ad 1 L mit dH_2O

2.2.3.2 Medien zur Kultivierung von *C. elegans*

Name	**Zusammensetzung**
NGM-Medium:	3 g NaCl 2,5 g Soja-Pepton ad 1 L mit dH_2O autoklavieren nach dem Abkühlen Zugabe von 1 ml Lsg. A 0,5 ml Lsg. B 1 ml Lsg. C 25 ml Lsg. D
NGM-Agar:	3 g NaCl 2,5 g Soja-Pepton 20 g Bacto-Agar ad 1 L mit dH_2O

autoklavieren
nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C
1 ml Lsg. A
0,5 ml Lsg. B
1 ml Lsg. C
25 ml Lsg. D

2.2.4 Chemikalien

Name	**Firma**
Agarose	Roth
Ameisensäure	Roth
Ammoniumchlorid	Merck
Bacto Agar	Becton Dickinson
BSA	Calbiochem
(+)-Catechin	Sigma
Cholesterol	Sigma
Calciumchlorid	Merck
DMSO	Merck
(-)- Epicatechin	Sigma
(-)- Epicatechingallat	Sigma
(-)- Epigallocatechin	Sigma
(-)- Epigallocatechingallat	Sigma
EtOH, absolut	Merck
D(+)-Glucose	Merck
H_2DCF-DA	Sigma
Incidur	Ecolab
IPTG	Pomega
Juglone	Fluka Chemika
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Methanol Gradient Grade	Prolabo
Methanol p.a.	Fluka Chemika
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid	J.T.Baker
Natriumhypochlorit	ZCL
Soja Peptone	Fluka BioChemika
Streptomycin Sulfat	Sigma
SYTOX Green [5 mM]	Molecular Probes
Uracil	ICN Biomedicals Inc

2.2.5 Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung
1 % Ameisensäure	5 ml Ameisensäure ad 500 ml mit dH_2O
Bleiche-Lösung	50 % 5 M NaOH 50 % Natriumhypochlorit
Catechin Stammlösung	100 mM Catechin in DMSO
20 % D-Glucose	20 g D(+)-Glucose ad 100 ml mit dH_2O sterilfiltrieren, bei 4°C lagern
H_2DCF-DA Gebrauchslösung	250 µM H_2DCF-DA in PBS
H_2DCF-DA Stammlösung	50 mM H_2DCF-DA in DMSO
Juglone Stammlösung	10 mM Juglone in EtOH abs.
Lsg. A	0,5 g Cholesterin 100 ml 96 % EtOH
Lsg. B	27,8 g $CaCl_2$ oder 36,8 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ ad 250 ml mit dH_2O autoklavieren
Lsg. C	30,1 g $MgSO_4$ oder 61,6 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ ad 250 ml mit dH_2O autoklavieren
Lsg. D	27,08 g KH_2PO_4 8,90 g K_2HPO_4 oder 9,1 g $K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$ ad 250 ml mit dH_2O autoklavieren

M9-Puffer	6 g Na_2HPO_4 3 g KH_2PO_4 5 g NaCl 0,25 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ ad 1 L mit dH_2O autoklavieren bei 4 °C lagern
20 mM Natriumazid	0,065 g NaN_3 in 50 ml dH_2O
2 M NH_4Cl	10,698 g NH_4Cl ad 100 ml mit dH_2O sterilfiltrieren
5 M NaOH	20 g NaOH in 100 ml dH_2O
Natriumhypochlorit	13 % Chlorid-Ionen
NGM-BS	10 × NGM-BS 1:10 verdünnt mit NGM
10 × NGM-BS	10 g BSA 500 µl 100 mg/ml Streptomycin ad 100 ml mit NGM sterilfiltrieren
10 × PBS	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na_2HPO_4 2,4 g KH_2PO_4 ad 1 L mit dH_2O, pH 7,4
PBST (0,1 % Tween 20)	1 ml 10 % Tween 20 10 ml 10 × PBS ad 100 ml mit dH_2O
SYTOX-Green Gebrauchslösung	2 µM SYTOX-Green in PBS
SYTOX-Green Stammlösung	50 µM SYTOX-Green in DMSO

10 % Tween 20	10 ml Tween 20 ad 100 ml mit dH_2O
2 mg/ml Uracil	0,2 g Uracil in ad 100 ml mit dH_2O sterilfiltrieren

2.2.6 Sonstige Materialien

Material	**Firma**
Petrischalen (35 × 10 mm)	Greiner 627161
Petrischalen (60 × 15 mm)	Falcon 351016
Petrischalen (100 × 15 mm)	Falcon 351029
384-well µ Clear-Platte, SV, schwarz	Greiner 788096
Abdeckfolie	EasySeal 676001 [Greiner]
Deckgläser (18 × 18 mm) Objektträger (76 × 26 mm)	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH

2.2.7 Geräte

Gerät	**Firma**
Fluoreszenzmikroskop	Axiolab [Zeiss]
Stereomikroskop	S8AP0 [Leica]
Kamera	Cool Snap CF Digital Monochrome Camera [Intas]
	Panasonic Lumix
Photometer	Lambda 25 UV/VIS Spectrometer
	[Perkin Elmer]
Fluoreszenzspektro-	Wallac Victor^2 1420 Multilabel Counter
photometer	[Perkin Elmer]
Inkubator	OV 2 [Biometra]
Zentrifugen	Minifuge 2 [Heraeus-Christ]
	Microfuge R [Beckman]

2.2.8 Computerprogramme

Image Pro Plus Version 4.5 [MediaCybernetics]

MS Office [Microsoft]

TINA 2.0 [Raytest Isotopenmessgeräte GmbH]

UV Winlab Version 2.85.04 [Perkin Elmer]
Wallac 1420 Workstation [Perkin Elmer]
SPSS 15.0 [SPSS Inc.]

2.3 Methoden

2.3.1 Bakterienkultivierung

2.3.1.1 *E. coli* OP 50 Kultivierung

Bei der Kultivierung auf NGM-Agar-Platten dienten *Escherichia coli* OP 50-Bakterien als Nahrungsquelle für *C. elegans*. Diese wurden in 200 ml OP 50 Minimalmedium für 15-18 Stunden, meist über Nacht, bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die OP 50-Kultur bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert (Minifuge 2 [Heraeus-Christ]) und der Überstand bis auf 7,5-10 ml verworfen. In diesem Volumen wurden die OP 50 Bakterien resuspendiert und als 2 ml Aliquots bei 4°C gelagert.

2.3.1.2 *E. coli* OP 50-1 Kultivierung

Als Nahrungsquelle für *C. elegans* bei der Kultivierung in Flüssigmedium dienten *E. coli* OP 50-1-Bakterien. Diese Bakterien besitzen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Streptomycin und wurden in 200 ml OP 50-Minimalmedium, das 50 µg/ml Streptomycin enthält, über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert (Minifuge 2 [Heraeus-Christ]) und der Überstand bis auf 7,5-10 ml verworfen. In diesem Volumen wurden die OP 50-1 Bakterien resuspendiert, als 2 ml Aliquots bei 4°C gelagert und für maximal einen Monat verwendet.

2.3.1.3 *E. coli* HT 115 Kultivierung

Für das gezielte Stilllegen von Genen mittels RNAi wurde der Stamm HT115 (DE3) benutzt. Dieser Stamm ist resistent gegen Tetracyclin, RNase III defizient und die T7 Polymerase ist durch IPTG induzierbar. Der eingesetzte Vektor ist pPD129.36, welcher es möglich macht, durch IPTG induzierbar, dsRNA der jeweiligen *Inserts* herzustellen. Darüber hinaus befindet sich auf diesem Vektor eine Ampicillin Resistenz, über welche erfolgreich transfizierte Bakterien selektiert werden können.
Zur Durchführung von RNAi-Fütterungs-Untersuchungen (Kamath & Ahringer, 2003) wurde von einer Selektionsplatte (LB-Medium mit 50µg/ml Ampicillin und 10µg/ml

Tetracyclin) eine Einzelkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze abgenommen und in 50 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin gelöst und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Induktion des Plasmids wurde IPTG in einer Konzentration von 1 mM hinzugegeben und wiederum unter Schütteln eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert (Minifuge 2 [Heraeus-Christ]) und der Überstand bis auf 7,5-10 ml verworfen. In diesem Volumen wurden die Bakterien resuspendiert, als 2 ml Aliquots bei 4°C gelagert und für maximal einen Monat verwendet.

2.3.1.4 Bestimmung der Dichte einer Bakterienkultur

Die Dichte einer Bakterienkultur wurde durch photometrische Messung ihrer Trübung bestimmt (Lambda 25 UV/VIS Spectrometer [Perkin Elmer]). Dazu wurde die OD_{600} von 1 ml der Bakterienkultur, die 1:10 mit OP 50-Minimalmedium verdünnt wurde, in einer Küvette gegen OP 50-Minimalmedium bzw. LB-Medium als Referenz gemessen. Die OD_{600} ließ sich dann nach folgender Formel

$$OD_{600} = (OD_{600}\ \text{Probe} \times \text{Verdünnungsfaktor}) - OD_{600}\ \text{Medium}$$

oder automatisch durch das Computerprogramm UV Winlab Version 2.85.04 [Perkin Elmer] berechnen. Eine $OD_{600} = 1$ entspricht etwa einer Bakterienmenge von $6{,}9 \times 10^8$ Lebendzellen pro ml. Auf diese Weise ließ sich für jede gemessene OD_{600} leicht die Lebendzellzahl pro ml bestimmen und so konnte stets eine konstante Bakterienmenge in den Experimenten eingesetzt werden.

2.3.2 Kultivierung von *C. elegans*

2.3.2.1 Festmedium

Für die Kultivierung der Fadenwürmer wurden Petrischalen (Falcon 351029) mit NGM-Agar gegossen. Nachdem der Agar sich gefestigt hatte, wurden die fertigen NGM-Agar-Platten entweder bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert oder mit 50-100 µl einer aufkonzentrierten *E. coli* OP 50-Kultur bestrichen. Die Bakterien dienen *C. elegans* als Nahrung. Zum Kultivieren der Bakterien wurden die Platten

anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Fadenwürmer konnten dann auf den Agar überführt werden. Die Kultivierung erfolgte bei 20°C. Um eine zu hohe Populationsdichte und damit Hungerstress zu vermeiden, wurden etwa 20 Würmer nach drei bis vier Tagen auf frische, mit OP 50-Bakterien versehene NGM-Agar-Platten umgesetzt.

2.3.2.2 Flüssigmedium

Die Kultivierung von *C. elegans* in Flüssigmedium wurde dazu benutzt, den Einfluss von Flavonoiden auf diesen Organismus zu untersuchen. Da Catechin und seine Derivate im Medium löslich sind, kann von einer konstanten Konzentration ausgegangen werden. Der Wurm nimmt zusätzlich zur topischen Exposition durch pharyngeales Pumpen passiv das Flavonoid auf.

Durch Semisynchronisation (s. Kap. 2.3.2.3) gewonnene Eier oder L4-Larven wurden in 35×10 mm Petri-Schalen mit 2 ml NGM-BS, 5×10^7 OP 50-1 Bakterien und 100 µM des zu testenden Flavonoids inkubiert. Die Kultivierung erfolgte bei 20 – 25 °C.

2.3.2.3 Semisynchronisation von *C. elegans*

Für die durchgeführten Experimente wurden stets Würmer gleichen Alters in hoher Zahl benötigt, dazu wurde eine Alters-Synchronisation durchgeführt. Dabei wurden durch die Inkubation mit einer so genannten „Bleiche-Lösung“ (50 % Natriumhypochlorit [13 % Cl^-]; 50 % 5 M Natriumhydroxid) sämtliche Larven und adulten Würmer abgetötet, so dass nur die durch ihre Eischale geschützten Embryonen unbeschadet überlebten. Das Alter dieser Eier variierte nur in einem geringen Zeitrahmen, so dass alle sich entwickelnden Larven in etwa dasselbe Alter aufwiesen. Um eine möglichst hohe Effizienz bei der Synchronisation zu erreichen, wurden drei bis vier Tage alte *C. elegans* Kulturplatten zur Semisynchronisation benutzt. Auf diesen Kulturplatten befinden sich viele jungadulte Tiere, die viele Eier in sich tragen.

Zu Beginn der Semisynchronisation wurden die Würmer mit 2 ml NGM abgespült und in Eppendorf-Gefäße überführt. Die so erhaltene Suspension aus Würmern, Larven und Eiern wurde durch Zentrifugieren bei 5000 × g und 4°C für eine Minute pelletiert (Microfuge R [Beckman]). Anschließend wurde der Überstand bis auf einen Rest von 0,5 ml verworfen und das Pellet darin resuspendiert. Anschließend wurde für eine fünfminütige Inkubationszeit 0,5 ml „Bleiche-Lösung“ hinzugegeben, wobei die Lösung durch Invertieren gemischt wurde. Nach dieser Behandlung erfolgte eine

Zentrifugation bei 5000 x g und 4°C für eine Minute. Es folgten drei Waschschritte, bei denen jeweils der Überstand möglichst vollständig entfernt und das Pellet in 2 ml NGM resuspendiert wurde, bevor erneut für eine Minute bei 5000 × g und 4°C zentrifugiert wurde. Abschließend wurde der Überstand bis auf einen Rest von etwa 200-400 µl entfernt. Das verbleibende Pellet wurde in dem Restvolumen resuspendiert und konnte dann für vorbereitete NGM-Platten oder Flüssigkulturen benutzt werden.

2.3.3 Flavonoid-Inkubation

Um die Würmer mit den entsprechenden Flavonoiden behandeln zu können, wurden sie in NGM-BS, welches mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids oder 0,1 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle versetzt war, bei 20 - 25°C inkubiert. Als Nahrung dienten den Würmern OP 50-1 Bakterien, die in einer Konzentration von $2{,}5 \times 10^7$ Lebendzellen pro ml in das Kulturmedium gegeben wurden. Je nach experimentellem Aufbau wurden die Würmer direkt nach der Semisynchronisation oder zu einem späteren Zeitpunkt als L4-Larven für 48-72 Stunden in flavonoidhaltigem Medium inkubiert. Die jeweiligen Inkubationsschemata der verschiedenen experimentellen Ansätze werden in den entsprechenden Kapiteln noch einmal dargestellt.

2.3.4 Lebensspanneuntersuchungen unter normal Bedingungen

L4-Larven wurden in 35 × 10 mm Petri-Schalen mit 2 ml NGM-BS/OP 50-1 und 100µM des zu testenden Catechinderivats überführt und bei 20°C inkubiert. Die Würmer wurden während ihrer Reproduktionsphase täglich in frisches Medium überführt, um Vermischung über Generationen zu vermeiden. Danach genügte es, die Würmer jeden zweiten Tag umzusetzten. Das Überleben der Würmer wurde täglich durch das Anstoßen mit einem Platindraht überprüft. Bewegten sich die Würmer nach mehrmaligem leichtem Berührungsstimulus nicht, wurden sie als tot gewertet und aus der Kultur entfernt.

2.3.5 Oxidativer Stress

Zur Untersuchung der Resistenz gegen oxidativen Stress wurden semisynchronisierte N2-Embryonen drei Tage in NGM-BS/OP50-1 bei 20°C und mit 100 µM des zu testenden Catechin-Derivats bzw. 0,1 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle (s. Kap. 2.3.3) inkubiert. Die bis dahin zu L4-Larven gewachsenen Würmer wurden mittels einer Glaskapillare in eine Petrischale (35 × 10 mm) mit 2 ml NGM-Medium und 200µM Juglone überführt und bei 20°C für fünf Stunden gestresst. Juglone wirkte hierbei als Redoxcycler und generierte intrazellulär oxidativen Stress über die Bildung des Semichinonradikals welches wiederum zur Bildung von H_2O_2 führt (s. Kap. 1.2.1).

Danach wurden die Würmer wieder mit einer Glaskapillare auf eine mit OP-50 Bakterien bewachsene NGM-Agar-Platte überführt und 20 h bei 20°C zur Regeneration belassen. Ein Wurm wurde als tot gewertet, wenn er sich auch nach mehrmaligem mechanischem Reiz mit einem Platindraht nicht mehr bewegte (*„touched provoked movement“*) (Lithgow *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2002; Gill *et al.*, 2003). Es wurden die Mittelwerte der prozentualen Anteile der überlebenden Würmer miteinander verglichen.

2.3.6 Thermaler Stress

2.3.6.1 Manuelle Untersuchung der Thermoresistenz

Zur manuellen Ermittlung der Überlebensspannen der Würmer unter thermalen Stressbedingungen wurden L4-Larven in 35 × 10 mm Petri-Schalen mit 2 ml NGM-BS / OP 50-1 und 100 µM des zu testenden Flavonoids überführt (s. Kap. 2.3.3). Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden bei 20°C wurden die Würmer, getrennt nach Populationen, auf mit OP 50 Bakterien bewachsene 60 x 15 mm NGM-Agar-Platten überführt. Auf diesen Agar-Platten erfolgte der thermale Stress in einem Inkubator für fünf Stunden bei 37°C. Im Anschluss an den thermalen Stress erfolgte eine Regenerationsphase bei 20°C für 20 Stunden, so dass ausgeschlossen werden konnte, lediglich geschwächte Würmer als tot zu werten. Anschließend wurde das Überleben der Würmer mittels der Methode des *„touched provoked movement“* gezählt. Auf diese Weise ließ sich ein Prozentwert für das Überleben nach fünf Stunden thermalem Stress für das jeweilige Experiment ermitteln. Um mögliche Unterschiede durch die Flavonoidbehandlung zu bestimmen, wurden die Mittelwerte der prozentualen Überlebenswerte miteinander verglichen.

2.3.6.2 Sytox-Green-Assay

Der „SYTOX Green® Assay“ ist eine von Gill et al. (2003) entwickelte und von Kampkötter et al. (2006) modifizierte Methode, mit der in einer hohen Durchsatzrate an Würmern die Überlebensspannen von *C. elegans*-Populationen unter Stressbedingungen bestimmt und miteinander verglichen werden können. Der Farbstoff SYTOX Green® [Molecular Probes] kann nur in tote Zellen über deren geschädigte Membranen eindringen und interkaliert in die DNA. Durch die Bindung nimmt die Fluoreszenzintensität (Exzitation λ = 485 nm; Emission λ = 535 nm) etwa um das 500-fache zu.

Um die Resistenz gegen thermalen Stress nach Flavonoidbehandlung zu untersuchen, wurden wildtypische L4-Larven in 35 × 15 mm Petri-Schalen mit 2 ml NGM-BS / OP 50-1 und 100 µM des zu testenden Flavonoid überführt und für 48 Stunden bei 20°C inkubiert (s. Kap. 2.3.3).

Zu Beginn des „SYTOX Green® Assays“ wurde eine frische OP50- Bakterien-Verdünnung mit einer Zielkonzentration von 10^7 Zellen/ml hergestellt. Dazu konnte man zu 2 ml PBST (0,1 % Tween 20) die jeweilige Menge an Bakterien aus den vorrätigen Aliquots, deren Zellzahl durch die Dichtebestimmung bekannt ist (s. Kap. 2.3.1.4), hinzugeben. Von der Bakteriensuspension wurden 9 µl luftblasenfrei in die zu verwendenden Wells der 384-Well-Platte (Greiner 788096) pipettiert. Als Kontrolle wurden acht Wells mit 10 µl Bakteriensuspension und acht Wells mit 10 µl PBST ohne OP 50 gefüllt.

Die folgenden Schritte wurden unter lichtmikroskopischer Kontrolle durchgeführt (S8AP0 [Leica]). Nachdem die Würmer mit einer Pipette aufgesaugt wurden und in der Pipettenspitze abgesunken waren, wurden sie in möglichst geringem Volumen in Petrischalen (35 × 15 mm) mit je 2 ml PBST überführt und für mindestens 1-1,5 Stunden gewaschen. Dieser Waschschritt diente dazu eine Kontamination der Wells zu verhindern und er gab den flavonoidbehandelten Würmern die Möglichkeit, die noch im Darm befindlichen Flavonoide auszuscheiden. Aus dem Waschmedium wurden die Würmer einzeln in je 1 µl des Waschmediums in die vorbereiteten Wells überführt. Anschließend wurde in jedes Well 10 µl 2 µM SYTOX Green® [Molecular Probes] pipettiert und die 384-Well-Platte mit einer lichtundurchlässigen schwarzen Abdeckfolie (EasySeal 676001 [Greiner]) abgeklebt, um die Verdunstung des Mediums zu verhindern. Zur Messung der Fluoreszenzverläufe der Wells wurde die

Platte in das auf 37°C vorgeheizte Fluoreszenzspektrophotometer (Wallac Victor^2 1420 Multilabel Counter [Perkin Elmer]) gestellt. Die Messung wurde dann bei 37°C gestartet. Die Fluoreszenzwerte der einzelnen Wells wurden alle 15 Minuten gemessen. Es wurde das folgende Messprotokoll verwendet:

Name of the plate type ..... 384-well Greiner #788096	Name of the label .....SYTOX Green
Number of wells in the plate ..... 16 x 24	Label technology .....Prompt fluorometry
Height of the plate ..... 7,5 mm	CW-lamp filter name F485
Offset of the wells ..... 9.150 mm, 12.037 mm	CW-lamp filter slot A5
Distance between wells ..... 4.493 mm, 4.498 mm	Emission filter name F535
Number of repeats 50	Emission filter slot A5
Delay between repeats ..... 900 s	Measurement time ..... 0.2 s
Measurement height ..... 4.00 mm	Emission aperture ..... Normal
Protocol notes	CW-lamp energy 40000
	Second measurement CW-lamp energy . 0
	Emission side ..... Below
	CW-Lamp Control ..... Stabilized Energy
	Excitation Aperture ..... N/A

Tab. 2.1: Messprotokoll des „Sytox Green® Assays

Während der Messung wurde zu jedem Messzeitpunkt für jedes Well ein Fluoreszenzwert gemessen. Durch die Darstellung der Messwerte gegen die Zeit konnten die Fluoreszenzverläufe der einzelnen Wells ermittelt werden. Um aus den Fluoreszenzverläufen dann die Todeszeitpunkte der einzelnen Würmer zu bestimmen, mussten zunächst Grenzwerte, die s.g. *cut-off*-Werte, festgelegt werden. Bei der Bestimmung der Todeszeitpunkte ist allerdings zu beachten, dass es sich nicht um die realen Todeszeitpunkte der Würmer, sondern um „virtuelle“ Todeszeitpunkte handelt, die jedoch eine Aussage über die Schädigung des Wurms bzw. seiner Zellmembranen zulassen.

cut-off 200 % =	Mittelwert der ersten 4 Messwerte	× 2

Tab. 2.2: Grenzwerte zur Bestimmung des Todeszeitpunktes

Der Zeitpunkt, an dem einer dieser Grenzwerte überschritten wurde, wurde als der Todeszeitpunkt für den zugrunde liegenden Wurm definiert. Die mittlere Überlebensspanne einer Wurmpopulation wurde durch die Berechnung des Mittelwertes aller Todeszeitpunkte dieser Population bestimmt.

Bei einem starken Fluoreszenzanstieg in den Kontroll-Wells ohne OP 50 Bakterien musste von einer erheblichen Kontamination der 384-Well-Platte ausgegangen werden. Stieg der Fluoreszenzverlauf der Kontroll-Wells mit OP 50 Bakterien stark an, ließ sich eine Kontamination der Bakterienkultur und/oder ein zu hoher Anteil an toten Bakterien nicht ausschließen.

