

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

Auswirkungen von Quercetin auf den Insulin-ähnlichen Signalweg und
den Transkriptionsfaktor DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*

Dissertation

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

vorgelegt von
Holger Bosbach
2014

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

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

Erstgutachter: PD Dr. rer.nat. Kampkötter
Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. Mathes

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	5
1.2 Flavonoide	6
1.2.1 Die Stoffklasse der Flavonoide	6
1.2.2 Quercetin	7
1.3 Alterung	9
1.4 Signalwege in <i>C. elegans</i>	11
1.4.1 Der Insulin-ähnliche Signalweg	12
1.4.2 Der JNK-Signalweg	14
1.4.3 Der p38-MAP-Kinase-Signalweg	15
1.5 Lipide	16
1.6 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Abkürzungen	20
2.2 Materialien	23
2.2.1 Chemikalien	23
2.2.2 Bakterienstämme	24
2.2.3 <i>C. elegans</i> Stämme	24
2.2.4 Medien	25
2.2.5 Lösungen und Puffer	26
2.2.6 Sonstige Materialien	28
2.2.7 Geräte	28
2.2.8 Computerprogramme	28
2.3 Methoden	29
2.3.1 Kultivierung von <i>C. elegans</i>	29
2.3.2 Kultivierung von <i>E. coli</i>	31
2.3.3 Behandlung mit Quercetin	32
2.3.4 Färbung mit Nil-Rot	33
2.3.5 RNAi-Behandlung	33

2.3.6 Messung der Lebensspanne	33
2.3.7 Fluoreszenzmikroskopische und densitometrische Untersuchungen	34
3 Ergebnisse	37
3.1 Wirkungen des Quercetins in festem Agar.....	37
3.1.1 Einfluss von Quercetin auf die Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16.....	37
3.1.2 Einfluss von Quercetin auf die Expression von SOD-3	38
3.2 Einfluss von Quercetin und verschiedener Mutationen im Insulin-Signalweg auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i>	39
3.2.1 Einfluss von ILS-Mutationen und RNAi auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i>	39
3.2.2 Einfluss von Quercetin auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i>	41
3.3 Einflüsse auf die Lipidakkumulation in <i>C. elegans</i>	44
3.3.1 Einfluss von Quercetin auf die Lipidakkumulation in <i>C. elegans</i>	44
3.3.1 Einfluss von ILS-Mutationen auf die Lipidakkumulation in <i>C. elegans</i>	46
3.4 Einfluss von Quercetin und ILS-Mutationen auf die Körpergröße von <i>C. elegans</i>	49
4 Diskussion	53
4.1 Lebensspannen.....	53
4.2 Effekt von Quercetin auf die Lokalisation von DAF-16.....	56
4.3 Einfluss von Quercetin auf die Expression von SOD-3	57
4.4 Einflüsse auf die Lipidakkumulation von <i>C. elegans</i>	57
4.4.1 Einflüsse von Signalproteinen auf die Lipidakkumulation	57
4.4.2 Einflüsse von Quercetin auf die Lipidakkumulation	60
4.5 Einflüsse auf die Körpergröße von <i>C. elegans</i>	62
5 Zusammenfassung	63
6 Literaturverzeichnis	64

1 Einleitung

1.1 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans ist ein ubiquitär in Böden gemäßigter Breiten vorkommender Wurm aus der Gruppe der Nematoden. In seiner natürlichen Umgebung ernährt er sich von Bakterien und erreicht eine Größe von etwa 1 mm.

Als Modellorganismus hat sich *C. elegans* im Labor bewährt, weil er ohne großen finanziellen Aufwand auf festem oder in flüssigem Nährmedium gehalten werden kann. Über die Nährmedien können Bakterien leicht als Nahrung appliziert werden. Aber auch Stoffe, die den Wurm in seinen Eigenschaften beeinflussen, können vor allem im Flüssignährmedium leicht aufgenommen werden und so einen Effekt erzielen. Weil durch den

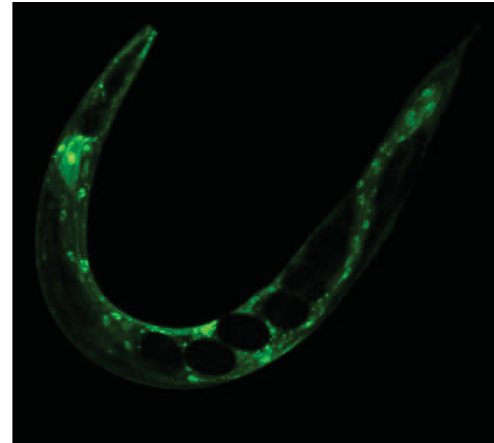
Hermaphroditismus des Wurms rezessiv vererbte Mutationen bei den Nachkommen persistieren, bietet *C. elegans* gute Voraussetzungen für genetische Studien. Die kurze Lebensspanne von ca. 20 bis 30 Tagen und die hohe Anzahl an Nachkommen – ein Wurm legt im Laufe seines Lebens etwa 300 Eier – erlaubt die Durchführung von Studien über die Beeinflussung von Lebensspannen in relativ kurzer Zeit. Aus diesem Grund ist *C. elegans* auch als Modell für Studien über den Mechanismus des Alterns gut geeignet. Da die Würmer transparent sind, lassen sich mit Hilfe von *in vivo* Markern, wie GFP oder bestimmten Farbstoffen, sehr gut biologische Prozesse bestimmten Regionen des Organismus zuordnen. Aber auch quantitative Untersuchungen zu Stoffwechselprozessen lassen sich anhand der Intensität der Anreicherung dieser Marker leicht abschätzen.

Die Bedeutung von *C. elegans* für die Grundlagenforschung wird dadurch hervorgehoben, dass für Arbeiten an *C. elegans* bereits drei Nobelpreise verliehen wurden:

2002 erhielten Sydney Brenner, John Sulston und Robert Horvitz den Nobelpreis für Medizin: Brenner etablierte *C. elegans* als Labororganismus, Sulston entdeckte die Apoptose und Horvitz konnte für die Apoptose verantwortliche Gene identifizieren. Somit leisteten sie einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung von Mechanismen der Organogenese.

2006 wurde der Nobelpreis für Medizin an Andrew Z. Fire und Craig C. Mello für ihre Entdeckung der RNA-Interferenz verliehen: Wird doppelsträngige RNA in Zellen von *C. elegans* injiziert, so wird die dazu passende mRNA vom Organismus abgebaut. Es kann also gezielt mRNA zerstört und somit die Synthese des von dieser mRNA kodierten Proteins

Abb. 1.1: *C. elegans*



Adulter Wurm mit an den Transkriptionsfaktor DAF-16 gekoppeltem GFP

ausgeschaltet werden. Somit entsteht der gleiche Phänotyp wie bei Mutanten mit einer Minderfunktion in dem durch diese RNA kodierten Protein.

2008 ging der Nobelpreis für Chemie an Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Y. Tsien für die Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Die Gensequenz für GFP kann in andere Gene eingebracht werden, sodass der Organismus Proteine