2.3.7 Messung der intrazellulären ROS-Akkumulation in *C. elegans*

Als Nachweis der intrazellulären Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) unter thermalen Stressbedingungen wurde der s.g. DCF-Assay durchgeführt. In diesem Assay wurde die Sonde 2′, 7′-Dichlorodihydrofluorescein (H_2DCF) in ihrer modifizierten Form als 2′, 7′-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H_2DCF-DA; Sigma) eingesetzt, um die Zellmembran besser passieren zu können. Nach Hydrolyse der Acetatgruppen des H_2DCF-DA durch zelleigene Esterasen kann das nicht fluoreszente H_2DCF durch ROS zu 2′, 7′ - Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert werden. Das Oxidationsprodukt DCF ist aufgrund des nun vorliegenden konjugierten π-Elektronensystems fluoreszent und kann in einem Fluoreszenzspektrophotometer gemessen werden. Dabei steigt die Intensität des Fluoreszenzsignals proportional zur gebildeten ROS-Menge und dient somit als Maß für die intrazelluläre Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies.

Für die Untersuchung, ob die Behandlung mit den Flavonoiden einen Einfluss auf die ROS-Akkumulation unter thermalem Stress hat, wurden wildtypische L4-Larven in 35 × 15 mm Petri-Schalen mit 2 ml NGM-BS/OP 50-1 und 100 µM des zu testenden Catechin-Derivats überführt und 48 Stunden bei 20°C inkubiert (siehe 2.3.4).

Vor Beginn der Messung wurden die mit Flavonoiden behandelten Würmer mit einer Pipette aufgesaugt. Nachdem die Würmer in der Pipettenspitze abgesunken waren, wurden sie in möglichst geringem Volumen in Petrischalen (35 × 15 mm) mit je 2 ml 0,1 % PBST überführt und für 1-1,5 Stunden gewaschen.

Unter optischer Kontrolle mit einem Stereomikroskop (S8AP0 [Leica]) wurden 7 µl PBS luftblasenfrei in die Wells einer 384-Well-Platte (Greiner 788096) pipettiert. Die Würmer wurden einzeln aus dem Waschmedium in 1 µl des Waschmediums in die vorbereiteten Wells überführt. Als Kontrolle wurden 16 Wells mit je 8 µl PBS gefüllt, um die Hintergrundfluoreszenz bestimmen zu können. Die auftretende Hintergrundfluoreszenz entsteht durch die Reaktion des H_2DCF-DA mit Sauerstoff,

der sich im eingesetzten Medium befindet sowie durch Photooxidation. Anschließend wurde in jedes Well 2 µl 250 µM H_2DCF-DA (Sigma) pipettiert, so dass eine Endkonzentration von 50 µM H_2DCF-DA in jedem Well vorlag. Da das H_2DCF-DA durch Licht oxidiert werden kann, war es zwingend notwendig, die Substanz unter möglichst dunklen Lichtverhältnissen in die Kavitäten der 384-Well Platte zu pipettieren. Die 384-Well-Platte wurde dann mit einer lichtundurchlässigen schwarzen Abdeckfolie (EasySeal 676001 [Greiner]) abgeklebt, um die Verdunstung des Mediums zu verhindern. Die Emission der Fluoreszenz der jeweiligen Wells wurde im Fluoreszenzspektrophotometer (Wallac Victor^2 1420 Multilabel Counter [Perkin Elmer]) bei einer Temperatur von 37°C gemessen. Die Fluoreszenzintensität der Wells wurde alle 15 Minuten aufgezeichnet, wobei das gleiche Messprotokoll wie beim SYTOX Green Assay verwendet wurde (s. Tab. 2.1, Kap. 2.3.6.2).

Während der Messung wurde zu jedem Messzeitpunkt für jedes Well ein Fluoreszenzwert gemessen, so dass der Anstieg der Fluoreszenz gegen die Zeit ermittelt werden konnte. Anhand des Kurvenverlaufs der jeweiligen Wells konnte bereits eine Aussage über die Verwendbarkeit der Werte getroffen werden, wobei diese Überprüfung nach jedem Einzelexperiment durchgeführt wurde. Zeigten einige Kurven einen deutlich steileren oder flacheren Verlauf als dies bei den übrigen Kurven der Fall war, wurden die betreffenden Werte, so genannte „Ausreißer“, aus der Auswertung genommen. Das Auftreten von „Ausreißern“ war durch eine ungünstige Position des Wurms in dem Well oder durch Kontamination bedingt.

Nachdem für jeden Messzeitpunkt der Mittelwert aus allen durchgeführten Experimenten berechnet wurde, ließ sich der Fluoreszenzanstieg und somit der Anstieg der intrazellulären ROS-Akkumulation der unterschiedlichen Wurmpopulationen miteinander vergleichen.

2.3.8 Untersuchungen zur Lipofuszin-Akkumulation

Lipofuszin ist ein in vielen Spezies vorkommendes Alterspigment und wird so auch in *C. elegans* als Alterungsmarker eingesetzt (Gerstbrein et. al., 2005). Es ist das Endprodukt von Peroxidations- und Glykosylierungsreaktionen und entsteht vermehrt bei erhöhter oxidativer Schädigung von Proteinen, um dann intrazellulär zu akkumulieren. Die Eigenfluoreszenz von Lipofuszin macht es als Alterungsmarker besonders beliebt. Die Fluoreszenz kann mikroskopisch nach Anregung durch UV-

Licht (Excitation: λ = 450 – 490 nm) densitometrisch in der Intensität bestimmt werden (Emission: λ = 510 nm).

Für das Experiment wurden wildtypische L4-Larven (s. Kap. 2.3.2) in 35 × 15 mm Petri-Schalen überführt. Als Inkubationsmedium dienten 2 ml NGM-BS/OP 50-1 mit 100 µM des zu testenden Catechin-Derivats bzw. 0,1 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle (s. Kap. 2.3.4). Inkubiert wurden die Würmer für 72 Stunden bei 20°C. Im Anschluss daran wurden die Würmer weitere 24 Stunden in flavonoidfreiem Medium inkubiert, um sicher zu stellen, dass sich in den Würmern kein Flavonoid mehr befindet. So wurde ein Einfluss auf die Messergebnisse durch die Eigenfluoreszenz der Flavonoide weitgehend minimiert.

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurden die Würmer auf Objektträger übertragen, die mit einem Agarosetropfen vorbereitet waren. Dies bewirkte, dass die Würmer eher im gewundenen Zustand auf dem Objektträger lagen und so einfacher fotografiert werden konnten.

Die Würmer wurden dann bei 100-facher Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Axiolab [Zeiss]), bei einer Belichtungszeit von 0,5s fotografiert und die Fluoreszenzintensität densitometrisch ausgewertet (s. Kap. 2.3.14 und 2.3.15). Der gesamte Wurm wurde für die densitometrische Quantifizierung der Lipofuszin-Akkumulation herangezogen.

2.3.9 DAF-16 Lokalisation

Um den Einfluss von Catechin und seinen Derivaten auf die subzelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 untersuchen zu können, wurde der *C. elegans* Stamm TJ 356 verwendet (Henderson & Johnson, 2001). Dieser Stamm trägt das Transgen zls356 und exprimiert unter der Kontrolle des DAF-16-Promoters ein DAF-16-GFP Fusionsprotein [*daf-16::daf-16-gfp; rol-6*]. Durch die Anregung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 546 nm emittiert das grün fluoreszierende Protein (GFP) Licht (λ = 580 nm) und lässt sich auf diese Weise leicht mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops beobachten.

Die durch Semisynchronisation erhaltenen Embryonen wurden in 35 × 15 mm Petri-Schalen mit 2 ml NGM-BS/ OP 50-1 mit 100 µM des zu testenden Flavonoids überführt und für 72 Stunden bei 20°C inkubiert (s. Kap. 2.3.3). Danach erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie.

cytosolisch	diffuse Verteilung von DAF-16 im gesamten Wurm, keine Andeutungen von Zellkernen
intermediär	diffuse Verteilung von DAF-16 im gesamten Wurm, einzelne Andeutungen von Zellkernen
nukleär	Fluoreszenz der Zellkerne eindeutig zu erkennen

Tab. 2.3: Klassifikation der subzellulären DAF-16 Lokalisation

Die mikroskopische Untersuchung (Axiolab [Zeiss]) erfolgte wie in Kaptiel 2.3.14 beschrieben. Die Einteilung der subzellulären Lokalisation von DAF-16 in die Klassen cytosolisch, intermediär und nukleär erfolgte nach einem Schema, wie in der Tabelle 2.3 dargestellt.

2.3.10 Expression der SOD-3

Für die Untersuchung der Expression der manganhaltigen mitochondrialen Superoxiddismutase wurde der transgene *C. elegans* Stamm CF 1553 (Libina et al., 2003) verwendet, der das Transgen muls84 [*sod-3::gfp*] trägt. Aufgrund des integrierten Transgens exprimiert dieser Stamm unter der Kontrolle des SOD-3-Promotors das grün fluoreszierende Protein (GFP). Somit ist die Expression des GFP proportional zur Expression der endogenen SOD-3. Nach Anregung des GFPs mit einer bestimmten Wellenlänge lässt sich das vom grün fluoreszierenden Protein emittierte Licht mit einem Fluoreszenzmikroskop beobachten und nach Photographie anschließend densitometrisch quantifizieren.
Durch Semisynchronisaton gewonnene Embryonen dieses Stammes wurden direkt in 35 × 15 mm Petri-Schalen in 2 ml NGM-BS/OP 50-1 und 100 µM des zu testenden Catechinderivats überführt und für 72 Stunden bei 20°C inkubiert (s. Kap. 2.3.4).
Im Anschluss daran wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Würmer bei 100-facher Vergrößerung und 2 s Belichtungszeit gemacht, wobei der gesamte Wurm zur densitometrischen Auswertung herangezogen wurde (s. Kap. 2.3.14 und 2.3.15).

2.3.11 SKN-1 Lokalisation unter oxidativem Stress

Nach der Semisynchronisation wurden die Eier des transgenen Stamms LD001 für 72 h in 2 ml NGM-BS/OP 50-1 mit 100 µM des zu testenden Catechin-Derivats bzw. 0,1 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle inkubiert (s. Kap. 2.3.3). Der Stamm LD001 (An & Blackwell, 2003) besitzt ein Fusionsprodukt zwischen dem N-Terminus von SKN-1 und dem Reporterprotein GFP, welches zusammen unter der Kontrolle des Promotors von SKN-1 steht. Zur Erzeugung oxidativen Stresses wurden die Würmer eine Stunde lang in 2 ml NGM mit 175 µM Juglone inkubiert. Danach erfolgte die Vorbereitung der Objektträger und die Fluoreszenzmikroskopie (s. Kap. 2.3.14). Wichtig war es, möglichst zügig zu arbeiten, da die Lähmung der Würmer mittels Natriumazid eine Hemmung des mitochondrialen Elektronentransports verursacht, wodurch ebenfalls oxidativer Stress erzeugt wird, was auch zu einer Translokation von SKN-1 in den Kern führen könnte. Tabelle 2.4 zeigt die Klassifikation der Würmer. Die Gruppen „medium“ und „high“ wurden in der Auswertung als „nukleäre“ Gruppe zusammengefasst.

low	keine fluoreszenten Zellkerne sichtbar
medium	fluoreszente Zellkerne im anterioren und posterioren Bereich des Darms
high	fluoreszente Zellkerne im gesamten Bereich des Darms

Tab. 2.4: Klassifikation der subzellulären Lokalisation von SKN-1

2.3.12 Expression der GST-4

Für das Experiment wurde der Stamm BL-1 (Leiers et al., 2003) nach Semisynchronisation drei Tage auf einer mit OP50 ausgestrichenen NGM-Platte zu L4-Larven aufgezogen. Dieser Stamm exprimiert ein Reportergenkonstrukt bestehend aus dem Promoter und der kodierenden Region der GST-4 fusioniert mit GFP. Als Selektionsmarker besitzen diese transgenen Würmer ebenfalls eine Mutation in einem Muskelprotein [rol-6], so dass sich transgene Würmer nur um die eigene Achse drehen können. Da das Transgen nicht integriert ist, befinden sich auf Aufzuchtsplatten jeweils Würmer, die den Roller-Phänotyp zeigen, sowie solche, die sich wildtypisch bewegen. Für dieses Experiment wurden nur L4-Larven des Roller-Phänotyps

eingesetzt und einzeln in 35 × 15 mm Petri-Schalen überführt. Als Inkubationsmedium dienten 2 ml NGM-BS/OP 50-1 mit 100 µM des zu testenden Catechin-Derivats bzw. 0,1 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle (s. Kap. 2.3.4). Inkubiert wurden die Würmer für 48 Stunden bei 20°C.

Die Expression der GST-4 wurde unter Normalbedingungen und unter oxidativem Stress untersucht. Um oxidativen Stress zu generieren, wurden die Würmer im Anschluss an die Inkubation in 2 ml NGM/OP50 mit 45 µM Juglone für 18 h oxidativ gestresst, um die GST-4 zu induzieren. Als Lösungsmittelkontrolle des Juglons wurde dasselbe Volumen an Ethanol für jede jeweilige Gruppe bei der Untersuchung unter Normalbedingungen eingesetzt. Im Anschluss daran wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Pharynxbereichs der Würmer bei 200-facher Vergrößerung und 3 s Belichtungszeit gemacht. Nur dieser Bereich wurde für die densitometrische Auswertung herangezogen.

2.3.13 Lebensspanneuntersuchungen unter RNAi Bedingungen

Zur Untersuchung der Lebensspanne unter RNAi Bedingungen wurden die Würmer zuerst auf Festmedium zu L4-Larven herangezogen. Diesem Zustand entspricht bei *C. elegans* unter normalen Bedingungen ein Lebensalter von drei Tagen. 20 bis 30 L4-Larven pro Behandlungsgruppe wurden nun in 2 ml PBST für etwa 1 h gewaschen. Inkubiert wurde in 2 ml NGM mit 5×10^7 HT115 Bakterien des jeweiligen Konstrukts, 100 µg/ml Ampicillin und 1 mM IPTG bei 25°C [OV 2 [Biometra]]. Bis zum Alter von 13 Tagen der Würmer war ein tägliches Umsetzen der Würmer in frisches Medium und ein Waschgang in PBST sehr wichtig, um Kontaminationen zu vermeiden. Danach genügte das Umsetzen jeden zweiten Tag. Durch s.g. *„touched provoked movement“* wurde das Überleben der Würmer jeden Tag geprüft; verlorene Würmer, identifiziert z.B. durch das Anhaften dieser an der Innenwand der Glaskapillare beim Umsetzen, wurden als zensierte Würmer notiert und dementsprechend ausgewertet.

2.3.14 Fluoreszenzmikroskopie von *C. elegans*

Zur Mikroskopie von *C. elegans* wurden die Würmer auf Agarosepads überführt. Zur Herstellung der Agarosepads wurden drei Objektträger nebeneinander auf eine ebene Unterlage gelegt und ein Tropfen aufgekochte 5%-ige Agarose auf den mittleren Objektträger gegeben. Unmittelbar nach dem Auftragen des Tropfens wurde ein weiterer bereitliegender Objektträger im 90°-Winkel zu den anderen Objektträgern auf den Agarosetropfen gelegt, so dass eine gleichmäßig dünne Agaroseschicht entstand. Zur Lagerung der Agarosepads und zum Schutz vor Austrocknung wurden diese in eine Styroporbox gelegt, welche durch feuchte Tücher eine hohe Luftfeuchtigkeit in ihrem Inneren besaß.
Unmittelbar vor der Mikroskopie wurde ein Tropfen (ca. 10-15 µl) 20 µM Na-Azid auf das Agarosepad gegeben und die Würmer darin überführt. Durch das Na-Azid wurden die Würmer betäubt, wobei auch Aufnahmen mit längerer Belichtungszeit möglich waren. Nach dem Transfer der Würmer wurde vorsichtig ein Deckglas aufgelegt und die Würmer wurden mikroskopiert (Axiolab [Zeiss]).
Die Aufnahmen wurden mit einer monochromatischen Kamera gemacht (Cool Snap CF Digital Monochrome Camera [Intas]), die über die Software *Image Pro Plus Version 4.5* [MediaCybernetics] gesteuert wurde. In Abhängigkeit vom jeweiligen Versuch wurden unterschiedliche Vergrößerungen sowie Belichtungszeiten verwendet und unterschiedliche Bereiche des Wurms wurden dokumentiert. Details hierzu sind bei den jeweiligen Methoden beschrieben.

2.3.15 Densitometrische Auswertung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Würmer (s. Kap. 2.3.14) wurden mit dem Programm TINA 2.0 [Raytest Isotopenmessgeräte GmbH] densitometrisch ausgewertet. Hierbei wurden verschiedene Parameter, u.a. die Fläche in mm^2 und die optische Dichte (OD) ermittelt. Die gemessene OD ergibt sich aus der Intensität der verschiedenen Graustufen, denen je nach Helligkeit ein bestimmter Wert zugeordnet wurde. Aus diesen beiden Parametern konnte wiederum die OD/mm^2 berechnet werden, um die Fluoreszenzintensität der einzelnen Würmer ermitteln zu können. Jedoch musste zusätzlich die aufgetretene Hintergrundfluoreszenz von den Werten der Würmer herausgerechnet werden, um die erhaltenen Werte nicht zu verfälschen. Dazu

wurde in einem freien Bildausschnitt, in dem kein Wurm lag, eine Fläche markiert, die der ermittelten Fläche des jeweiligen Wurms entsprach und es wurde ebenfalls die OD/mm^2 berechnet. Der so erhaltene Wert wurde als Hintergrundfluoreszenz betrachtet (Background, bkg) und mit dem Wert des entsprechenden Wurms verrechnet. Hieraus ergab sich der Wert (OD-bkg)/mm^2, welcher der alleinigen Fluoreszenz des untersuchten Wurms entsprach. Die Hintergrundfluoreszenz wurde für jede einzelne Aufnahme neu angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen von Catechin und seinen Derivaten auf Parameter der Stressresistenz

Catechin und seine Derivate sind bislang häufig auf protektive Wirkungen gegen viele Arten von Stress in verschiedenen Testsystemen untersucht worden (Frei & Higdon, 2003). Auch in *C. elegans* wurden zum Zeitpunkt der Durchführung der hier beschriebenen Experimente weitere protektive Wirkungen bekannt (Abbas & Wink, 2009). In den nachfolgenden Kapiteln werden die Wirkungen von Catechin und seinen Derivaten in Bezug auf oxidative und thermale Stressresistenz, ROS- und Lipofuszin-Akkumulation in vergleichender Weise beschrieben.

3.1.1 Oxidativer Stress

Um den Einfluss von Catechin und seinen Derivaten auf die Resistenz gegenüber oxidativem Stress zu prüfen, wurden Überlebensexperimente bei künstlich erzeugtem oxidativen Stress durchgeführt. Dazu wurden wildtypische N2-Larven 72 h mit 100 µM des jeweils zu untersuchenden Catechinderivats inkubiert. Oxidativer Stress wurde für 5 h durch den Redoxcycler Juglone induziert (vgl. Kap. 1.2.1). Die verwendete Konzentration des Juglone von 200 µM bedeutet einen letalen Stress für *C. elegans*, den nur etwa die Hälfte der nicht mit den Testsubstanzen behandelten Würmer nach einer 20 h andauernden Regenerationphase überlebten (vgl. Abb. 3.1). Durch mehrmaligen mechanischen Stimulus wurde der Anteil der lebendigen Würmer in den einzelnen Behandlungsgruppen bestimmt.

Es zeigte sich, dass alle getesteten Catechinderivate deutlich protektive Tendenzen gegen oxidativen Stress aufweisen. So erhöhte sich der Anteil der überlebenden Würmer in der mit Catechin behandelten Gruppe auf 66,7 %. In ähnlichem Ausmaß

steigerten EC (66,9 %) und ECG (67,3 %) die Stressresistenz. EGC (63,3 %) und EGCG (61,5 %) zeigten im Vergleich eine etwas geringere protektive Wirkung gegen oxidativen Stress.

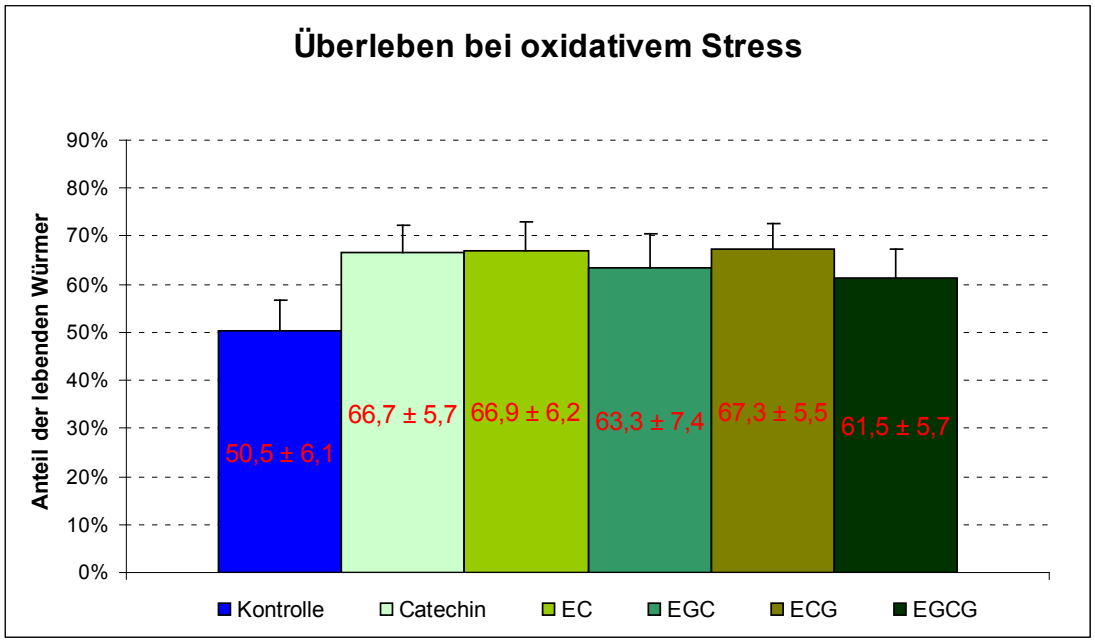


Abb. 3.1: Protektive Tendenzen gegen oxidativen Stress durch Catechin und seine Derivate
Alterssynchronisierte wildtypische L1-Larven wurden für 72 h mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Es wurden die zu L4-Larven gewachsenen Würmer in NGM und 200 µM Juglone für 5 h überführt, um oxidativen Stress zu provozieren. Das Überleben wurde nach 20 h Regeneration durch *„touched provoked movement"* überprüft. (Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n=543-695 pro Behandlungsgruppe in 14 Experimenten.)

3.1.2 Thermaler Stress

Der Einfluss von Catechin und seinen Derivaten auf die Resistenz gegen thermalen Stress wurde durch zwei verschiedene Testsysteme untersucht (s. Kap. 2.3.6). Der s.g. Sytox Green® Assay wurde in einem 384-well-Mikrotiter-Format durchgeführt. Mit Hilfe dieser semiautomatisierten Methode war es mit relativ geringem Zeitaufwand möglich, den Einfluss der Catechine auf die Thermoresistenz einer großen Anzahl von einzelnen Individuen parallel zu untersuchen. Die gemessene Fluoreszenzintensität stellt ein Maß für die Membranschädigung dar. Daher kann man indirekt den Todeszeitpunkt des Wurms bei einem festgelegten Fluoreszenzwert definieren. Dabei zeigte sich, dass EGC, ECG und EGCG die Resistenz gegen thermalen Stress signifikant steigern. In Abb. 3.2.1 sind die mittleren Überlebenszeiten von *C. elegans* aus den Ergebnissen des Sytox Green® Assays dargestellt. Abb. 3.2.2 zeigt die Kaplan Meier Überlebenskurve für EGC, ECG und EGCG.

Während die Kontrollgruppe den letalen Stress von 37 °C im Mittel etwa sechs Stunden überlebte, konnte die mittlere Überlebenszeit durch ECG um mehr als eine Stunde gesteigert werden, was einem Zuwachs von 17,2 % entspricht. Auch EGC und EGCG steigerten die mittlere Überlebenszeit signifikant. Catechin und EC zeigten in dieser Untersuchungsmethode keine protektiven Wirkungen gegen thermalen Stress und sind daher aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abb. 3.2.2 nicht dargestellt.

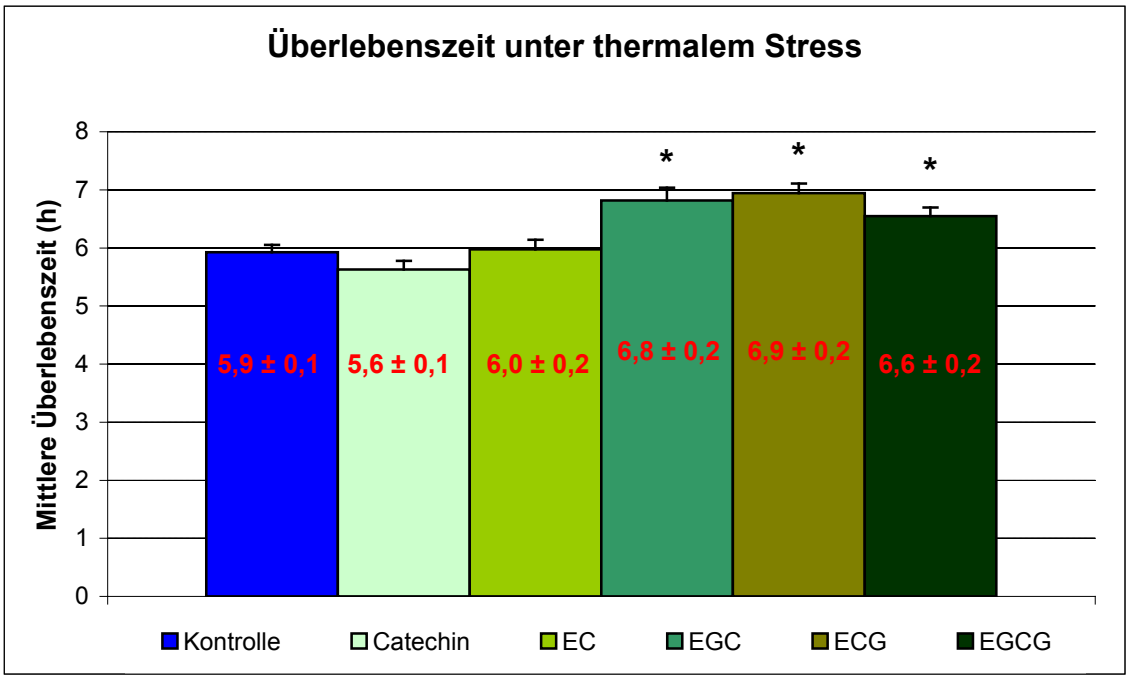


Abb. 3.2.1: EGC, ECG and EGCG steigern die Resistenz gegen thermalen Stress
Alterssynchronisierte wildtypische L4-Larven wurden für 48 h mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Der Todeszeitpunkt der einzelnen Würmer bei der letalen Temperatur von 37°C wurde durch eine auf Fluoreszenz basierende Methode (SYTOX Green®) definiert. (Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n=108-112 pro Behandlungsgruppe in 7 Experimenten; *, p<0,001, Kaplan-Meier-Überlebensanalyse mit *log rank*)

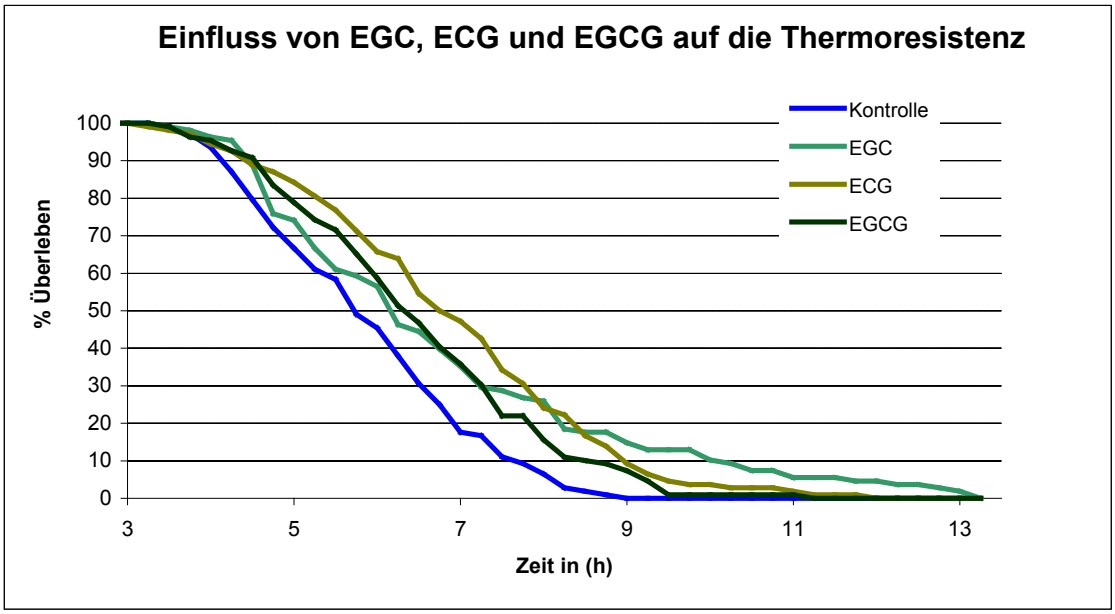


Abb. 3.2.2: EGC, ECG and EGCG steigern die Resitenz gegen thermalen Stress
Kaplan-Meier-Überlebenskurve; Versuchsbeschreibung siehe Abb. 3.2.1.

Da die Abschätzung des individuellen Todeszeitpunkts der Würmer im Sytox Green® Assay auf der Messung eines Surrogat-Markers (Fluoreszenzzunahme) beruhte, wurden die Ergebnisse dieses Experiments durch eine manuelle Bestimmung des Todeszeitpunkts der Würmer unter vergleichbaren Bedingungen untersucht. Hierzu wurden behandelte Würmer für 5 h bei 37 °C thermalem Stress ausgesetzt und 20 h zur Regeneration belassen. In Abb. 3.3 sind die Mittelwerte des Prozentsatzes an überlebenden Würmern dargestellt.

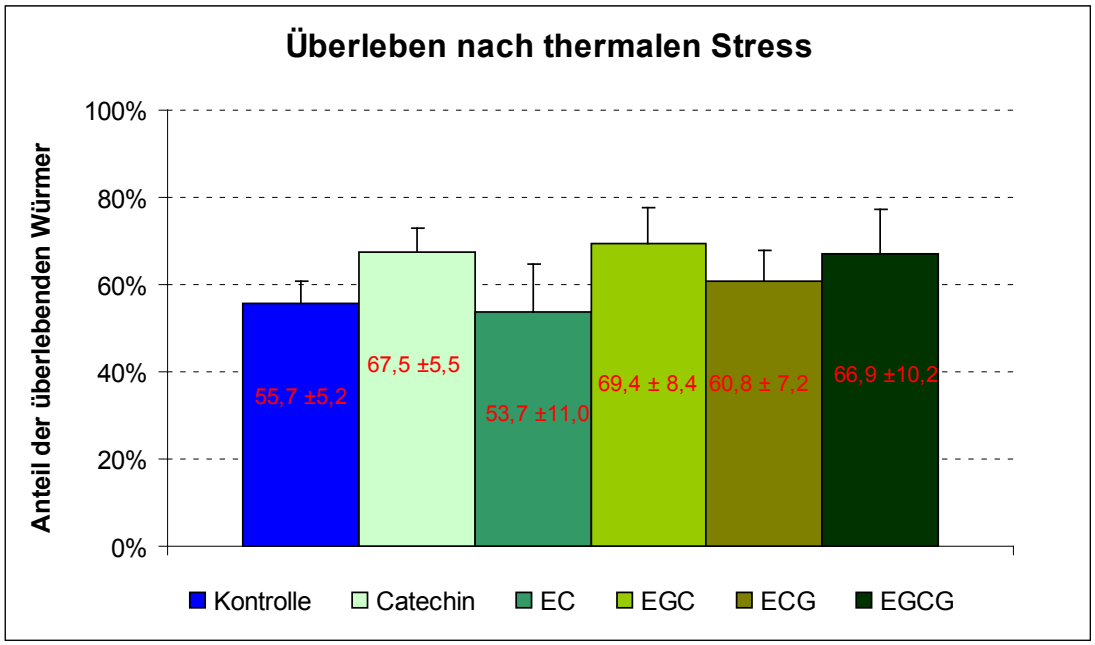


Abb. 3.3: Manuelle Untersuchung der Resistenz gegen thermalen Stress
Alterssynchronisierte wildtypische L4-Larven wurden für 48 h mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids in flüssigem Kulturmedium inkubiert, bevor sie für die fünfstündige Hitzebehandlung bei 37°C auf Festmediumplatten überführt wurden. Danach erfolgte eine 20 h-Regenerationsphase bei 20°C. (angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n=505-629 pro Behandlungsgruppe in 11 Experimenten)

Hierbei zeigten sich ebenfalls protektive Tendenzen für EGC und EGCG. EC zeigte wie auch im Sytox Green Assay keine Beeinflussung der Thermoresistenz. Bei Catechin zeigte sich im Unterschied zum Sytox Green Assay eine tendenziell erhöhte Schutzwirkung gegen thermalen Stress. Die gezeigte protektive Wirkung von ECG im Sytox Green Assay fiel in der manuellen Untersuchung deutlich geringer aus.

3.1.3 Akkumulation radikaler Sauerstoffspezies

Es konnte gezeigt werden, dass einige der Catechinderivate die Resistenz gegen oxidativen und thermalen Stress erhöhen. Das zur künstlichen Erzeugung von oxidativem Stress eingesetzte Juglone führt zu einer intrazellulären Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Auch bei thermalem Stress wird die intrazelluläre Konzentration an ROS erhöht (Finkel & Holbrook, 2000). Weiterhin ist publiziert, dass die untersuchten Flavonoide die Fähigkeit aufweisen, in zellfreien Systemen Radikale abzufangen (Rice-Evans et al., 1996). Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob die Catechinderivate die intrazelluläre Akkumulation von ROS beeinflussen können und auf diese Weise zu der beobachteten Erhöhung der Stressresistenz führen.
Die Messung der intrazellulären ROS-Menge wurde mit der Fluoreszenssonde H_2DCF-DA im 384-well Mikrotiter-Format durchgeführt, so dass eine hohe Durchsatzrate möglich wurde. Um eine detektierbare Menge an ROS zu erzeugen, wurde das Experiment nach Inkubation mit den Catechinderivaten bei 37 °C im Flüssigmedium durchgeführt.

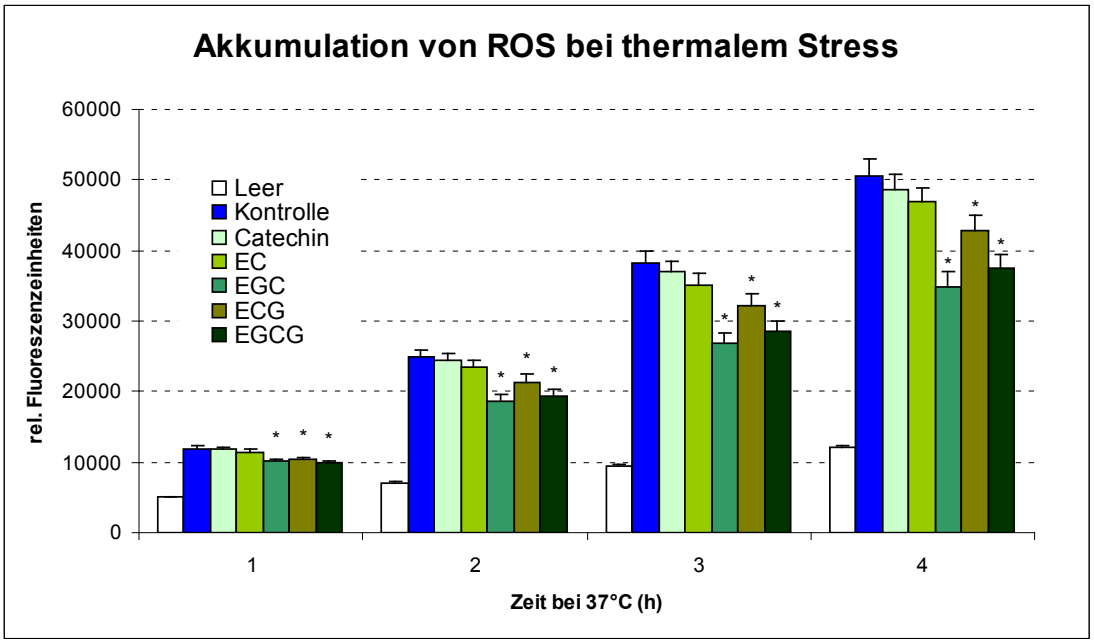


Abb. 3.4: EGC, ECG and EGCG verringern die ROS-Akkumulation bei thermalem Stress
Alterssynchronisierte wildtypische L4-Larven wurden für 48 h mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Nach dem Transfer der Würmer auf eine Mikrotiterplatte wurde H_2DCF-DA in einer endgültigen Konzentration von 50 µM hinzugefügt. Die Fluoreszenzintensität wurde in einheitlichen Zeitabständen bei Hitzestress gemessen. (angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n=68-78 in 5 Experimenten;*, p<0,05, *Kruskal Wallis*)

Abb. 3.4 stellt dar, dass EGC, ECG und EGCG die intrazelluläre ROS-Menge über den gesamten Messzeitraums signifikant verringern. Tabelle 3.1 zeigt die Werte der relativen Fluoreszenzeinheiten und die jeweiligen prozentualen Abweichungungen zur Kontrolle. Die höchste Reduktion der Fluoreszenzintesität (31,1 %) und damit der intrazellulären ROS-Akkumulation wurde durch EGC nach 4 h Hitzestress erreicht.

Zeit bei 37 °C	1 h	2 h	3 h	4 h
Leer	4987 ± 58	7037 ± 124	9504 ± 187	12173 ± 249
Kontrolle	11903 ± 387	24834 ± 1059	38160 ± 1710	50657 ± 2249
Catechin	11812 ± 380	24397 ± 1014	36965 ± 1618	48692 ± 2096
prozentuale Abweichung zu Kontrolle	0,8	1,8	3,1	3,9
EC	11487 ± 460	23379 ± 1077	35180 ± 1617	46838 ± 2115
prozentuale Abweichung zu Kontrolle	3,5	5,9	7,8	7,5
EGC	10081 ± 363	18562 ± 946	26846 ± 1491	34926 ± 1998
prozentuale Abweichung zu Kontrolle	15,3*	25,3*	29,7*	31,1*
ECG	10331 ± 369	21386 ± 1067	32208 ± 1688	42852 ± 2262
prozentuale Abweichung zu Kontrolle	13,2*	13,9*	15,6*	15,4*
EGCG	9874 ± 323	19315 ± 889	28533 ± 1375	37553 ± 1784
prozentuale Abweichung zu Kontrolle	17,0*	22,2*	25,2*	25,9*

Tab. 3.1: EGC, ECG and EGCG verringern die ROS-Akkumulation bei thermalem Stress
Versuchsbeschreibung siehe Abb. 3.4. (angegeben sind die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzeinheiten ± SEM, n=68-78 in 5 Experimenten;*, $p<0,05$, *Kruskal Wallis*)

3.1.4 Akkumulation von Lipofuszin

Lipofuszin wird durch oxidativ geschädigte Makromoleküle gebildet und stellt bei *C. elegans* einen etablierten Marker für das Altern dar (Klass et al. 1977, Garigan et al., 2002, Gerstbrein et al., 2005). Da zuvor gezeigt wurde, dass einige Catechinderivate die Stressresistenz erhöhen und die intrazelluläre ROS-Akkumulation verringern, sollte untersucht werden, ob auch dieser Parameter durch diese Substanzen beeinflusst werden kann. Dazu wurden L4-Larven für 72 h mit dem jeweils zu testenden Catechinderivat inkubiert. Nach 24 h in flavonoidfreiem Medium erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie mit densitometrischer Auswertung der

Lipofuszinfluoreszenz. In Abb. 3.5 sind die Mittelwerte der relativen Lipofuszinakkumulation (Kontrolle = 100 %) dargestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Catechine die Akkumulation von Lipofuszin in ähnlichem Maße signifikant verringern.

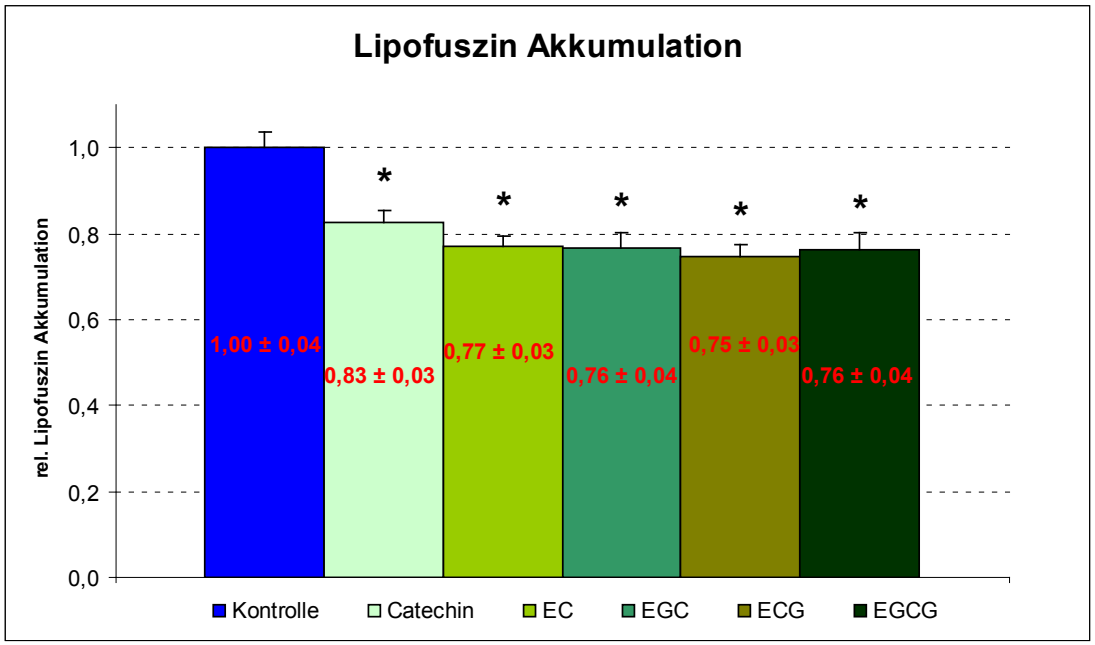


Abb. 3.5.: Alle getesteten Flavonoide verringern die Akkumulation des Alterspigment Lipofuszin.
Alterssynchronisierte wildtypische L4-Larven wurden für 72 h mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids in flüssigem Kulturmedium inkubiert und danach 24 h in flavonoidfreiem Medium belassen. Die Lipofuszinfluoreszenz der sieben Tage alten Würmer wurde durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert und densitometrisch ausgewertet. (angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n=101-110 in 10 Experimenten;*, $p<0.05$, *oneway ANOVA with Tamhane post hoc test*)

Behandlung	Mittlere Fluoreszenz bei λ= 510 nm (od-Bkg/mm²) ± SEM	Anzahl der untersuchten Würmer	Veränderung zur Kontrolle
Kontrolle	247,4 ± 8,7	102	
Catechin	204,3 ± 7,4	102	0,83*
EC	190,3 ± 6,4	101	0,77*
EGC	189,1 ± 9,4	109	0,76*
ECG	184,6 ± 6,6	110	0,75*
EGCG	188,7 ± 9,5	101	0,76*

Tab. 3.2: Alle getesteten Flavonoide verringern die Akkumulation des Alterspigment Lipofuszin.
Versuchsbeschreibung siehe Abb. 3.5.

3.2 Einfluss von Catechin und seinen Derivaten auf die subzelluläre Lokalisation von ausgewählten Transkriptionsfaktoren

In Kapitel 3.1 konnte gezeigt werden, dass Catechin und seine Derivate protektive Eigenschaften im Bezug auf Stressresistenz sowie ROS- und Lipofuszinakkumulation haben, ohne dass der *in vivo*-Mechanismus dieser Wirkung bekannt ist: denkbar ist eine direkte radikalfangende Aktivität der Testsubstanzen sowie eine Modulation von zellulären Signalwegen, die dann jeweils zu den beobachteten Phänomenen führen.
Die Transkriptionsfaktoren DAF-16 und SKN-1 sind zentrale Effektoren verschiedener Signalwege (Kapitel 1.3.2) in *C. elegans*, die u.a. zelluläre Abwehrmechanismen bei Stressbedingungen steuern. Über ihre subzelluläre Lokalisation lassen sich Aussagen auf ihren Aktivitätsstatus rückschliessen. Es wurde daher untersucht, ob die Behandlung mit den Catechinderivaten die Lokalisation der Transkriptionsfaktoren innerhalb der Zellen verändert.

3.2.1 DAF- 16 Lokalisation

Bei Aktivierung des Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalwegs wird der Transkriptionsfaktor DAF-16 durch Kinasen phosphoryliert und dadurch im Zytosol zurückgehalten. DAF-16 ist damit inaktiv und kann keine transkriptionsaktivierende Funktion ausüben. Ist der Insulin/IGF-1 ähnliche Signalweg durch fehlende Ligandenbindung oder Inhibition inaktiv, wird DAF-16 nicht phosphoryliert sondern transloziert in den Zellkern, wo er die Transkription seiner Zielgene induziert. DAF-16 stellt ein Ortholog zum humanen FoxO Transkriptionsfaktor dar. Die Zielgene, unter anderem SOD-3, bewirken eine erhöhte Stressresistenz und eine verlängerte Lebensdauer (Baumeister et al., 2006).
Der Einfluss der Catechine auf die Lokalisation von DAF-16 wurde unter normalen Kulturbedingungen untersucht. Nach der Flavonoidinkubation wurden die Würmer des transgenen Stammes TJ356 [DAF-16::GFP] im Fluoreszenzmikroskop aufgesucht und wie in Kapitel 2.3.9 beschrieben, kategorisiert. Abb. 3.6 zeigt Beispiele der Fluoreszenzmikroskopie von TJ356.

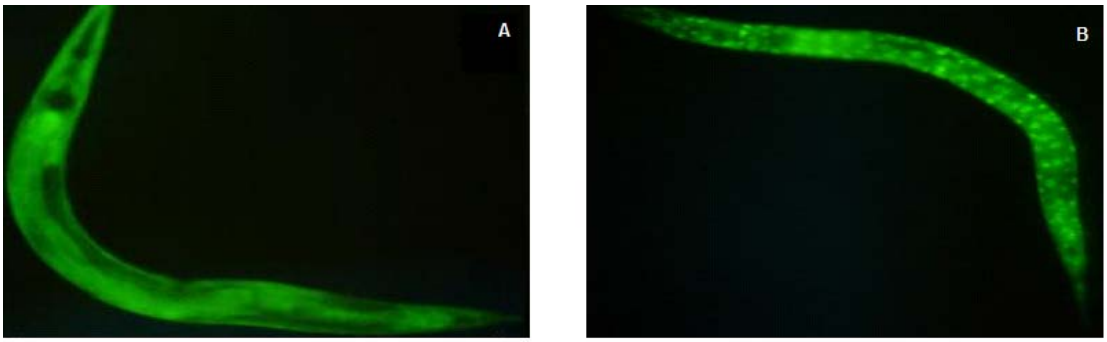


Abb. 3.6: Lokalisation von DAF-16 in DAF-16::GFP exprimierenden Würmern
Die Abbildungen A, B zeigen einen Wurm des Stammes TJ356 [DAF-16::GFP] bei 400-facher Vergrößerung (Exzitation: 546 nm; Emission: 580 nm). A: zytosolische Lokalisation von DAF-16; B: nukleäre Lokalisation von DAF-16.

Es zeigte sich, dass alle untersuchten Catechine DAF-16 in den Kern translozieren (Abb. 3.7). Dabei war der Anteil der Würmer mit nukleärer Lokalisation bei den mit ECG behandelten Würmern mit 68 % am höchsten. Nach Inkubation der Würmer in EC haltigem Medium zeigten sie die im Vergleich niedrigste Fraktion an nukleär kassifizierten Würmern.

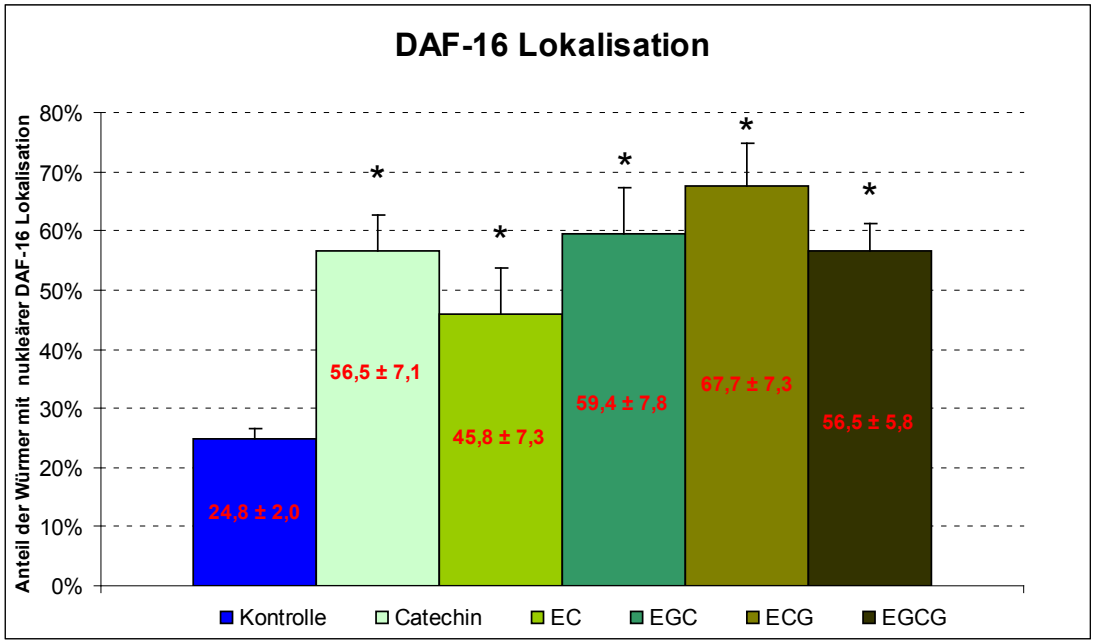


Abb. 3.7: Alle getesteten Flavonoide führen zu einer Translokation von DAF-16 in den Kern.
Alterssynchronisierte Larven des Stammes TJ356 [DAF-16::GFP] wurden für 72 h mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids oder 0,1 % des Lösungsmittels DMSO bei 20 °C in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Die subzelluläre Lokalisation von DAF-16 wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und in die in Tab 2.3 beschriebenen Kriterien eingeteilt. Angegeben sind die Fraktionen der als nukleär eingeteilten Würmer. (Mittelwerte ± SEM, n=251-401 in 7 Experimenten;*, $p<0.05$ *oneway ANOVA with LSD post hoc test*)

3.2.2 SKN-1 Lokalisation unter oxidativem Stress

Der Transkriptionsfaktor SKN-1 ist das Ortholog von Nrf-2 im Säuger. Er schützt ebenfalls vor oxidativem Stress, v.a. durch Aktivierung des evolutionär stark konservierten Phase II Metabolismus (Tullet et al., 2008). Auch dieser Transkriptionsfaktor wird negativ durch den Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalweg reguliert. Im nicht phosphorylierten Zustand liegt SKN-1 inaktiv im Zytosol vor. SKN-1 wird durch die PMK-1, dem *C. elegans*- Ortholog der humanen Kinase p38, aktiviert und in Folge dessen in den Nukleus transloziert. Bei oxidativem Stress wird dieser Signalweg ebenfalls aktiviert und entsprechend SKN-1 in den Zellkern verlagert.

Um den Einfluss von Catechin und seinen Derivaten auf die subzelluläre Lokalisation dieses Transkriptionsfaktors zu untersuchen, wurde der transgene Stamm LD001 benutzt, der ein Fusionprodukt von SKN-1 und GFP exprimiert. Allerdings konnte die Fluoreszenz dieses Fusionsproduktes nur bei oxidativer Belastung von *C. elegans* beurteilt werden, da erst unter diesen Bedingungen fluoreszente Kerne sichtbar wurden und die Würmer je nach Muster in die Gruppe *„low“*, *„medium“* oder *„high“* klassifiziert werden konnten (s. Kap. 2.3.11, Tab. 2.4). Abb. 3.8 zeigt Beispiele der Fluoreszenzmikroskopie des Stamms LD001. Die Gruppen *„medium“* und *„high“* wurden als „nukleäre“ Gruppe zusammengefasst.

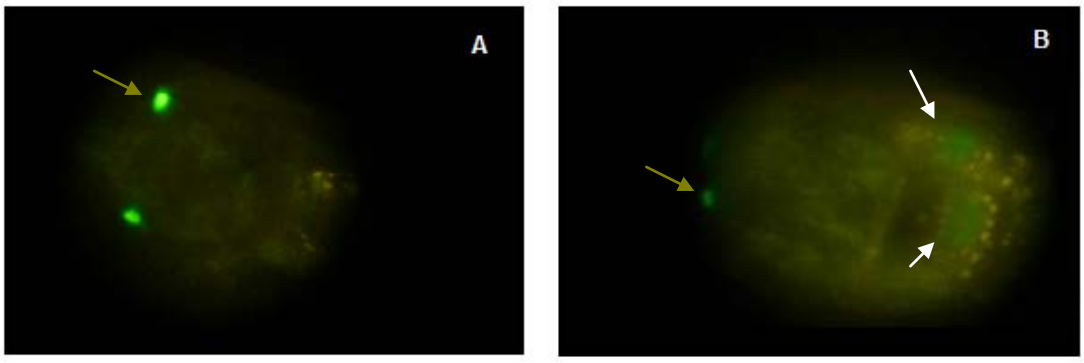


Abb. 3.8: Lokalisationen von SKN-1 in SKN-1::GFP exprimierenden *C. elegans*
Die Abbildungen A, B zeigen den vordern Darmabschnitt hinter dem Pharynxbereich des Stamms LD001 [SKN-1::GFP] bei 1000-facher Vergrößerung (Exzitation: 546 nm; Emission: 580 nm). Die grünen Pfeile deuten auf die ASI-Neurone, die die Orientierung in *C. elegans* erleichtern. A: *Low* klassifizierter Wurm. B: *High* klassifizierter Wurm. Die weißen Pfeile kennzeichnen die Zellkerne.

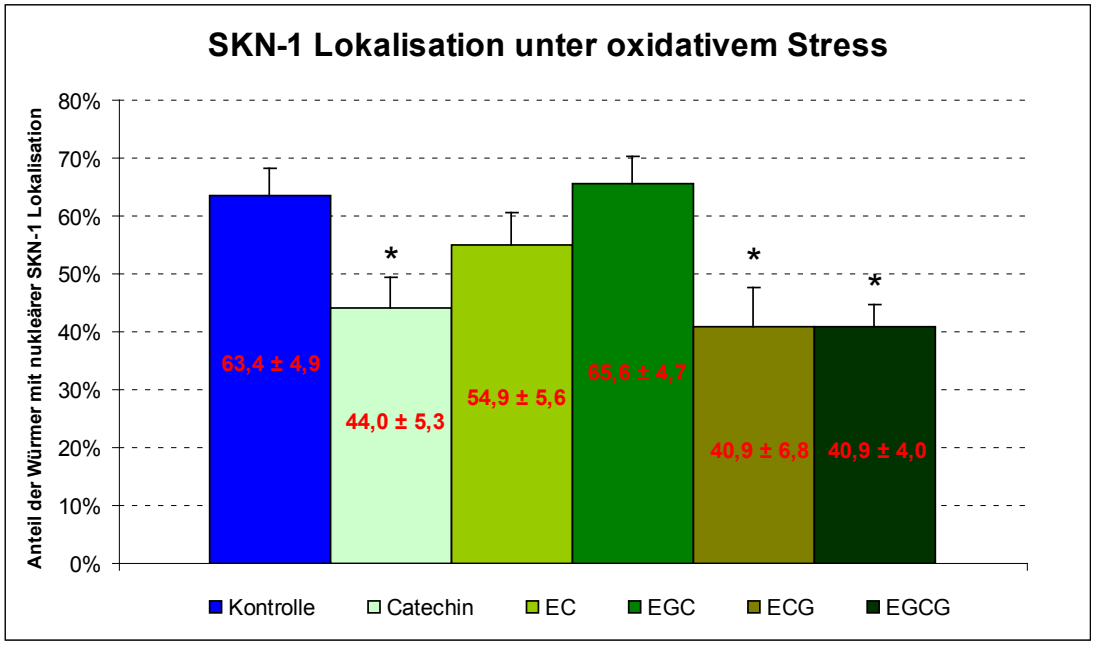


Abb. 3.9: Catechin, ECG und EGCG verringern den Anteil der Kernlokalisation von SKN-1 unter oxidativem Stress.
Alterssynchronisierte Larven des Stammes LD001 [SKN-1::GFP] wurden für 72 h mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids oder 0,1 % des Lösungsmittels DMSO bei 20°C in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Die subzelluläre Lokalisation von SKN-1 wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop nach einer Stunde oxidativem Stress durch 175 µM Juglone beobachtet und in die in Tab 2.4 beschriebenen Kriterien eingeteilt. Angegeben sind die zusammengefassten Fraktionen der als *medium* und *high* eingeteilten Würmer. (Mittelwerte ± SEM, n=192-204 in 7 Experimenten; *, $p<0.05$ *oneway ANOVA with LSD post hoc test*)

Abb. 3.9 zeigt, dass Catechin, ECG und EGCG die physiologische Verschiebung von SKN-1 unter Stress in den Zellkern signifikant verringern. Während sich in der Kontrollgruppe 63,4 % der Würmer sichtbare Zellkerne zeigten, wurden in der ECG und EGCG behandelten Gruppe nur 40,9 % der Würmer in die Klassifikation *„medium“* oder *„high“* eingeteilt. Auch die Behandlung mit Catechin senkte den Anteil nukleär klassifizierter Würmer signifikant (44,0 %). EC und EGC hatten keinen signifikanten Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von SKN-1 unter oxidativem Stress. Die Zusammenführung der Gruppen *„medium“* und *„high“* stellte die Unterschiede im Lokalisationsmuster zwischen behandelten und unbehandelten Würmern stärker heraus.

3.3 Einfluss von Catechin und seinen Derivaten auf die Expression von Zielgenen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Catechine Einfluss auf subzelluläre Lokalisation der Transkriptionsfaktoren DAF-16 und SKN-1 haben (vgl. Kap. 3.2), sollte nun untersucht werden, ob Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren ebenfalls beeinflusst werden. Daher wurden Untersuchungen des Einflusses von Catechin und seinen Derivaten zur Expression der Zielgene SOD-3 (DAF-16) und GST-4 (SKN-1) durchgeführt.

3.3.1 Expression der SOD-3

Die mitochondriale manganhaltige SOD (SOD-3) stellt ein wichtiges antioxidatives Enzym dar. Sie katalysiert die Disproportionierung von zwei Superoxidradikalen zu O_2 und H_2O_2, was einen zellulären Weg darstellt, oxidative Belastung enzymatisch abzubauen (vgl. Kap. 1.2.3). Die Expression der SOD-3 wurde in *C. elegans* mit Hilfe des transgenen Stammes CF1553 untersucht, welcher ein Fusionsprodukt der SOD-3 mit GFP exprimiert. Dazu wurden mit den zu testenden Catechinderivaten behandelte Würmer fluoreszenzmikroskopiert und die Fluoreszenzintensität densitometrisch ausgewertet. In Abb. 3.10 ist die durch das transgene SOD-3 vermittelte Fluoreszenz der behandelten Wurmpopulationen relativ zur Kontrolle dargestellt. Dabei konnte eine Zunahme der SOD-3-Expression durch die Inkubation mit Catechin, EGC, ECG und EGCG nachgewiesen werden. EGC und ECG zeigten die stärkste Fluoreszenzzunahme von 34 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Ergebnisse korrelieren mit der erhöhten Kernlokalisation von DAF-16 durch diese Catechinderivate (vgl. Kap. 3.2.1). EC verstärkte die Expression der SOD-3 nicht, obwohl die Behandlung mit EC ebenfalls zu einer wenn auch im Vergleich zu den anderen Catechinderivaten niedrigsten Translokation von DAF-16 in den Kern führte (s. Abb. 3.6).

Behandlung	Mittlere transgene SOD-3 Expression (OD-Bkg/mm²) ± SEM	Anzahl der untersuchten Würmer	Veränderung zur Kontrolle
Kontrolle	31,2 ± 1,1	103	
Catechin	39,0 ± 2,0	101	1.25*
EC	26,7 ± 1,1	102	0.85
EGC	41,8 ±1,8	101	1.34*
ECG	41,9 ± 1,7	102	1.34*
EGCG	39,7 ± 1,7	102	1.27*

Tab. 3.3: Catechin, EGC, ECG und EGCG erhöhen die Expression der SOD-3.
Versuchsbeschreibung siehe Abb. 3.10

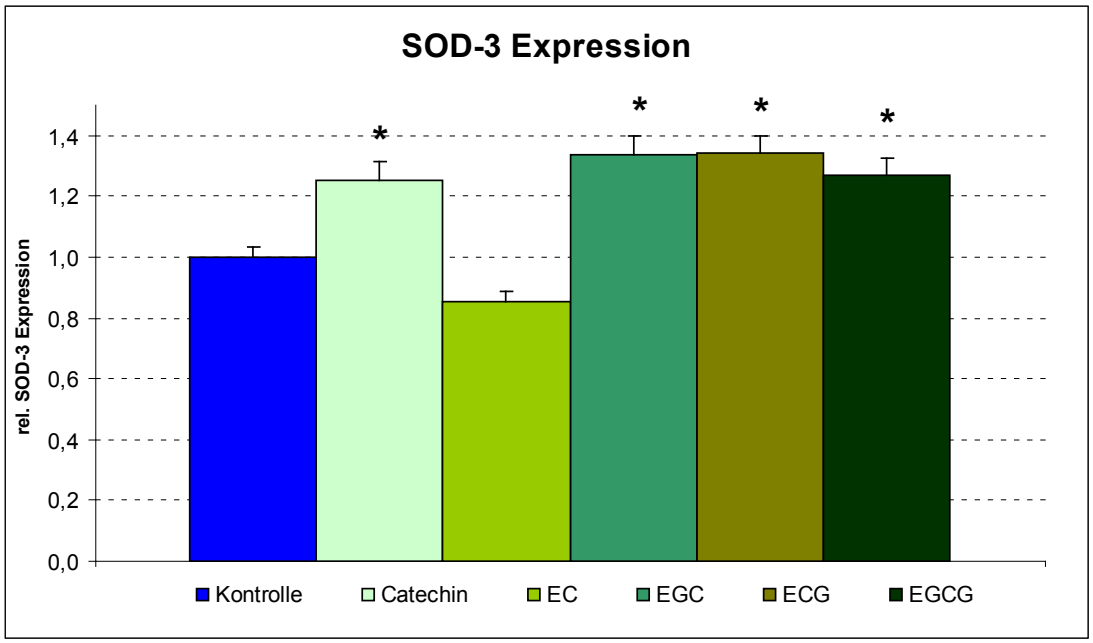


Abb. 3.10: Catechin, EGC, ECG und EGCG erhöhen die Expression der SOD-3.
Alterssynchronisierte Larven des Stammes CF1553 [SOD-3::GFP] wurden für 72 h mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids oder 0,1 % des Lösungsmittels DMSO bei 20°C in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Die Fluoreszenzintensität der drei Tage alten Würmer wurde durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert und densitometrisch ausgewertet. (angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n=101-103 in 7 Experimenten; *, $p<0.05$, *oneway ANOVA mit Tamhane post hoc test*)

3.3.2 Expression der GST-4

Für die Glutathion S-Transferase-4 (GST-4) aus *C. elegans* ist eine Induktion der Expression nach Exposition der Würmer gegenüber oxidativem Stress festgestellt worden (Tawe et al., 1998). Ebenfalls konnte mit Hilfe des transgenen Stammes BL1 [GST-4::GFP] eine Zunahme der Expression der GST-4 vor allem im Pharynxbereich des Wurmes nach intrazellulärer Stressgeneration durch Juglone bereits beschrieben werden (Leiers et al., 2003). Die Glutathion S-Transferase ist im Säuger ein wichtiges Enzym des Phase II Metabolismus, wobei sie Konjugationsreaktionen von zu entgiftenden Stoffen, häufig aromatische Kohlenwasserstoffe, mit Glutathion katalysiert. Die GST-4 ist ein Zielgen des Transkriptionsfaktors SKN-1.

Es wurde die Wirkung von Catechin und seinen Derivaten auf die Expression dieses Enzyms nach oxidativem Stress und unter Normalbedingungen im Stamm BL1 untersucht. Um oxidativen Stress zu generieren, wurden mit dem jeweils zu testenden Catechinderivat oder der DMSO Kontrolle vorinkubierte Würmer 20 h mit 45 µM des

Redoxcyclers Juglone behandelt. Dadurch wurde die GST-4 stark exprimiert (s. Abb. 3.11 A und B).

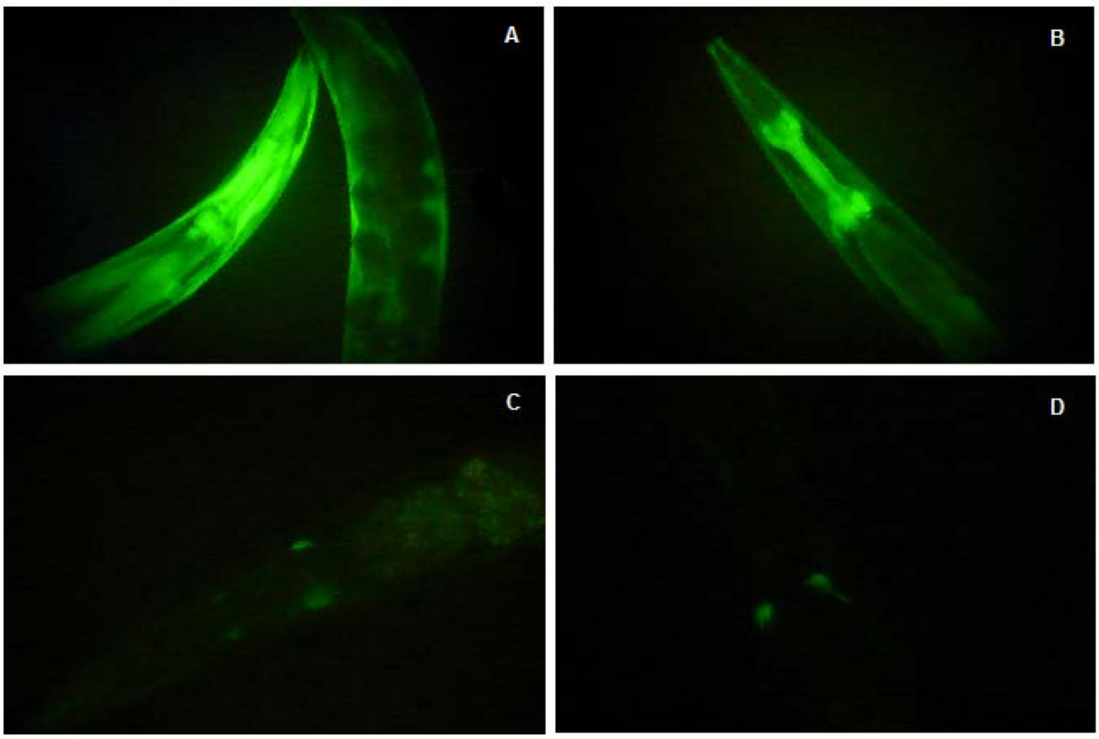


Abb. 3.11: Expression der GST-4 im transgenen Stammes BL1 [GST-4::GFP]
Mikroskopische Aufnahmen des Pharynxbereich des Stammes BL1 [GST-4::GFP] mit verschiedenen Expressionsmustern der GST-4 bei 1000-facher Vergrößerung (Exzitation: 546 nm; Emission: 580 nm).
A-B: Expression der GST-4 nach oxidativem Stress durch Juglone, C-D: Expression der GST-4 unter Normalbedingungen; A und C: hohe GST-4 Expression, B und D: niedrige GST-4 Expression

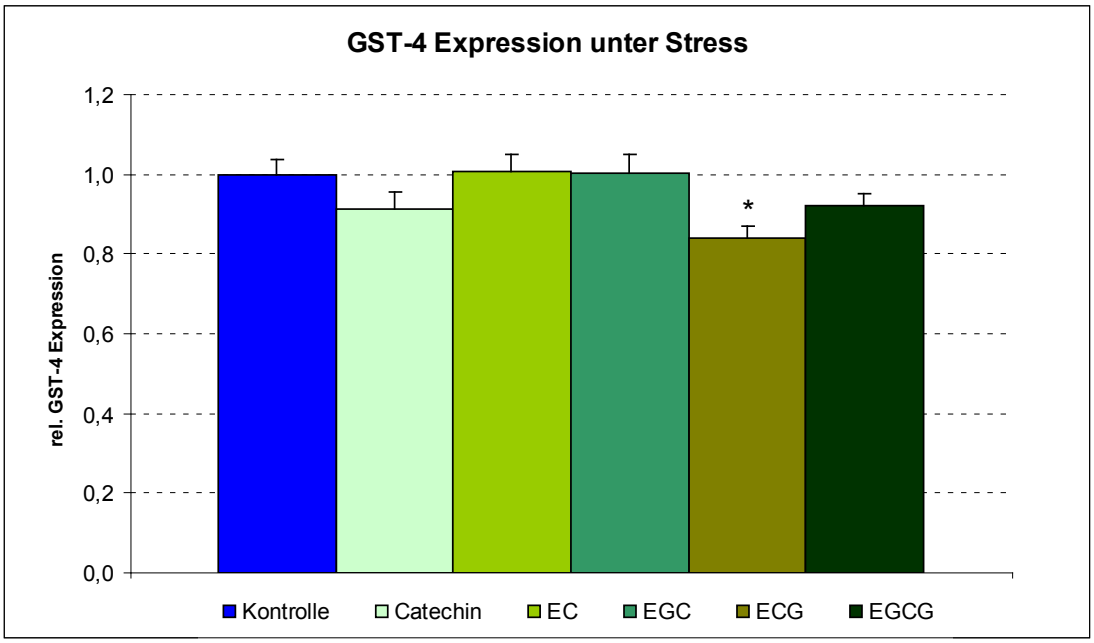


Abb. 3.12: ECG erniedrigt die GST-4 Expression unter Stress.
Alterssynchronisierte L4-Larven des Stammes BL1 [GST-4::GFP] wurden für 48 h mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids oder 0,1 % des Lösungsmittels DMSO bei 20°C in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Die fünf Tage alten Würmer wurden für 20 h durch 45 µM Julone in NGM oxidativem Stress ausgesetzt. Die

Fluoreszenzintensität in der Pharynxregion wurde durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert und densitometrisch ausgewertet. (angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n=63-86 in 4 Experimenten; *, p<0.05, *oneway ANOVA* mit *Bonferroni post hoc test*)

Behandlung	Mittlere transgene GST-4 Expression (od-Bkg/mm²) ± SEM	Anzahl der untersuchten Würmer	Veränderung zur Kontrolle
Kontrolle	691,1 ± 26,8	64	
Catechin	629,5 ± 29,9	63	0,91
EC	697,4 ± 29,7	79	1,01
EGC	693,8 ± 31,9	65	1,00
ECG	580,3 ± 20,6	77	0,84*
EGCG	636,7 ± 21,7	86	0,92

Tab. 3.4: ECG erniedrigt die GST-4 Expression unter Stress.
Versuchsbeschreibung siehe Abb. 3.12.

Es zeigte sich, dass ECG die Induktion der GST-4 durch oxidativen Stress signifkant hemmt (vgl. Abb. 3.12). Die Expression dieses Proteins im Pharynxbereich wurde um 16% im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Für Catechin und EGCG zeigte sich eine tendentielle, wenn auch nicht signifikante Hemmung der transgenen GST-4 Expression. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen zur SKN-1-Lokalisation in *C. elegans*, da diese drei Substanzen die Translokation von SKN-1 in den Kern unter Stress verminderten (vgl. Kap. 3.2.2).

Unter Normalbedingungen zeigten die Würmer eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität (Abb. 3.12 C und D). Die Vorinkubation mit allen getesteten Catechinderivaten führte zu einer signifikanten Senkung der transgenen GST-4 Expression im Pharynxbereich (Abb. 3.13). So wurde unter normalen Kulturbedingungen die Expression durch EGCG am stärksten um 45 % erniedrigt. Interessanterweise fiel die Verminderung der GST-4-Expression durch ECG, das als einziges Catechinderivat die Expression der GST-4 unter Stress signifikant verringern konnte, am geringsten aus.

Behandlung	Mittlere transgene GST-4 Expression (od-Bkg/mm²) ± SEM	Anzahl der untersuchten Würmer	Veränderung zur Kontrolle
Kontrolle	68,8 ± 2,1	50	
Catechin	45,7 ± 2,0	54	0,66*
EC	45,8 ± 2,3	53	0,67*
EGC	50,3 ± 2,3	59	0,73*
ECG	57,3 ± 2,4	57	0,83*
EGCG	38,1 ± 2,2	50	0,55*

Tab. 3.5: Alle getesteten Catechinderivaten erniedrigen die GST-4 Expression
Versuchsbeschreibung siehe Abb. 3.13.

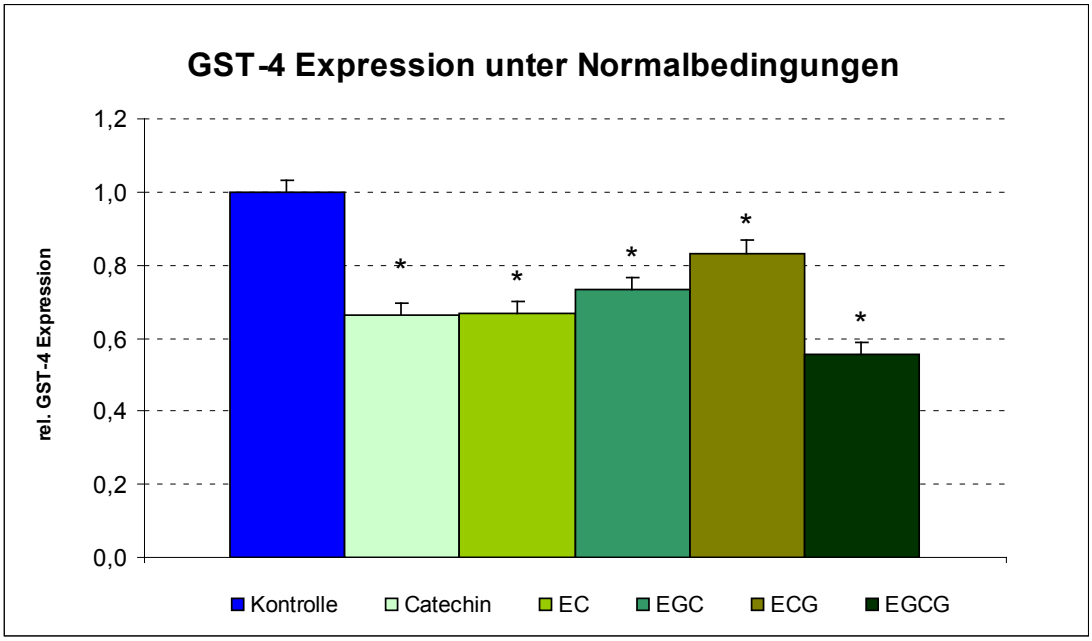


Abb. 3.13: Alle getesteten Catechinderivaten erniedrigen die GST-4 Expression
Alterssynchronisierte L4-Larven des Stammes [BL1::GFP] wurden für 48 h mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids oder 0,1% des Lösungsmittels DMSO bei 20°C in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Die fünf Tage alten Würmer wurden für 20 h in NGM belassen. Die Fluoreszenzintensität in der Pharynxregion wurde durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert und densitometrisch ausgewertet. (angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n=50-59 in 3 Experimenten; *, $p<0.05$, *oneway ANOVA* mit *Bonferroni post hoc test*)

3.4 Untersuchungen zur Lebensspanne

In vielen Studien zur Alterung korreliert eine erhöhte Resistenz gegen oxidativen und thermalen Stress mit einer verlängerten Lebensspanne (Finkel & Holbrook, 2000). In Kap. 3.1 zeigen die Ergebnisse vor allem für EGC, ECG und EGCG Hinweise auf eine erhöhte Stressresistenz in *C. elegans.* Verlängert eine Substanz das Leben eines Testorganismus, gilt dies als weitaus wichtigster Parameter zur Beschreibung protektiver Wirkungen dieser Substanz. Um diesen aussagekräftigen Endpunkt zu untersuchen, wurden Lebensspanneexperimente unter Normalbedingungen durchgeführt. In den RNAi Ansätzen wurden die Ergebnisse unter Normalbedingung auf Reproduzierbarkeit geprüft und weiterhin untersucht, inwiefern sich die gefundenen Daten bei RNAi-Degradierung von den Transkriptionsfaktoren DAF-16 und SKN-1 verändern.

3.4.1 Lebensspanneuntersuchungen unter normalen Bedingungen

In den bisherigen Experimenten wurde der Einfluss von Catechin und seinen Derivaten auf die Stressresistenz, unterschiedliche Marker für oxidativen Stress und oxidative Schädigung sowie auf zwei relevante Transkriptionsfaktoren und ihre Zielgene untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Testsubstanzen teilweise sehr deutliche Effekte hervorrufen. Diese Ergebnisse führten zur der Frage, ob die untersuchten Flavonoide auch die Lebensspanne von *C. elegans* beeinflussen können.
Permanent mit den Testsubstanzen inkubierte wildtypische Würmer wurden zur Beantwortung dieser Frage über ihre gesamte Lebensdauer regelmäßig auf ihr Überleben bei normalen Kulturbedingungen (20°C) in Flüssigmedium überprüft.
Alle untersuchten Catechinderivate verlängerten die Lebensspanne von *C. elegans* (vgl. Abb. 3.14). Durch kontinuierliche Behandlung mit EGCG stieg die mittlere Lebensspanne im Vergleich zur Kontrolle von etwa 30 Tagen auf mehr als 36 an. Dies stellt eine Steigerung von 20 % dar. In etwas geringerem Ausmaß steigerten ebenfalls EC, EGC und ECG die mittlere Lebensdauer. In allen unabhängigen Versuchen wurde die Lebensspanne von *C. elegans* durch die jeweiligen Derivate positiv beeinflusst (vgl. Tab. 3.5).

Büchter (2008) untersuchte den Einfluss von Catechin auf die Lebensspanne von *C. elegans* unter vergleichbaren Bedingungen. In vier unabhängigen Versuchsreihen zeigte sich bei sehr ähnlicher Überlebenszeit der Kontrollgruppe eine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit durch Catechin um mehr als sechs Tage was einer Steigerung von 21 % entspricht. Die Ergebnisse für Catechin sind in Tab 3.6 zum Vergleich ebenfalls mit aufgeführt.

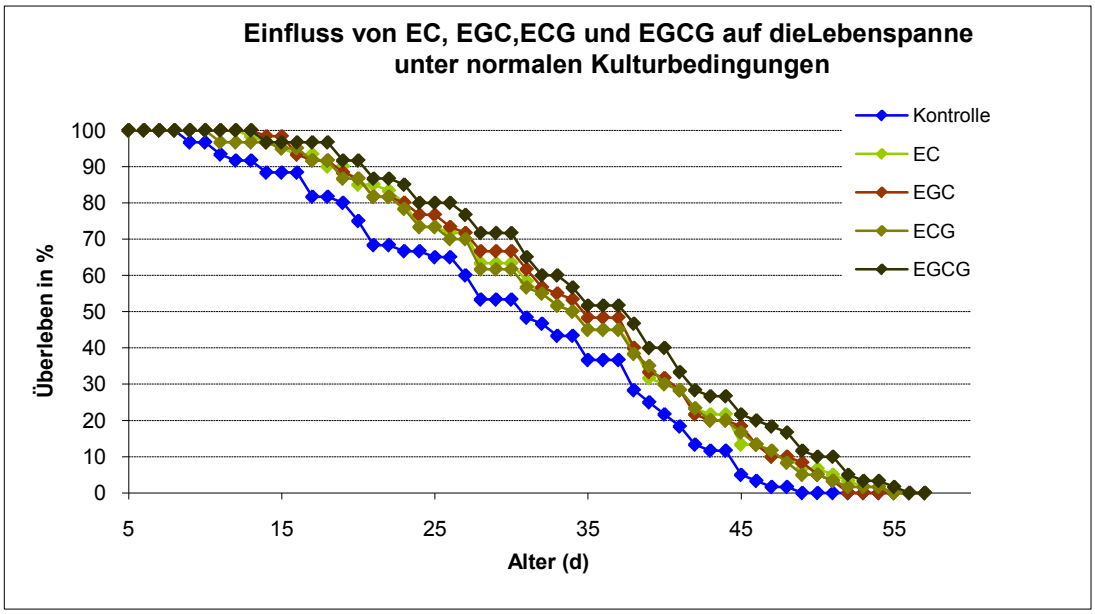


Abb. 3.14: EC, EGC, ECG und EGCG verlängern die Lebensspanne unter normalen Bedingungen
Alterssynchronisierte wildtypische L4-Larven wurden während der gesamten nachfolgenden Lebensspanne mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids bei 20°C in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Als Nahrung dienten Bakterien des Stammes OP50-1. Das Überleben wurde alle 1-2 Tage überprüft und das Medium neu ausgetauscht. Die ermittelten Überlebenskurven zeigen das Resultat von 3 unabhängigen Experimenten n=60, Kaplan-Meier-Analyse

Lebensspanne von *C. elegans* unter Normalbedingungen

Behandlung	Mittelwert in Tagen ± SEM (n)	Veränderung	Anzahl der unabhängigen Versuche	Veränderung in unabhängigen Versuchen
Kontrolle	30,1 ± 1,45 (60)		3	
EC	33,9 ± 1,4 (60)	1.13*	3	1.20;1.13;1.05
EGC	34,3 ± 1,4 (60)	1.14*	3	1,20;1,12;1.10
ECG	33,6 ± 1,4 (60)	1.12*	3	1.21;1.09;1.05
EGCG	36,3 ± 1,4 (60)	1.20*	3	1.28;1.16;1.17
Kontrolle	29,6 ± 1,4 (80)		4	
Catechin	35,7 ± 1,6 (80)	1.21*	4	

Tab. 3.6: Verlängerung der Lebensspanne durch Catechinderivate unter Normalbedingungen
Alterssynchronisierte wildtypische L4-Larven wurden während der gesamten Lebensspanne mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids bei 20°C in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Das Überleben wurde alle 1-2 Tage überprüft und das Medium neu ausgetauscht. Catechin wurde in einer unabhängigen Versuchsreihe mit eigener Kontrolle untersucht (Büchter, 2008), *, $p<0.05$, Kaplan Meier Analyse mit *Log-Rank (Mantel-Cox)*

3.4.2 Untersuchung der Lebensspanne unter leer-RNAi Bedingungen

Die RNAi ist eine Technik der reversen Genetik, mittels welcher auf Ebene der RNA auf die Expression eines oder mehrerer Gene Einfluss genommen werden kann. Dies kann durch die Verfütterung von Bakterien, die Doppelstrang-RNA eines bestimmten Gens exprimieren, erreicht werden. Die Technik wurde angewendet, um zu überprüfen, ob die Effekte der getesteten Flavonoide auf die Lebensspanne sich unter den veränderten Bedingungung der RNAi-Technik reproduzieren lassen.
RNAi-Lebensspanneuntersuchungen wurden bei einer Umgebungstemperatur von 25°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur weist *C. elegans* eine deutlich niedrigere Lebensspanne als bei 20°C auf. Bei der Untersuchung zur Lebensspanne unter leer-RNAi-Bedingungen wurden Bakterien verfüttert, die einen Vektor ohne Insert exprimieren, so dass keine Beeinflussung der Proteinexpression stattfindet. In Abb. 3.15.1 und 3.15.2 sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven für die entsprechenden Behandlungen der Würmer dargestellt. Für Catechin und EGCG zeigten sich unter leer-RNAi Bedingungen ähnliche Lebensverlängerungen wie unter

Normalbedingungen. So verlängerte EGCG die mittlere Überlebenszeit von etwa 15 Tagen in der Kontrolle um mehr als 15 %. Auch durch die Behandlung mit Catechin konnte die Lebensdauer von *C. elegans* um fast 2 Tage verlängert werden.

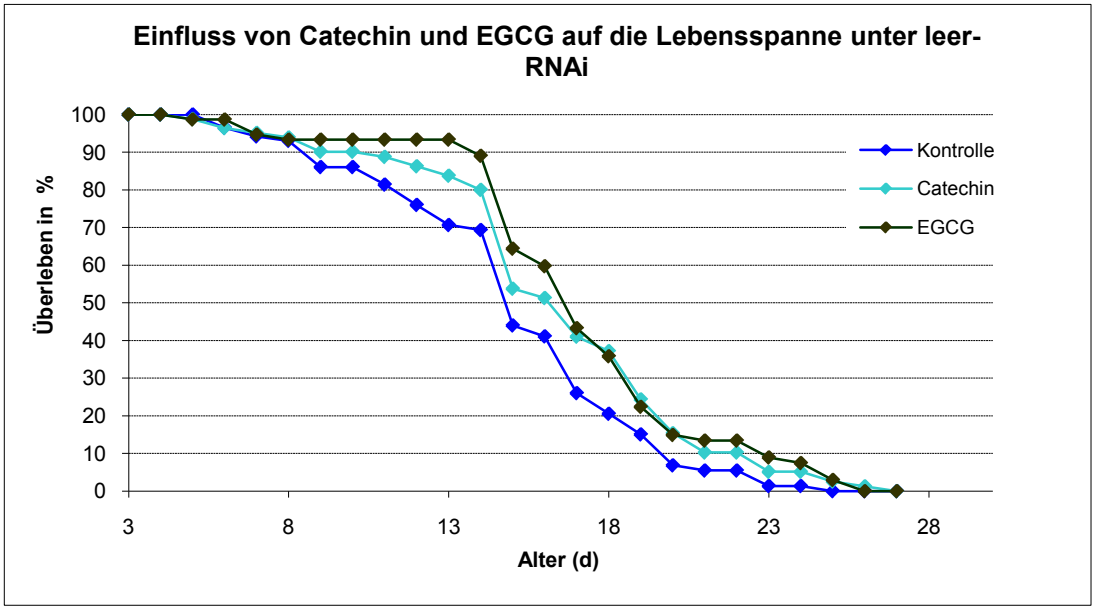


Abb. 3.15.1: Catechin und EGCG verlängern die Lebensspanne unter RNAi-Bedingungen
Alterssynchronisierte wildtypische L4-Larven wurden während der gesamten nachfolgenden Lebensspanne mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids bei 25°C in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Als Nahrung dienten Bakterien des Stammes HT115 mit leerem Konstrukt. Das Überleben wurde alle 1-2 Tage überprüft und das Medium neu ausgetauscht. Die ermittelten Überlebenskurven zeigen das Resultat von 3 unabhängigen Experimenten n=83-85, Kaplan-Meier-Analyse)

Bei EC, EGC und ECG fiel die Lebensverlängerung von *C. elegans* deutlich geringer aus (s. Abb. 3.15.2). Während EC eine signifikante Lebensverlängerung unter leer-RNAi Bedingungen verfehlte, zeigten EGC einen prozentual höheren Anteil lebender Würmer nur im späten und ECG nur im frühen Lebensabschnitt von *C. elegans*. Dies äußerte sich auch in den Signifikanztests, indem EGC eine Signifikanz nur im *Log Rank*- und ECG nur im *Breslow*–Test zeigte (Tab. 3.6). Interessanterweise zeigte sich ein sehr ähnlicher Kurvenverlauf für EGC und ECG bei den Untersuchungen zur Thermoresistenz im Sytox Green Assay (vgl. Abb. 3.2.2.). Sowohl bei den Versuchen zur Thermoresistenz als auch bei der Untersuchung zur Lebensspanne unter leer-RNAi zeigte EGC eher im späten und ECG eher im frühen Verlauf der Untersuchung protektive Effekte.

In den Überlebenskurven wurden Catechin und EGCG meist einzeln betrachtet (vgl. Abb. 3.15 und 3.16), um die Übersichtlichkeit der Diagramme zu gewährleisten. Auch wird bei dieser Darstellung deutlich, dass nur diese beiden Derivate eine Lebensverlängerung bei 25 °C unter leer-RNAi Bedingungen zeigten.

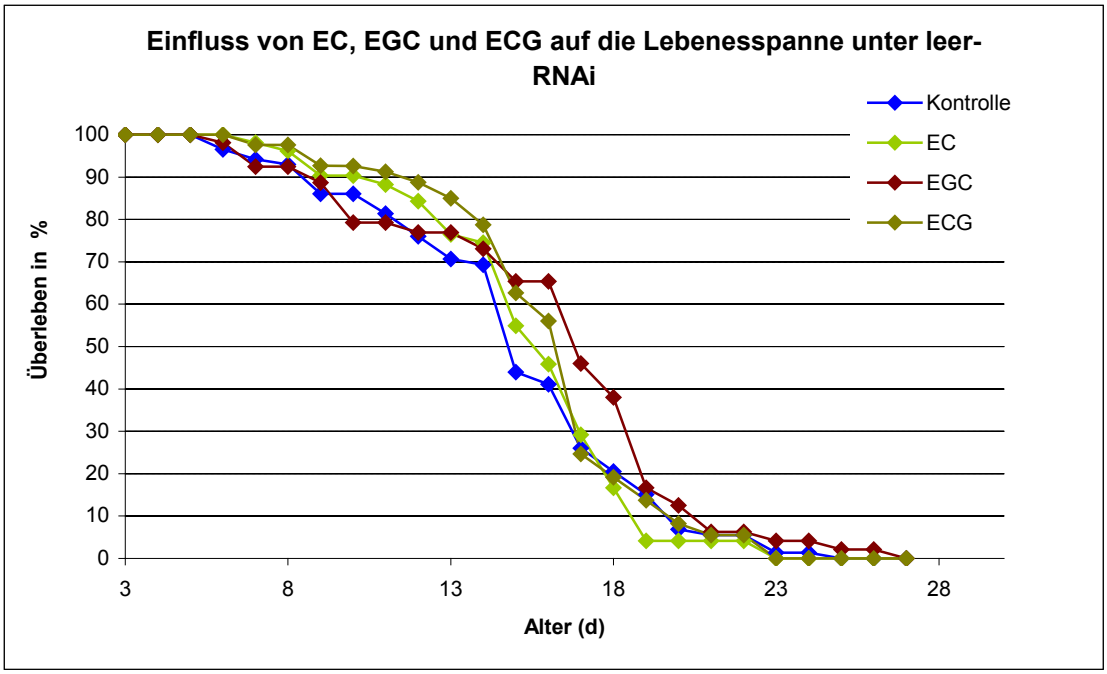


Abb. 3.15.2: EGC und ECG verlängern die Lebensspanne unter leer-RNAi Bedingungen

Die ermittelten Überlebenskurven zeigen das Resultat von 2-3 unabhängigen Experimenten n=48-85, Kaplan-Meier Analyse. Versuchsbeschreibung siehe Abb. 3.15.1.

Lebensspanne von *C. elegans* unter leer-RNAi Bedingungen

Behandlung	Mittelwert in Tagen ± SEM (n)	Veränderung	Anzahl der unabhängigen Versuche	Veränderung in unabhängigen Versuchen
Kontrolle	15,1 ± 0,5 (85)		3	
Catechin	16,7 ± 0,5 (84)	1.10*#	3	1.13, 1.13, 1.05
EC	15,7 ± 0,5 (55)	1.04	2	1.03, 1.08
EGC	16,5 ± 0,7 (48)	1.09*	2	1.06, 1.04
ECG	16,4 ± 0,4 (85)	1.08#	3	1.00, 1.08, 1.15
EGCG	17,5 ± 0,5 (83)	1.15*#	3	1.11, 1.28, 1.08

Tab. 3.7: Catechin, EGC, ECG und EGCG verlängern die Lebensspanne unter leer-RNAi Bedingungen
Alterssynchronisierte wildtypische L4-Larven wurden während der gesamten nachfolgenden Lebensspanne mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids bei 25°C in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Als Nahrung dienten Bakterien des Stammes HT115 mit leerem Konstrukt. Das Überleben wurde alle 1-2 Tage überprüft und das Medium neu ausgetauscht. *, $p<0.05$, Kaplan-Meier-Analyse mit *Log-Rank (Mantel-Cox)* und #, $p<0.05$, Kaplan-Meier-Analyse mit *Breslow (*generalisierter *Wilcoxon)*.

3.4.3 Lebensspanneuntersuchungen unter DAF-16-RNAi Bedingungen

Mit Hilfe von Bakterien des Stammes HT115 mit dem Insert gegen DAF-16 wurde der Einfluss von Catchin und seinen Derivaten auf die Lebensspanne bei Degradierung dieses Transkritionsfaktors untersucht. Ziel der Untersuchung war die Beantwortung der Frage, ob DAF-16 für die Flavonoid-vermittelte Lebensverlängerung notwendig ist. Da gerade durch Catechin und EGCG unter leer-RNAi Bedingungen eine deutliche Lebensverlängerung von *C. elegans* hervorgerufen werden konnte (vgl. Kap. 3.4.2), stellte sich die Frage, ob diese Veränderung auch nach Stilllegung dieses Transkriptionsfaktors auftritt.

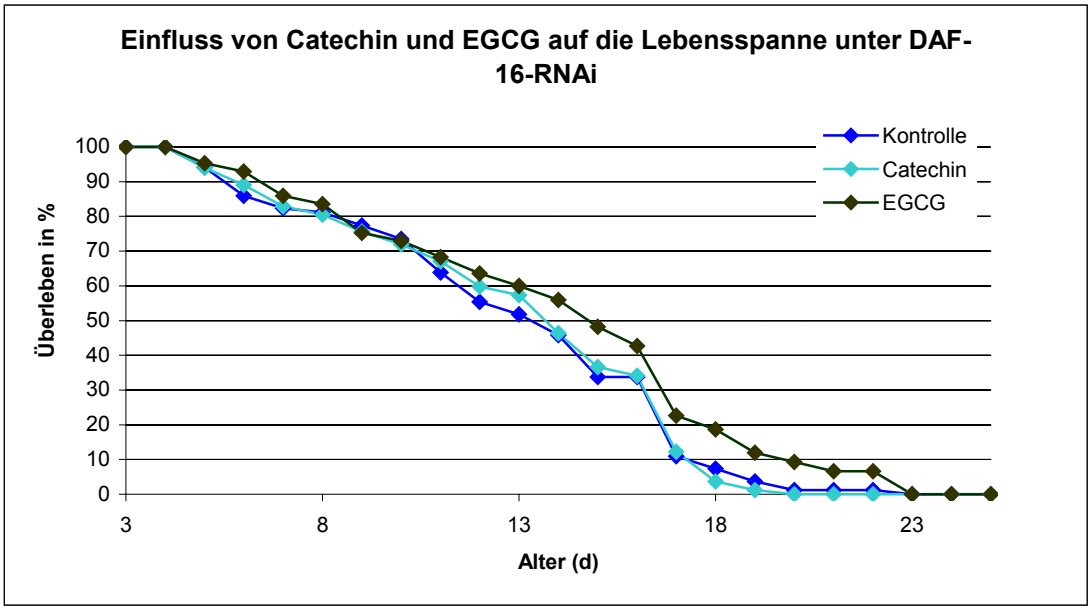


Abb. 3.16.1: Lebensverlängernde Wirkung durch Catechin unter DAF-16-RNAi Bedingungen aufgehoben
Alterssynchronisierte wildtypische L4-Larven wurden während der gesamten nachfolgenden Lebensspanne mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids bei 25°C in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Als Nahrung dienten Bakterien des Stammes HT115 mit Konstrukt gegen DAF-16. Das Überleben wurde alle 1-2 Tage überprüft und das Medium neu ausgetauscht. Die ermittelten Überlebenskurven zeigen das Resultat von 3 unabhängigen Experimenten n=83-86, Kaplan-Meier-Analyse)

Hierbei zeigte sich, dass die zuvor beobachtete Lebensverlängerung durch Catechin unter leer-RNAi unter DAF-16-RNAi aufgehoben wurde. Die Überlebenskurve der mit Catechin behandelten Gruppe verläuft nahezu deckungsgleich zur Kontrollgruppe (vgl. Abb. 3.16.1) und die mittlere Überlebenszeit ist in beiden Gruppen gleich. Auch die lebensverlängernde Wirkung von EGCG wurde unter DAF-16-RNAi Bedingungen vermindert. EGCG steigerte die mittlere Überlebenszeit von *C. elegans* aber weiterhin signifikant um 10 % (vgl. Tab. 3.7). Ebenfalls wurde der lebensverlängernde Effekt durch EGC durch DAF-16 RNAi aufgehoben. Die Lebensverlängerung von ECG trat auch unter DAF-16-RNAi Bedingungen auf, sogar in stärkerem Ausmaß: zur

Kontrolle stieg die mittlere Lebensdauer um 21 %, während es unter leer-RNAi Bedingungen nur 8 % waren (vgl. Tab. 3.6). Wie auch unter leer-RNAi EC zeigte in diesem Versuchsansatz keine signifikante Beeinflussung der Lebenspanne.

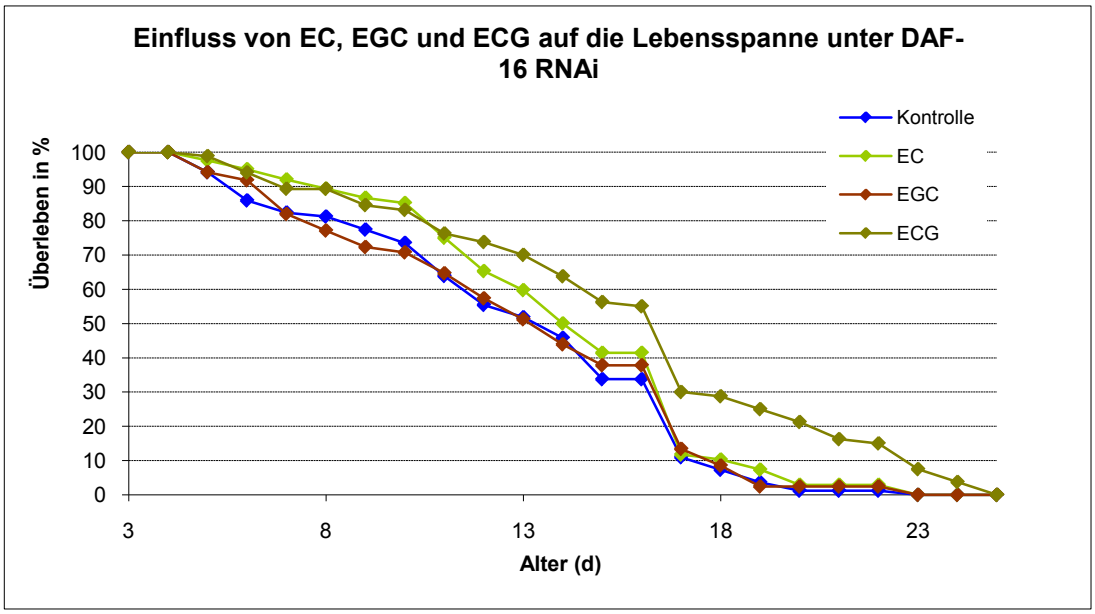


Abb. 3.16.2: Lebensverlängernde Wirkung durch Catechin unter DAF-16-RNAi Bedingungen aufgehoben
Die ermittelten Überlebenskurven zeigen das Resultat von 3 unabhängigen Experimenten n=84-85, Kaplan-Meier Analyse. Versuchsbeschreibung siehe 3.16.1.

Lebensspanne von *C.elegans* unter DAF-16-RNAi Bedingungen

Behandlung	Mittelwert in Tagen ± SEM (n)	Veränderung	Anzahl der unabhängigen Versuche	Veränderung in unabhängigen Versuchen
Kontrolle	13,1 ± 0,5 (85)		3	
Catechin	13,1 ± 0,5 (83)	1.00	3	1.07, 0.96, 0.96
EC	14,4 ± 0,5 (85)	1.10	3	1.06, 1.17, 1.07
EGC	13,2 ± 0,5 (85)	1.01	3	1.03, 1.03, 0.95
ECG	15,8 ± 0,6 (84)	1.21*#	3	1.05, 1.23, 1.37
EGCG	14,4 ± 0,6 (86)	1.10*	3	0.99 ,1.15, 1.19

Tab. 3.8:Keine Veränderung der Lebensspanne durch Catechin und EGC unter DAF-16-RNAi Bedingungen
Alterssynchronisierte wildtypische L4-Larven wurden während der gesamten nachfolgenden Lebensspanne mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids bei 25°C in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Als Nahrung dienten Bakterien des Stammes HT115 mit Konstrukt gegen DAF-16. Das Überleben wurde alle 1-2 Tage überprüft und das Medium neu ausgetauscht. *, $p<0.05$, Kaplan-Meier-Analyse mit *log-Rank (Mantel-Cox)* und #, $p<0.05$, Kaplan-Meier-Analyse mit *Breslow* (generalisierter *Wilcoxon*).

3.4.4 Lebensspanneuntersuchungen unter SKN-1-RNAi Bedingungen

Da SKN-1-Mutanten eine verkürzte Lebenszeit aufweisen (An & Blackwell, 2003), hätte man in der Kontrollgruppe unter SKN-1-RNAi Bedingungen im Vergleich zur leer-RNAi der jeweiligen Kontrollgruppe eine Lebensverkürzung erwartet. Diese wurde nicht beobachtet. Bei diesem Experiment stieg die mittlere Lebensspanne der Kontrollgruppe unter SKN-1 Bedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe unter leer-RNAi Bedingungen (vgl. Tab.3.5) um 0,4 Tage an.

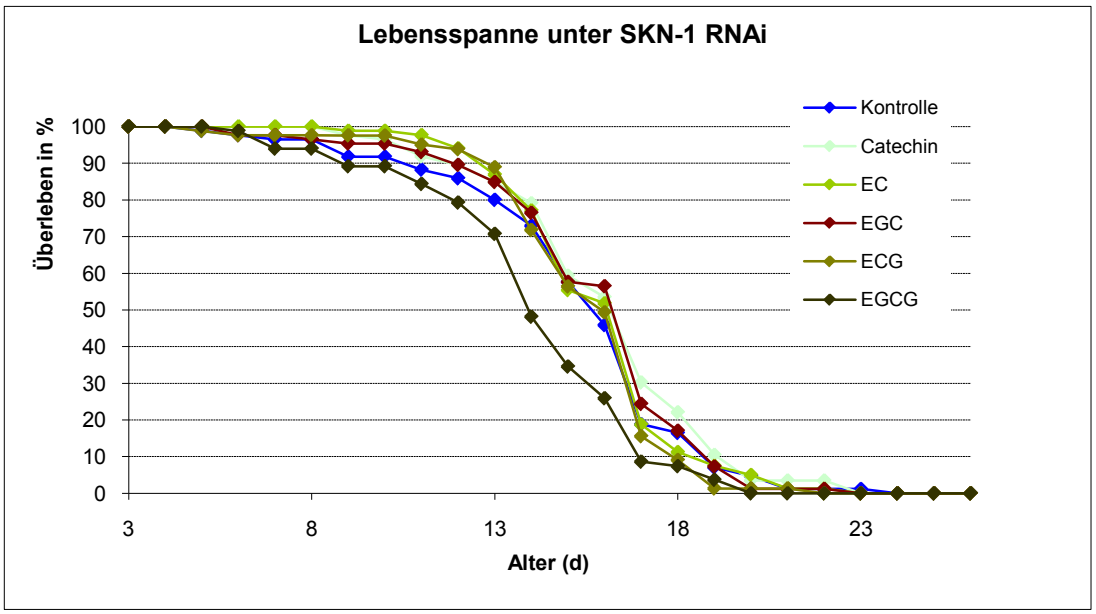


Abb. 3.17: EGCG verkürzt die Lebensspanne unter SKN-1-RNAi Bedingungen
Alterssynchronisierte wildtypische L4-Larven wurden während der gesamten nachfolgenden Lebensspanne mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids bei 25°C in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Als Nahrung dienten Bakterien des Stammes HT115 mit Konstrukt gegen SKN-1. Das Überleben wurde alle 1-2 Tage überprüft und das Medium neu ausgetauscht. Die ermittelten Überlebenskurven zeigen das Resultat von 3 unabhängigen Experimenten n=85-90, Kaplan-Meier-Analyse

Nach Ausschalten des Transkriptionsfaktors SKN-1 durch oben beschriebene Methode zeigte keines der Catechinderivate eine Lebensverlängerung (s. Tab. 3.9). Bis auf EGCG waren die Überlebenskurven sehr ähnlich der Kontrolle (s. Abb. 3.17). EGCG zeigte eine deutliche Verkürzung der Lebensspanne unter SKN-1-RNAi Bedingungen.

Lebensspanne von *C. elegans* unter SKN-1-RNAi Bedingungen

Behandlung	Mittelwert ± SEM (n)	Veränderung	Anzahl der unabhängigen Versuche	Veränderung in unabhängigen Versuchen
Kontrolle	15,5 ± 0,4 (86)		3	
Catechin	16,2 ± 0,3 (85)	1.04	3	1.15, 1.00, 0.97
EC	16,1 ± 0,3 (85)	1.04	3	1.13, 1.00, 0.99
EGC	16,0 ± 0,3 (87)	1.03	3	1.10, 1.04, 0.97
ECG	15,8 ± 0,3 (84)	1.02	3	1.02, 1.02, 1.01
EGCG	14,2 ± 0,3 (90)	0.91*#	3	0.95, 0.86, 0.90

Tab. 3.9: EGCG verkürzt die Lebensspanne unter SKN-1-RNAi Bedingungen
Alterssynchronisierte wildtypische L4-Larven wurden während der gesamten nachfolgenden Lebensspanne mit 100 µM des jeweiligen Flavonoids bei 25°C in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Als Nahrung dienten Bakterien des Stammes HT115 mit Konstrukt gegen SKN-1. Das Überleben wurde alle 1-2 Tage überprüft und das Medium neu ausgetauscht. *, $p<0.05$, Kaplan-Meier-Analyse mit *Log-Rank (Mantel-Cox)* und #, $p<0.05$, Kaplan-Meier-Analyse mit *Breslow (*generalisierter *Wilcoxon).*

4 Diskussion

4.1 Beschreibende protektive Eigenschaften von Catechin und seinen Derivaten in *C. elegans*

Flavonoide sind bislang intensiv *in vitro* basierend auf Säugerzellsystemen, aber weniger in *in vivo*-Studien untersucht worden. Nachteile der Zellkultur sind beispielsweise der Verlust zellulärer Eigenschaften und eine fehlende Interaktion von verschiedenen Zelltypen, da meist einzelne Zelllinien benutzt werden, in denen eine Interaktion von Organen und Geweben nicht möglich ist. Der Modellorganismus *C. elegans* stellt ein gut etabliertes, zusätzliches System zur Untersuchung von Flavonoiden dar. Dieser nichtparasitäre Nematode ist einer der am besten untersuchten Organismen und sein Gebrauch in verschiedenen Gebieten der Forschung in Biologie und Medizin führte zu wegweisenden Endeckungen mit Relevanz für Säuger einschließlich des Menschen. Er eignet sich ebenfalls besonders, um mögliche protektive Eigenschaften von Naturstoffen wie Resistenzerhöhung gegen verschiedene Arten von Stress und Lebensverlängerung nachzuweisen.

4.1.1 Thermaler und oxidativer Stress

Die Wirkungen von Catechin und seinen Derivaten auf die Resistenz von *C. elegans* gegen letalen thermalen Stress wurden in dieser Arbeit durch zwei unterschiedliche Methoden untersucht. Die halbautomatische Untersuchung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sytox Green® (Gill et al., 2003) ermöglicht hohe Durchsatzraten

bei geringem methodischem Aufwand. Es werden allerdings bei diesem Untersuchungsverfahren nur virtuelle Todeszeitpunkte von *C. elegans* aufgrund von festgelegten Schwellenwerten ermittelt. Andere Autoren untersuchen die Stressresistenz durch manuelle Auszählung von Würmern nach thermalem Hitzestress. Um eine Vergleichbarkeit der Daten zwischen anderen Arbeitsgruppen zu gewährleisten sowie eine interne Kontrolle der virtuellen Todeszeitpunkte durchzuführen, wurden die aus dem Sytox Green® Assay gewonnenen Daten durch eine manuelle Untersuchung der Resistenz gegen thermalen Stress überprüft.

Duch die Behandlung mit EGC, ECG und EGCG wurde die Thermotoleranz von *C. elegans* im Sytox Green® Assay signifikant und in der manuellen Untersuchung tendenziell gesteigert (s. Kap. 3.1.2). ECG zeigte im Vergleich zu EGC und EGCG eine deutlich geringere tendentielle Erhöhung der Thermoresistenz. EC zeigte in beiden Untersuchungstechniken keine Beeinflussung der Thermoresistenz. Während Catechin im Sytox Green Assay® nicht schützend gegen Thermostress war, konnte durch die manuelle Untersuchung eine tendenzielle Erhöhung der Stressresistenz gezeigt werden. Die Diskrepanz der Ergebnisse zur Thermoresistenz kann sich aus methodischen Schwierigkeiten in der manuellen Untersuchung ergeben haben: so war beispielsweise die Menge das Festmediums, auf dem diese Untersuchungen durchgeführt wurden, nicht definiert. Bei nicht vorgeheizten Kulturplatten kann dies zu einem unterschiedlich schnellen Temperaturanstieg des Mediums führen. Es kann daher nicht von einer exakten gleichmäßigen Hitzeexposition ausgegangen werden, was ein Grund für Abweichung der Ergbnisse im Vergeich zum Sytox Green Assay sowie für die hohe Standardabweichung und die fehlende Signifikanz darstellen kann. Diese Fehlerquelle mindert die Aussagekraft der manuellen Untersuchung der Thermotoleranz.

Zur Thermoresistenzbeeinflussung durch Catechinderivate in *C. elegans* sind einige Daten publiziert. Zhang et al. (2008) konnten für verschiedene Konzentrationen von EGCG bei 35 °C Hitzestress mit manueller Bestimmung der Todeszeitpunkte ebenfalls eine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit von *C. elegans* zeigen. Im Vergleich zu den hier vorliegenden Ergebnissen zeigte sich die Steigerung der Stressresistenz bereits bei einer vielfach niedrigeren Konzentration von EGCG. Saul et al. (2009) konnten eine leicht signifikante Erhöhung der Stressresistenz nach drei Tagen Inkubation von L4-Larven mit 200 µM Catechin zeigen. Dieses von den vorliegenden Untersuchungen abweichende Ergebnis zur Thermotoleranzbeeinflussung durch

Catechin ist wahrscheinlich mit der hier doppelt so hoch eingesetzten Konzentration von Catechin zu begründen, denn auch Büchter (2008) konnte keine protektiven Eigenschaften für 100 µM Catechin nachweisen, weder im Sytox Green® Assay noch in manuell durchgeführten Versuchen.
Auffällig ist eine sehr variable Überlebenszeit der Würmer in verschiedenen Veröffentlichungen bei ähnlichen Hitzestressapplikationen. So überlebten die Würmer der Arbeitsgruppe Zhang et al. (2008) bei nur 2°C niedrigerer Hitzestressexposition (35°C) etwa doppelt so lange wie in vergleichbaren Studien. Versuche der Arbeitsgruppe Saul et al. (2009) zu thermalem Stress zeigten ein Überleben von etwa 55 % unbehandelter Würmer nach 8 h Hitzestress, ebenfalls bei 35 °C. Untersuchungen zur Thermotoleranz von *C. elegans* von Büchter (2008) zeigen ein mittleres Überleben von etwa 90 % unbehandelter, fünf Tage alter Würmer nach 6 h Hitzeexposistion (37 °C) und einer nachfolgenden Regenerationsphase von 18 h. Bei der manuellen Untersuchung der Thermotoleranz überlebten im hier diskutiertem Versuchsansatz etwa 55 % in der Kontrollgruppe (Fünf Tage alter *C. elegans*, 5 h Hitzeexposition bei 37 °C, 20 h Regenerationsphase). Im Sytox Green Assay zeigte sich eine mittlere Überlebenszeit von etwa 6 h bei 37 °C Hitzestress (Fünf Tage alter *C. elegans*). Aus diesen Beispielen wird deutlich, dass die manuelle Untersuchung der Resistenz gegen thermalen Stress in Bezug auf die Überlebenszeit je nach Temperatur, Inkubationsschema, Alter der Würmer und einer nachfolgenden Regenerationsphase variieren kann. Der Sytox Green® Assay stellt daher ein gutes, gegenüber der manuellen Untersuchung zu bevorzugendes Verfahren zur Bestimmung der Thermotoleranz dar. Die hier ermittelten mittleren Überlebenszeiten sind reproduzierbar und liegen im Bereich der manuell ermittelten Überlebenszeiten. Zusätzlich wird durch die kontinuierliche Messung jeweils ein individueller Todeszeitpunkt ermittelt. Dies ermöglicht die Erstellung einer genauen Überlebensanalyse (Kaplan-Meier-Kurve), währenddessen man bei der manuellen Untersuchung lediglich meist nur an einem Zeitpunkt das Überleben überprüft.

Catechin und alle getesteten Derivate (alle 100 µM) erhöhten die Resistenz gegen eine fünfstündige Behandlung mit Juglone (200 µM) zur Erzeugung von oxidativem Stress deutlich gegenüber der Kontrolle. Der Prozentsatz überlebender Würmer stieg von ca. 50 % in der Kontrolle auf über 60 % in allen Behandlungsgruppen. Die Steigerung der Stressresistenz war allerdings in keiner Gruppe statistisch signifikant. Dies lag

vermutlich and den hohen Schwankungen der Ergebnisse bei den Versuchswiederholungen und der relativ kleinen Anzahl an Versuchswiederholungen.

In publizierten Studien wurde eine positive Wirkung von EGCG auf die Resistenz gegen oxidativen Stress beschrieben. Zhang et al. (2008) beobachteten bereits bei einer Konzentration von etwa 22 µM EGCG eine deutliche Steigerung der mittleren Überlebensspanne (177 %) gegenüber durch Juglone induziertem oxidativem Stress. Auch Abbas und Wink (2008) zeigten die protektive Wirkung von EGCG (220 µM) gegen Juglone, indem sie eine Steigerung der mittleren Überlebensspanne um 289 % nachwiesen. Im Unterschied zu den Experimenten in dieser Arbeit wurden bei diesen Studien die individuellen Todeszeitpunkte der Würmer bestimmt und daraus entsprechende Überlebenskurven erstellt, so dass ein wesentlich größerer Stichprobenumfang zur statistischen Auswertung herangezogen werden konnte. Auch die Art der Exposition gegenüber dem Juglon war unterschiedlich. In dieser Arbeit wurde die Inkubation in Flüssigmedium durchgeführt, so dass die Noxe sowohl über den Verdauungstrakt als auch über die vollständig umspülte Oberfläche auf die Würmer einwirken konnte. In den Publikationen wurde die Juglone-Behandlung auf Festmedium durchgeführt, wobei eine geringere Exposition der Würmer zu erwarten ist. Es ist weiterhin unklar, ob sich durch die nur in dieser Arbeit durchgeführte 20-stündige Regenerationsphase einige Würmer von der Schädigung erholen konnten, die unmittelbar nach der Juglone-Behandlung als tot eingestuft worden wären.

Trotz aller Unterschiede in der experimentellen Durchführung bestätigen die publizierten Ergebnisse zum EGCG das Resultat aus dieser Arbeit: EGCG wirkt protektiv gegen oxidativen Stress, der durch Juglone erzeugt wird. Auch für Catechin (200 µM) wurde eine schützende Wirkung gegen oxidativen Stress – ausgelöst durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid – beschrieben (Saul et al., 2009). Trotz aller methodischen Unterschiede unterstützt diese Studie die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur protektive Wirkung von Catechin gegen oxidativen Stress.

Oxidativer Stress kann multiple Typen von Zellschädigung und diverse Fehlregulationen bedingen sowie einen Haupteffekt auf den Prozess des Alterns haben (Harman, 1956). Somit wird häufig eine Korrelation zwischen erhöhter Resistenz gegen verschiedene Arten von Stress und einer verlängerten Lebensspanne beobachtet, v.a. bei Mutation in Gerontogenen (Johnson et al., 2001). Auch bei Veränderungen der Lebensspanne und der Stressresistenz durch Naturstoffe gibt es diese Korrelation (Benedetti et al., 2008). Durch die vorliegenden Untersuchungen zur Stressresistenz

wurden in dieser Arbeit Hinweise auf protektive Effekte der Catechinderivate in *C. elegans* gefunden. Im Anschluss daran wurde überprüft, ob sich diese protektiven Effekte auch auf die gesamte Lebensspanne auswirken und die Korrelation zwischen Stressresistenz und Lebenspanne auch bei Catechinderivaten gegeben ist.

4.1.2 Lebensverlängerung

Als wichtigster Endpunkt zur Beschreibung protektiver Eigenschaften wurden die Wirkungen der Catechinderivate auf die Lebensspanne untersucht. Aus Untersuchungen von Brown et al. (2006) war bekannt, dass eine Inkubation mit 25 µM EGCG eine verstärkte pharyngeale Pumpaktivität der Würmer und verminderte Aß-Amyloid-Ablagerung im Vergleich zu den nicht behandelten Würmer bewirkt. Dies stellt eine schützende Wirkung dieser Substanz gegen alterungsbedingte Veränderungen dar. Es konnte allerdings keine Lebensverlängerung für diese Konzentration gezeigt werden. Ebenfalls stellten Zhang et al. (2008) keine Lebensverlängerung für den Konzentrationsbereich von 0,218 bis 21,8 µM EGCG fest.

In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikante Lebensverlängerung durch die Behandlung mit einer Konzentraion von 100 µM EGCG. Auch Abbas & Wink (2008) zeigten durch eine Inkubation mit 220 µM EGCG eine Lebensverlängerung von *C. elegans* um etwa 10 %. Die Würmer lebten hier im Durchschnitt etwa 24 Tage, nach EGCG Behandlung 26,5 Tage. Man kann diesen Daten entnehmen, dass die lebensverlängernden Eigenschaften von EGCG erst bei höheren Konzentrationen von EGCG auftreten, während antioxidative Wirkungen und alterungsspezifische Veränderungen bereits bei niedrigeren Konzentrationen nachweisbar sind. Die hier eingesetzte Konzentration von 100 µM liegt in einer guten Relation zu vergleichbaren Arbeiten, da bereits bei einer Konzentration von 250 µM lebensverkürzende Wirkungen durch EGCG auftreten (Kampkötter, persönliche Mitteilung).

Für Catechin konnten durch die Arbeiten von Büchter (2008) lebensverlängernde Wirkungen auf den Modellorganismus *C. elegans* gezeigt werden. Diese Ergebnisse zeigten sich ebenfalls unter leer-RNAi Bedingungen bei 25 °C. Auch Saul et al. (2009) konnten für unterschiedliche Konzentrationen von Catechin eine Lebensverlängerung unter normalen Bedingungen zeigen. Dabei zeigten sich für 100 und 200 µM ähnliche signifikante Steigerungen der mittleren Überlebenszeit von etwa

8 %, während die Lebensverlängerung bei 300 µM geringer ausfiel. Auch für EC, EGC und ECG konnte in dieser Arbeit eine signifikante Verlängerung der Lebensspanne von *C. elegans* gezeigt werden.

Die Untersuchungen zur Lebensverlängerung wurden unter normalen Bedingungen bei 20 °C sowie unter leer-RNAi Bedingungen bei 25 °C untersucht. Letzterer Ansatz war nötig, um die Reporduzierbarkeit der Ergebnisse der normalen Bedingungen auf die nachfolgenden RNAi-Ansätze zu überprüfen. Unterschiede im Versuchsaufbau lagen beispielsweise in einem anderen Bakterienstamm, anderer Antibiotika zur Selektierung der Bakterien sowie der Temperaturerhöhung von 5 °C, bei der *C. elegans* eine kürzere Lebensspanne aufweist. Diese Veränderungen im Versuchsansatz stellen einen Grund dafür dar, dass die lebensverlängernden Eigenschaften unter Normalbedingungen nicht für alle Catechinderivate für die Bedingungen im leer-RNAi-Ansatz übertragen werden konnten. So zeigten hier nur Catechin und EGCG weiterhin signifikante Lebensverlängerungen. EC zeigte im leer-RNAi-Ansatz keine Signifikanz und auch bei EGC und ECG war die Lebensverlängerung nur durch verschiedene Signifikanztests belegbar. Eine Beeinflussung der Wirkung der Catechinderivate durch die Veränderungen im Versuchsaufbau beim RNAi-Ansatz lassen sich somit nicht ausschließen. Die abweichenden Ergebnisse stehen daher nicht im Widerspruch zu der gezeigten Lebensverlängerung durch alle getesten Catechinderivate unter normalen Bedingungen.

4.2 Wirkungen von Catechin und seinen Derivaten auf molekularer Ebene

Um Mechanismen der protektiven Wirkungen von Catechin und seinen Derivaten näher beschreiben zu können, wurden Untersuchungen zur Detektion molekularer Veränderungen durchgeführt. Unter anderem wurde die Akkumulation von ROS im lebenden Organismus untersucht, da eine verminderte oxidative Belastung sich protektiv auf einen Organismus auswirken kann. Zusätzlich wurde die Lipofuszinakkumulation als anerkanntes Alterungspigment untersucht. Des Weiteren wurden Einflüsse der Derivate auf Komponenten und Zielgene des Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalwegs auf molekularer Ebene untersucht. Dieser Signalweg reguliert viele für die Alterung wichtige Körperfunktionen, so dass Veränderungen in dieser Kaskade als mögliche Wirkmechanismen in Betracht gezogen werden können.

4.2.1 Lipofuszinakkumulation und ROS-Akkumulation

Seit langem wird eine hohe Radikalfängeraktivität für protektive Eigenschaften vieler Flavonoide verantwortlich gemacht. So konnte für Catechinderivate gezeigt werden, dass diese im zellfreien Medium Radikale abfangen können (Rice-Evans et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde die intrazelluläre ROS-Akkumulation unter Hitzestress mit Hilfe einer fluoreszenzunterstützten semiautomatischen Methode untersucht. Vorteil dieser Methode ist die hohe Durchsatzrate lebendiger Würmer, währenddessen vergleichbare Arbeiten die Würmer vorher lysierten (Zhang et al., 2008). Für EGC, ECG und EGCG zeigten sich stark antioxidative Eigenschaften, allerdings keine derartigen Effekte für EC und Catechin. Mit steigender Hitze steigt die ROS-Akkumulation (Finkel & Holbrook, 2000). Da auch Catechin und EC weniger stark gegen thermalen Stress schützen (s. Abb. 3.2.1), kann vermutet werden, dass eine geringere antioxidative Kapazität dieser Substanzen dafür verantwortlich gemacht werden kann. Es konnte gezeigt werden, das EGCG, ECG und EGC eine höhere antioxidative Aktivität besitzen als EC und Catechin, was auch durch eine erhöhte Anzahl phenolischer Gruppen erklärt werden kann (Guo et at., 1999). Allerdings zeigen die ebenfalls lebensverlängernden Wirkungen von Catechin und EC unter Normalbedingungen, dass auch eine niedrigere antioxidative Aktivität kein Grund für eine fehlende Wirkung in diesem aussagekräftigen Endpunkt ist, was auf weitere Wirkungsmechanismen schließen lässt.

Lipofuszin stellt einen in vielen Spezies vorkommenden Alterungsmarker dar. Das Auftreten dieses braun-gelblichen autofluoreszenten Pigmentes, welches in postmitotischen Zellen in vielen Organsystemen vorkommt, kann durch vermehrten oxidativen Stress gesteigert, aber durch erniedrigte Exposition mit reaktiven Sauerstoffradikalen, z.B. durch Eisenchelatoren, auch vermindert werden (Brunk & Terman, 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle getesteten Catechinderivate die Akkumulation dieses Pigments verlangsamen können. Es wird also deutlich, dass auch Substanzen, die bei akut letalem Hitzestress nicht die intrazelluläre ROS-Akkumulation und damit die oxidative Belastung verringern, wie Catechin und EC, die Ansammlung des Alterspigments positiv beeinflussen können. Eine Verringung der Lipofuszinakkumulation konnte bereits für mehrere Flavonoide, wie für Quercetin (Kampkötter et al., 2007a) und Polyphenole aus Blaubeeren (Wilson et al., 2006) gezeigt werden. Die Arbeitsgruppe Abbas & Wink (2010) zeigte eine

verminderte Lipofuszinanreicherung im 16 Tage alten *C. elegans* durch die Behandlung mit EGCG, was die vorliegenden Ergebnisse zum diesem Flavonoid unterstützt. Bereits diese Ergebnisse lassen ein unterschiedliches Wirkungsmuster der Catechinderivate annehmen.

4.2.2 Beeinflusssung von Transkriptionsfaktoren und deren Zielgenen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Catechinderivate eine Translokation des Transkriptionsfaktors DAF-16 in den Zellkern von *C. elegans* bewirken. DAF-16 ist ein Endpunkt des Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalwegs, welcher einer der am besten untersuchten Signalwege in Bezug auf Stressresistenz und Langlebigkeit darstellt. DAF-16 ist negativ durch den Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalweg reguliert. Eine Translokation in den Kern ist ein Indiz für erhöhte Stressresistenz und Langlebigkeit.

Für mit Catechin behandelte *C. elegans*-Stämme konnte nicht nur die Translokation von DAF-16 in den Kern, sondern auch eine Erhöhung der SOD-3-Expression gezeigt werden. Zusätzlich war die lebensverlängernde Wirkung von Catechin im Ansatz zur Lebenverlängerung bei durch RNAi degradiertem DAF-16 aufgehoben. Diese Ergebnisse machen eine Mitbeteiligung von DAF-16 an der lebensverlängernden Wirkung von Catechin wahrscheinlich. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass in Mutanten Stämmen von *C. elegans*, die DAF-2 oder AKT-2 nicht oder nur vermindert exprimieren, ebenfalls keine Lebensverlängerung durch Catechin nachweisbar ist (Saul et al., 2009). AKT-2 und DAF-2 sind Teil des Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalwegs (s. Abb. 1.5). Gegensätzlich zeigte ebenfalls die Arbeitsgruppe Saul et al. (2009), dass Mutanten von DAF-16 sowie weitere Komponenten des Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalwegs durch Catechinbehandlung eine verlängerte Lebensspanne aufweisen. Eine Abhängigkeit der protektiven Wirkungen durch Catechin von DAF-16 sowie vom Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalweg ist somit noch nicht hinreichend geklärt, sodass weitere Untersuchungen sowohl im DAF-16-RNAi Ansatz sowie für *loss of funktion*-DAF-16 Mutanten durchgeführt werden müssen.

Durch ECG fiel die Lebensverlängerung unter DAF-16-RNAi Bedingungen stärker aus als in den zuvor getesteten Bedingungen, sodass eine Beteiligung von DAF-16 an den protektiven Wirkungen von ECG unwahrscheinlich wird. Dies überrascht, da ECG

und Catechin vergleichbare Wirkungen auf die DAF-16 Translokation in den Kern und die SOD-3 Erhöhung gezeigt haben. Es ist somit festzuhalten, dass Catechinderivate vergleichbare modulatorische Wirkungen auf Transkriptionsfaktoren und deren Zielgene haben können, diese aber unterschiedlich stark für eine lebensverlängernde Wirkung verantwortlich sein können.

Die tendenziell erhöhte Lebensspanne unter leer-RNAi-Bedingungen durch EGC wurde unter DAF-16-RNAi-Bedingungen aufgehoben, so dass auch hier die DAF-16-vermittelte Lebensverlängerung nicht ausgeschlossen werden kann. Für EC zeigte sich keine Veränderung der Beeinflussung der Lebensspanne, vergleicht man DAF-16- und leer-RNAi-Bedingungen. In beiden Ansätzen zeigte sich eine tendenzielle Lebensverlängerung, wodurch eine Mitbeteiligung von DAF-16 an den protektiven Wirkungen von EC unwahrscheinlich wird. Dies unterstützt die Ergebnisse zur SOD-3-Expression, welche durch die EC-Behandlung tendenziell erniedrigt wurde.

Aus *in vitro*-Versuchen mit humanen Zellen ist weiterhin bekannt, dass auch die anderen untersuchten Catechinderivate Auswirkungen auf den Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalweg haben können. So konnte gezeigt werden, dass EGCG Insulin-ähnliche Wirkungen haben kann, indem es die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) und die Serin/Threonin-Kinase AKT stimuliert, was in einer Phosphorylierung von FoxO (Forkhead Box, Klasse O) und damit in einer Inaktivierung mündet (Anton et al., 2006). Gegenteilig wurde für Extrakte aus Grünem Tee und EGCG eine inhibitorische Wirkung auf die PI3K und AKT nachgewiesen (Zhang et al., 2006). Eine neuere Studie zeigt, dass EGCG konzentrationsabhängig in Zellkulturen den Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalweg PI3K- und AKT-abhängig aktivieren oder inhibieren kann (Bartholome et al., 2010). So führt eine hohe Konzentration von EGCG zu einer Aktivierung von PI3K/AKT und damit zu einer verminderten Translokation von DAF-16 in den Zellkern. Dabei erzeugt die hohe Konzentration von EGCG ein prooxidatives Potenzial, die Aktivierung von PI3K/AKT erfolgt durch ROS. Eine niedrige EGCG-Konzentration führt in der Zellkultur sowie in *C. elegans* zu einer Aktivierung von DAF-16 und kann für protektive Effekte von EGCG verantwortlich sein. Unter DAF-16-RNAi konnte weiterhin eine lebensverlängernde Wirkung von EGCG nachgewiesen werden, allerdings fiel diese deutlich geringer aus als unter normalen Bedingungen. Somit ist eine Mitbeteiligung von DAF-16 an den protektiven Wirkungen von EGCG in *C. elegans* nicht ausgeschlossen (Zhang et al., 2008; Abbas

& Wink, 2010). Eine Aktivierung von AKT konnte für EC, EGC und ECG nicht gezeigt werden (Bartholome et al., 2010).
Durch Behandlung mit EGCG ließ sich eine Erhöhung der Expression der SOD-3 zeigen, was für eine transkriptionelle Aktivität von DAF-16 spricht. Zhang et al. (2008) stellten durch die Behandlung von *C. elegans* mit EGCG eine Erhöhung der SOD-3-mRNA fest. Auch für Catechinextrakt aus Grünem Tee, der v.a. reich an EGCG und EGC ist, konnte eine Erhöhung einer manganhaltigen SOD und der Katalase, welche ebenfalls ein Zielenzym von DAF-16 ist, in *Drosophila melanogaster* gezeigt werden (Li et al., 2007). Diese speziesübergreifende vermehrte Expression dieses Enzyms durch EGCG könnte durch die erhöhte Aktivität des Transkripitonsfators DAF-16 begründet sein.
Die Vermutung, dass die protektiven Eigenschaften von EGCG auch auf direkter Radikalfängeraktivität beruhen, wird durch die Ergebnisse von Abbas und Wink (2010) unterstützt, die zeigen konnten, dass EGCG die Lebensspanne auch in mev-1-Mutanten erhöht. Mev-1 ist eine Untereinheit des Komplexes II der Atmungskette, welche bei fehlerhafter Funktion vermehrt ROS entstehen lässt (Ishii et al., 1998). *C. elegans*-Stämme mit einer Mutaion in diesem Protein zeigen eine reduzierte Lebensspanne aufgrund erhöhter oxidativer Schäden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalwegs auch eine Translokation von SKN-1 in den Zellkern hervorruft (Tullet et al., 2008). SKN-1 ist das *C. elegans*-Ortholog zu den humanen Transkriptionsfaktoren Nrf-1 und Nrf-2 und reguliert v.a. Enzyme der Phase II des Fremdstoffmetabolismus (An & Blackwell, 2003; Baumeister et al., 2006).
In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Catechin, ECG und EGCG die physiologische Translokation von SKN-1 in den Kern unter Jugloneexposition (Sack, 2008) vermindern (s. Abb. 3.9). Auch die GST-4-Expression unter Juglonestress wurde durch ECG signifikant und Catechin und EGCG tendenziell gesenkt (s. Abb. 3.11). Da der Promotor der GST-4 durch oxidativen Stress induzierbar ist (Leiers et al., 2003), kann die Fluoreszenz, welche durch die Expression des transgenen Fusionsprodukt entsteht, als ein Biomarker für das Ausmaß intrazellulären oxidativen Stresses gewertet werden. Möglich ist, dass diese drei Substanzen eine protektive Wirkung auf *C. elegans* ausüben, sodass antioxidative Abwehrsysteme wie die

Aktivierung des Phase II Metabolismus über die SKN-1 und GST-4 weniger zur Verfügung gestellt werden müssen.

Unter Normalbedingungen zeigte sich eine deutlich verminderte Expression der GST-4 durch alle getesteten Catechinderivate (s. Abb. 3.13), bei im Vergleich zu mit Juglone behandeltern Würmer sehr geringem Fluoreszenzlevel (siehe Abb. 3.11 C, D). Diese Eigenschaften können insgesamt als eine Abschwächung des oxidativen Stresses durch Catechinderivate interpretiert werden. Eine Verminderung der Expression der GST-4 konnte schon durch andere Flavonoide wie Quercetin (Kampkötter et al., 2007a) oder dem *Ginkgo biloba* Extrakt EGb 761 (Kampkötter et al., 2007b) gezeigt werden. Ob eine verminderte GST-4 Expression unter normalen Bedingungen durch eine verminderte SKN-1-Aktivität durch Catechinderivate zu erklären ist, ist bisher nicht bekannt. Unter normalen Bedingungen ist im transgenen Stamm LD001[skn-1::gfp] die Fluoreszenz von SKN-1 im Mikroskop nicht zu erkennen (An & Blackwell, 2003), daher wurde mit diesem Stamm der Einfluss der Catechinderivate auf die SKN-1-Lokalisation unter normalen Bedingungen nicht untersucht.

Unter SKN-1-RNAi zeigte keines der untersuchten Catechinderivate einen lebensverlängernden Effekt, hinweisend darauf, dass die Substanz vermittelte Lebensverlängerung SKN-1 abhängig sein könnte. Unter EGCG-Behandlung wurde die Lebensspanne sogar signifikant verkürzt. Denkbar ist, dass Catechin und seine Derivate, v.a. EGCG, eine modulatorische Wirkung auf SKN-1 haben, die eine Lebensverlängerung unter normalen Bedingungen bis leichten Stressbedingungen vermittelt, während unter akut letalen Stressbedingungen die Aktivität von SKN-1 vermindert wird.

Im Vergleich zur Lebensspanne der N2-Kontrolle im leer-RNAi-Ansatz stieg die N2-Kontrolle im SKN-1-RNAi-Ansatz leicht an. Da SKN-1-Mutanten eine um etwa 25 % verkürzte Lebensspanne im Vergleich zum N2-Stamm zeigen (An & Blackwell, 2003), widersprach dieses Ergebnis den Erwartungen und stellt die Ergbenisse in Frage. SKN-1 übernimmt wichtige Prozesse wie die Entwicklung des Verdauungssystems in der Embryogenese. Daher wird SKN-1-RNAi häufig ab dem L1-Stadium angewandt. Hier wurde erst ab dem L4-Larvenstadium mit der Behandlung begonnen, was einen Grund für die ausbleibende Lebensverkürzung darstellen könnte. Um genauere Aussagen zur SKN-1-Abhängigkeit protektiver

Wirkungen von Catechinderivaten in *C. elegans* machen zu können, sind weitere Untersuchungen nötig.

	Catechin	EC	EGC	ECG	EGCG
ROS-Akkumulation	→	→	↓*	↓*	↓*
Resistenz gegen oxidativen Stress	↑	↑	↑	↑	↑
Resistenz gegen thermalen Stress	→	→	↑*	↑*	↑*
Lipofuszin-Akkumulation	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*
Lebensspanne unter Normalbedingungen	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*
Lebensspanne unter leer-RNAi	↑*	↑	↑	↑	↑*
DAF-16 Translokation in den Kern	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*
SOD-3-Expression	↑*	↓	↑*	↑*	↑*
Lebensspanne unter DAF-16-RNAi	→	↑*	→	↑*	↑*
SKN-1Translokation in Kern unter Stress	↓*	→	→	↓*	↓*
GST-4 Expression unter Stress	↓	→	→	↓*	↓
GST-4 Expression unter Normalbedingungen	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*
Lebenspanne unter SKN-1 RNAi	→	→	→	→	↓*
vermutete vornehmliche Wirkmechanismen	Aktivierung von DAF-16, Modulation von SKN-1	Modulation von SKN-1	Aktivierung von DAF-16, antioxidative Eigenschaften, Modulation von SKN-1	antioxidative Eigenschaften, Modulation von SKN-1	Modulation von SKN-1, antioxidative Eigenschaften, Aktivierung von DAF-16

Tab. 4.1.: Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Wirkungen der Catechinderivate und vermutete Wirkmechanismen.
→: keine Veränderung durch Behandlung zur Kontrolle; ↑: Steigerung zur Kontrolle; ↓: Verminderung zur Kontrolle, *: Signifikanz durch unterschiedliche Signifikanztests

Viele Autoren unterstützen die These, dass die Radikalfängeraktivität nicht die alleinige Ursache für diese protektiven Eigenschaften ist (Bartholome et al., 2010; Abbas und Wink, 2010; Saul et al., 2010). ROS können direkt durch Radikalfänger (chemische Struktur) oder indirekt durch Beeinflussung von Signalkaskaden abgefangen werden. In welchem Ausmaß nun diese beiden vom Verständnis her unterschiedlichen Ansatzpunkte *in vivo* konkret zusammenspielen, ist bislang nicht erforscht. Zieht man alle in dieser Arbeit untersuchten Wirkungen der

Catechinderivate in Betracht, ergibt sich ein inhomogenes Bild in den Wirkungsweisen (s. Tab. 4.1). Die Wirkungen der Catechinderivate auf *C. elegans* sind sehr differenziert zu betrachten, da kleinste Strukturveränderungen der Moleküle andere Wirkungsmechanismen mit sich bringen können. Während bei Catechin und EGC die DAF-16 Aktivierung ein möglicher Wirkungsmechanismus zu sein scheint, könnten bei ECG und EGCG die direkten antioxidativen Wirkungen eine größere Rolle spielen. Die Lebenspanneexperimente unter SKN-1-RNAi Bedingungen sind ein Indiz dafür, dass SKN-1 an den lebensverlängernden Wirkungen der Catechinderivate, v.a. EGCG beteiligt sein kann.

Inwiefern die antioxidativen Wirkungen von EGC, ECG und EGCG auf die von Modulation weiterer Signalkaskaden oder auf eine direkte Radikalfängeraktivität zurückzuführen sind, muß in weiteren Experimenten untersucht werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten protektive Eigenschaften von Catechin und seinen Derivaten in dem als Modellorganismus verwendeten Nematoden *C. elegans* nachgewiesen werden. Dabei stellt die für alle Derivate gezeigte Lebensverlängerung um bis zu 21 % den aussagekräftigsten Endpunkt gesundheitsförderlicher Wirkungen dar. Zudem konnte für EGC, ECG und EGCG eine Erhöhung der Resistenz gegen thermalen Stress sowie eine tendentielle Erhöhung gegen oxidativen Stress für alle Derivate nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen im Wesentlichen mit publizierten Daten für Catechin und EGCG überein (Brown et al., 2006; Zhang et al., 2008; Abbas und Wink, 2009; Saul et al., 2009). Auch konnten ähnliche protektive Eigenschaften für andere Flavonoide, wie z.B. dem Quercetin gezeigt werden (Kampkötter et al., 2007a; Wilson et al., 2006; Wu et al., 2002). Zudem wurde in dieser Arbeit Untersuchungen zu molekularen Wirkungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass alle Substanzen die Lipofuszinakkumulation hemmen und EGC, ECG und EGCG die ROS-Produktion unter thermalem Stress vermindern können. Zur weiterführenden Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Wirkmechanismen wurde die Reaktion von zwei Transkriptionsfaktoren (DAF-16 und SKN-1) und jeweils einem Zielgen (SOD-3 und GST-4) auf die Behandlung der Würmer beobachtet. DAF-16 transloziert in Folge der Behandlung mit den Flavonoiden vermehrt in den Zellkern und die Expression des Zielgens SOD-3 wird erhöht (Ausnahme: EC). Die durch oxidativen Stress (Juglon) induzierte Kernlokalisation des Transkriptionsfaktors SKN-1 wurde durch Catechin, ECG und EGCG vermindert. Die Expression des entsprechenden Zielgens GST-4 wurde durch die gleichen Substanzen reduziert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Flavonoide den Insulin-ähnlichen Signalweg (DAF-16) sowie Kontrollmechanismen des Phase II Metabolismus (SKN-1) beeinflussen können.

Um den direkten Einfluss der beiden Transkriptionsfaktoren auf die Flavonoid vermittelte Verlängerung der Lebensspanne zu untersuchen, wurden RNAi-Experimente durchgeführt. Im Gegensatz zu den nachgewiesenen lebensverlängernden Effekten aller untersuchten Substanzen kam es in den Kontrollen zu den RNAi-Experimenten (leer-RNAi) nur durch Behandlung mit Catechin und EGCG zu einer statistisch signifikanten Verlängerung der Lebensspanne. Diese Diskrepanz ist durch

geänderte Versuchsparametern (Temperatur, Bakterienstamm, Medium) begründet, so dass die lebensverlängernde Wirkung nur bei den Flavonoiden mit der stärksten Wirkung signifikant ausgeprägt war. Die Lebensverlängerung von *C. elegans* durch Catechin und EGC wurde im DAF-16-RNAi-Ansatz aufgehoben, hinweisend auf eine mögliche Mitbeteiligung von DAF-16 an den protektiven Effekten durch diese beiden Substanzen.

Zusammenfassend lassen sich für die Wirkungen von Catechin und seinen Derivaten in *C. elegans* ähnliche protekive Eigenschaften feststellen, wobei die Wirkungen von EGCG insgesamt am stärksten ausgeprägt sind, was seine Bedeutung als das am häufigsten untersuchte Catechinderivat unterstreicht. Auf molekularem Level lassen sich viele Unterschiede feststellen, so dass man nicht von einem einheitlichen Wirkmechanismus der Catechinderivate sprechen kann. Vielmehr muss jede Substanz einzeln betrachtet werden, so dass eine möglicherweise stark ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit in Bezug auf Wirkmechanismen keine zwingende Vergleichbarkeit mit sich bringt. Allerdings konnte mit vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass molekulare Ansatzpunkte solcher Naturstoffe vielfältig sind und direkte Radikalfängeraktivität zumeist nicht den alleinigen Wirkmechanismus für protektive Wirkungen darstellt.

6 Literatur

Abbas, S. und Wink, M. (2009) Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans. Planta Med*. 75(3):216-21

Abbas, S. und Wink, M. (2010) Epigallocatechin gallate inhibits beta amyloid oligomerization in *Caenorhabditis elegans* and affects the daf-2/insulin-like signaling pathway *Phytomedicine* 17(11):902-9

Alder, M.N., Dames, S., Gaudet, J., Mango, S. (2003) Gene silencing in *Caenorhabditis elegans* by transitive RNA interference *RNA* 9:25–32.

Altun, Z. F. und Hall, D. H. (2006) *Introduction to C. elegans anatomy. www.wormatlas.org.*

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 7915-22

An, J. H., Blackwell, T. K. (2003) SKN-i links *C.elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev* 17, 1882-1893

Anton, S., Melville, L., Rena, G. (2006) Epigallocatechin gallate (EGCG) mimics insulin action on the transcription factor FOXO1a and elicits cellular responses in the presence and absence of insulin. *Cell Signal* 19(2):378-83

Arts, I. C. W., van de Putte, B., Hollman, P. (2000) Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit Juices, and Chocolate Milk *J. Agric. Food Chem.* 48, 1752-1757

Babior, B.M. (1984) The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 73, 599-601

Balaban, R.S, Nemoto, S., Finkel, T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-95

Baretton, G.B., Kirkpatrick, C.J., Bültmann, B.D. (2004) Arteriosklerose – Atheroskleose. In: *Pathologie (Editor: Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.,U.)* Elsevier, München ISBN 3-437-42381-9: Seite 484-489

Bargmann, C., I., Hartwieg, E., Horvitz, H., R. (1993) Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in C. elegans. *Cell* 74(3):515–27.

Bartholome, A., Kampkötter, A., Tanner, S., Sies, H., Klotz, LO. (2010) Epigallocatechin gallate-induced modulation of FoxO signaling in mammalian cells and *C. elegans*: FoxO stimulation is masked via PI3K/Akt activation by hydrogen peroxide formed in cell culture. *ABB* 501, 58–64

Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78, 547-81

Beecher, G. R. (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J.Nutr.* 133, 3248S-3254S

Benedetti, M.G., Foster, A.L., Vantipalli, M.C., White, M.P., Sampayo, J.N., Gill, M.S., Olsen, A., Lithgow, G.J. (2008) Compounds that confer thermal stress resistance and extended lifespan. *Exp. Gerontol.* 43, 882–891.

Berdichevsky, A., Viswanathan, M., Horvitz, H.R., Guarente, L. (2006) *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell*, 125, 1165-77

Brenner, S. (1973) genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94

Baumeister, R., Schaffitzel, E., Hertweck, M. (2006) Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity . *J Endocrinol* 190, 191-202

Bock, K. W., Lilienblum, W., Fischer, G., Schirmer, G. und Bock-Henning, B. S. (1987) The role of conjugation reactions in detoxication. *Arch. Toxicol.* 60, 22-29

Bowerman, B., Eaton, B.A., and Priess, J.R. (1992). skn-1, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early *C. elegans* embryo. *Cell* 68, 1061–1075.

Brown, M. K., Evans, J. L. und Luo, Y. (2006) Beneficial effects of natural antioxidants EGCG and alpha-lipoic acid on life span and age-dependent behavioral declines in *Caenorhabditis elegans. Pharmacol. Biochem. Behav.* 85, 620-628

Brunk, U.,T., Terman, A,. (2002) Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med.* 1;33(5):611-9

Büchter, C. (2008) Einfluss der Flavonoide Myricetin, Catechin und Luteolin auf die Stressresistenz und Signaltransduktion in Caenorhabditis elegans, *Diplomarbeit*

Cao, Y., Cao, R. (1999) Angiogenesis inhibited by drinking tea *Nature* 398(6726): 381

Choi, J., Rees, H.D., Weintraub, S.T., Levey, A.I., Chin, L.S., Li, L. (2005) Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *J Biol Chem*, 280, 11648-55

Chow, H.H., Cai, Y., Alberts, D.S., Hakim, I., Dorr, R., Shahi, F., Crowell, J.A., Yang, C.S., Hara, Y. (2001) Phase I pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E. *Cancer Epidemiology, Biomarkers, and Prevention* 10 (1), 53–58.

Chow, H.H., Cai, Y., Hakim, I.A., Crowell, J.A., Shahi, F., Brooks, C.A., Dorr, R.T., Hara, Y., Alberts, D.S. (2003) Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clinical Cancer Research* 9 (9), 3312–3319.

Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 1, 47-95

Eckert, J., Deplazes, P. (2005) Helminthen. In: *Medizinsche Mikrobiologie (Editor: Kayser, F.)* Thieme, Stuttgart ISBN 3-13-444811-4: Seiten 641-667

Eisenberg, D.M., Davis, R.B., Ettner, S.L., Appel, S., Wilkey, S., Van Rompay, M. (1998) Trends in alternative medicine use in the United States, 1990–1997: results of a follow-up national survey. *JAMA* 280(18):1569–75.

Feinberg, E. H. and Hunter, C. P. (2003) Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* 301, 1545-7.

Finkel, T., Holbrook, N.J., (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature* 391, 806-11

Flanagan, S.W., Moseley, P.L., Buettner, G.R. (1998) Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Lett* 431, 285-6

Fraser, A. G., Kamath, R. S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M. and Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 408, 325-30

Frei, B. und Higdon, J. V. (2003) Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies. *J. Nutr.* 133: 3275S–3284S

Friedman, D. B. und Johnson, T. E. (1988) A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* 118, 75-86

Garigan, D., Hsu, A. L., Faser, A. G., Kamath, R.S., Ahringer, J., Kenyon, C. (2002) Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics*, 161, 1101-12

Gerstbrein, B. Stamatas, G., Kollias, N., Driscoll, M. (2005) In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans. Aging Cell,* 4, 127-37

Gill, M. S., Olsen, A., Sampayo, J. N., and Lithgow, G. J. (2003). An automated high troughtput assay for survival of nematode *Caenorhabditis elegans. Free Radic. Biol. Med.* 35, 558-565

Girotti, A. W. (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39, 1529-1542

Gottlieb, R.A. (2003) Cytochrome P450: major player in reperfusion injury. *Arch Biochem Biophys* 420, 262-7

Guo, S. and Kemphues, K. J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81,611-20

Guo, Q., Zhao, B.,L., Shen, S.,R., Hou, J.,W., Hu, J.,G., Xin, W.,J, (1999) ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim Biophys* 1427: 13–23

Graham, H. N. (1992) Green Tea Composition, Consumption, and Polychenol Chemistry. *Preventive Medicine* 21, 334-50

Grishok, A. (2005). RNAi mechanisms in Caenorhabditis elegans. *FEBS Lett* 579, 5932-9.

Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298–300

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 219, 1-14

Hayes, J. D., Flanagan, J. U. und Jowsey, I. R. (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev Pharmacol. Toxicol.* 45:51-88

Heffetz, D., Rutter, W.J., Zick, Y. (1992) The insulinomimetic agents H_2O_2 and vanadate stimulate tyrosine phosphorylation of potential target proteins for the insulin receptor kinase in intact cells. *Biochem J*, 288 (Pt 2), 631-5

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13, 572-584

Henderson, S.T., Johnson, T.E. (2001) daf-16 integrates developmental and enviromental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans. Curr Biol*, 11, 1975-80

Henderson, S.T., Bonafe, M., Johnson, T.E., 2006. daf-16 protects the nematode *Caenorhabditis elegans* during food deprivation. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci*. 61, 444–460.

Higdon, J. V. & Frei, B. (2003) Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43:89–143.

Honda, Y., Honda, S. (1999) The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J*, 13, 1385-93

Houthoofd, K., Vanfleteren, J.R. (2007) Public and private mechanisms of life extension in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Genet Genomics*, 277, 601-17

Inoue, H., Hisamoto, N., An, J.H., Oliveira, R.P., Nishida, E., Blackwell, T.K. and Matsumoto, K. (2005). The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes Dev*. 19, 2278–2283.

Ishii, N., Fujii, M., Hartman, P.S., Tsuda, M., Yasuda, K., Senoo-Matsuda, N., Yanase, S., Ayusawa, D., Suzuki, K. (1998). A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* 394, 694–697.

Johnson, T., E., de Castro, E, Hegi de Castro, S., Cypser, J., Henderson, S., Tedesco, P. (2001) Relationship between increased longevity and stress resistance as assessed through gerontogene mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Geronto.l* 36(10):1609-17.

Kaletta, T. und Hengartner, M. O. (2006) Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 387-399

Kamath, R. S. and Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in Caenorhabditis elegans. *Methods* 30, 313-21.

Kampkötter, A., Gombitang-Nkwonkam, C., Zurawski, R.F., Timpel, C., Chovolou, Y., Wätjen, W., Kahl, R. (2007a) Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism Caenorhabditis elegans. *Toxicology* 234, 113–123.

Kampkötter, A., Pielarski, T., Rohrig, R., Timpel, C., Chovolou, Y., Wätjen, W., Kahl, R. (2007b) The Ginkgo biloba extract EGb 761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans. Pharmacol. Res*. 55, 139–147.

Kampkötter, A., Gombitang Nkwonkam, C., Zurawski, R.F., Timpel, C., Chovolou, Y., Wätjen, W., Kahl, R., (2007c) Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans. Arch. Toxicol.* 81:849–858

Kampkötter, A.,Timpel, C., Zurawski, R. F.,Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P., Wätjen, W. (2008) Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B 149, 314–323

Kennedy, S., Wang, D. and Ruvkun, G. (2004) A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 427, 645-9.

Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., Tabtiang, R. (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366, 461-4

Kenyon, C. (2005). The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell*, 120, 449-60

Ketting, R., Fischer, S., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. und Plasterk, R. (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. G*enes & Dev,* 15:2654–2659

Klass, M. R. (1977) Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and enviromental factors influencing life span. *Mech Aging Dev,* 6, 413-429

Kuriyama, S., Shimazu, T., Ohmori, K., Kikuchi, N., Nakaya, N., Nishino, Y., Tsubono, Y., Tsuji, I. (2006) Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study. *JAMA, 296(10):*1255-65

Kuwabara, P. E. und O'Neil, N. (2001) The use of functional genomics in *C. elegans* for studying human development and disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 24, 127-138

Lee, M.J., Wang, Z.Y., Li, H., Chen, L., Sun, Y., Gobbo, S., Balentine, D.A. und Yang, C.S. (1995) Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. Cancer Epidemiol. *Biomarkers Prev.* 4, 393–399.

Libina, N., Berman, J.R., Kenyon, C. (2001) Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin /IGF-1 and germline signaling. *Nat. Genet*, 28, 139-45

Li, Y.M., Chan, H.Y., Huang, Y., Chen, Z.Y. (2007) Green tea catechins upregulate superoxide dismutase and catalase in fruit flies. *Mol Nutr Food Res*, 51, 546-54

Lin, K., Hsin, H., Libina, N., Kenyon, C. (2001) Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet*, 28, 139-45

Leiers, B., Kampkötter, A., Grevelding, C. G., Link, C. D., Johnson, T. E. und Henkle-Dührsen, K. (2003) A stress-responsive Glutathion S-Transferase confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans. Free Radic. Bio.l Med.*, Vol. 34, No. 11, pp. 1405–1415

Lu, R., Maduro, M., Li, F., Li, H. W., Broitman-Maduro, G., Li, W. X. and Ding, S. W. (2005) Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in Caenorhabditis elegans. *Nature* 436, 1040-3

Maeta, K., Nomura, W., Takatsume, Y., Izawa, S., Inoue, Y. (2007) Green tea polyphenols function as prooxidants to activate oxidative-stress-responsive transcription factors in yeasts. *Appl. Environ. Microbiol*. 73, 572–580.

Mandel, S., Youdim, M.B. (2004) Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 37 (3), 304–317.

Meinhard, M. (2004) RNA Interferenz – Hintergrund und Perspektiven.

Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M.S., Walker, D.W., Clayton, P.E., Wallace, D.C., Malfroy, B., Doctrow, S.R., Lithgow, G.J. (2000) Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 289, 1567-9

Medvedev, Z.A., (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 65, 375–398.

Mohri-Shiomi, A., Garsin, D., A. (2008) Insulin signaling and the heat shock response modulate protein homeostasis in the Caenorhabditis elegans intestine during infection *J Biol Chem* 4;283(1):194-201

Morris, B. J. (2005) A forkhead in the road to longevity: the molecular basis of lifespan becomes clearer. *J. Hypertens.* 23, 1285-1309

Mukai, D., Matsuda, N., Yoshioka, Y., Sato, M., Yamasaki, T. (2008) Potential anthelmintics: polyphenols from the tea plant *Camellia sinensis* L. are lethally toxic to *Caenorhabditis elegans*. *J Nat Med.* 62(2):155-9

O'Brien, P. J. (1991) Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 80, 1-41

Ogg, S.,Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.,I., Lee, L., Tissenbaum, H., A., Ruvkun, G. (1997) The Fork head transcription factorDAF-16 transduces insulin-likemetabolic and longevity signals in *C. elegans. Nature* 389: 994–999

Pan, T., Jankovic, J., Le, W., (2003) Potential therapeutic properties of green tea polyphenols in Parkinson's disease. *Drugs Aging* 20 (10), 711–721

Pickett, C. B. und Lu, A. Y. H. (1989) Glutathione S-Transferases: Gene Structure, Regulation and Biological Function. *Annu. Rev. Biochem.* 58 : 743-64

Pietsch, K., Saul, N.,Menzel, R., Stürzenbaum, S.R., Steinberg, C.E.W. (2009) Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology* 10: 565-578

Porta, E. A. (2002) Pigments in aging: an overview *Ann N Y Acad Sc.* 959:57-65

Reaume, A., Elliot, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferante, R. J., Siwek, D. F., Wilcox, H. M., Flood, G., Beal, M. F., Brown, R. H., Jr., Scott, R. W., Snider, W. D. (1996) Motor neurons in Cu/MnSOD-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature Genet*. 13, 43-47

Renaud, S., de Lorgeril, M. (1992) Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339, 1528-1526

Reddy, J.K., Rao, M.S. (1989) Oxidative DNA damage caused by persistent peroxisome proliferation: its role in hepatocarcinogenesis. *Mutat Res*, 214, 63-8

Rice-Evans, C. A, Miller, N. J., Pagana, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 933-56

Riddle, D.L.,Wood, W.B. (1988) The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Habor Laboratory Press. New York. 393-414

Sack, Maren (2008) Untersuchungen zu molekularen und protektiven Wirkungen von Quercetin in *Caenorhabtitis elegans*, Diplomarbeit

Sano, J., Inami, S., Seimiya, K., Ohba, T., Sakai, S., Takano, T., Mizuno, K., (2004) Effects of green tea intake on the development of coronary artery disease. *Circulation Journal* 68 (7), 665–670

Saul, N., Pietsch, K., Menzel, R., Steinberg, C.E.W. (2008) Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: is DAF-16 involved? *Mech. Ageing Dev.* 129, 611–613.

Saul, N., Pietsch, K., Menzel, R., Stürzenbaum, S.,R., Steinberg, C.,E. (2009) Catechin induced longevity in C. elegans: from key regulator genes to disposable soma. *Mechanisms of Ageing and Development* 130, 477–486

Scalbert, A. and Williamson, G. (2000) Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073S—2085S,

Schartl, M., (2009) *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen* Elsevier, München ISBN: 3437436902

Schierenberg, E. a. C., R. (1986). Der Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biologie in unserer Zeit* 16, 1-7.

Sies, H., (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem*. 215, 213-219

Sies, H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med*. 27, 916-921

Selkoe, D.J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741–766

Smith, J.V., Luo, Y. (2003) Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761. J. *Alzheimers Dis*. 5, 287–300.

Steiner, F.A., Okihara, K.L., Hoogstrate S.W., Sijen, T., Ketting, R.F. (2009) RDE-1 slicer activity is required only for passenger-strand cleavage during RNAi in *Caenorhabditis elegans. Nat Struct Mol Bio* 16(2):207-11

Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H. and Mello, C. C. (2002) The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in C. elegans. *Cell* 109, 861-71

Tachibana, H. (2011) Green tea polyphenol sensing. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B 87*

Tawe, W. N., Eschbach, M. L., Walter, R. D. und Henkle-Dührsen, K. (1998) Identification of stress-responsive genes in *Caenorhabditis elegans* using RT-PCR differential display. *Nucleic Acids Res* 26, 1621-1627

The C.elegans Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018

Timmons, L. and Fire, A. (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854

Tijsterman, M., May, R. C., Simmer, F., Okihara, K. L. and Plasterk, R. H. (2004) Genes required for systemic RNA interference in Caenorhabditis elegans. *Curr Biol* 14, 111-6.

Tullet J. M., Hertweck, M., An, J. H., Baker, J., Hwang, J. Y., Liu, S.,Oliveira, R. P., Baumeister, R., Blackwell, T.K. (2008) Direct Inhibition of the Longevity-Promoting Factor SKN-1 by Insulin-like Signaling in *C. elegans*. *Cell*, 132, 1025-38

Voisine, C., Varma, H., Walker, N., Bates, E. A., Stockwell, B. R. und Hart, A. C. (2007) Identification of potential therapeutic drugs for huntington's disease using *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE.* 2(6), e504

Watzl, B., Rechkemmer, G. (2001) Flavonoide. Ernährungs-Umschau 48 Heft 12, 498-502

Walter, P.,L., Kampkötter, A., Eckers, A., Barthel, A., Schmoll, D., Sies, H., Klotz, L.,O.(2006) Modulation of FoxO signaling in human hepatoma cells by exposure to copper or zinc ions. *Arch Biochem Biophys.* 15;454(2):107-13

Wilkins, C., Dishongh, R., Moore, S. C., Whitt, M. A., Chow, M. and Machaca, K. (2005) RNA interference is an antiviral defence mechanism in Caenorhabditis elegans. *Nature* 436, 1044-7.

Williamson, G., Manach, C., (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 243S–255S.

Wilson, M.A., Shukitt-Hale, B., Kalt, W., Ingram, D.K., Joseph, J.A., Wolkow, C.A. (2006) Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans. Aging Cell* 5, 59–68

Wolff, S., Ma, H., Burch, D., Maciel, G.A., Hunter, T., Dillin, A. (2006) SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity. *Cell* 124, 1039–1053.

Wu, Z., Smith, J.V., Paramasivam, V., Butko, P., Khan, I., Cypser, J.R., Luo, Y., (2002) Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Cell. Mol. Biol.* (Noisy-le-grand) 48, 725–731.

Yang, C.S., Maliakal, P., Meng, X., 2002. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology* 42, 25–54.

Zaveri, N.T. (2006) Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life sciences* 78:2073-2080

Zern, T.L. und Fernandez, M.L. (2005) Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr*, 135, 2291-4

Zhang, L., Jie, G., Zhang J. und Zhao, B. (2008) Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Free Radic Biol Med.* 1;46(3):414-21

Zhang, Q., Kelly, A.P., Wang, L., French, S.W., Tang, X., Duong, H.S., Messadi, D.V., Le, A.D. (2006) Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit mast cell-stimulated type I collagen expression in keloid fibroblasts via blocking PI-3K/AkT signaling pathways. *J Invest Dermatol*, 126, 2607-13

Zheng, H., Weiner, L.M., Bar-Am, O., Epsztejn, S., Cabantchik, Z.I., Warshawsky, A., Youdim, M.B., Fridkin, M. (2005) Design, synthesis, and evaluation of novel bifunctional iron-chelators as potential agents for neuroprotection in Alzheimer's, Parkinson's, and other neurodegenerative diseases. *Bioorganic Medicinal Chemistry* 13 (3), 773–783

7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. rer. nat. Andreas Kampkötter für die Vergabe des Promotionsthemas bedanken. Nicht nur in den acht Monaten der experimentellen Durchführung der Versuche im Institut für Toxikologie im Wintersemester 2008/2009, sondern auch in der nachfolgenden Zeit bis zur Fertigstellung der Dissertation haben mir die vielen Ratschläge, Anregungen und Diskussionen sehr weitergeholfen, sodass ich mich jederzeit sehr gut betreut gefühlt habe.

Frau Prof. Dr. med. Regine Kahl und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gerhardt Fritz danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation im Institut für Toxikologie durchzuführen.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die freundliche Bereitschaft, sich als Koreferrent zur Verfügung zu stellen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Besonders möchte ich Herrn Christian Limper und meinem Bruder Lukas für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Meinen Eltern danke dafür, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht haben und mich in allen Lebenslagen unterstützen.

8 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname Unterschrift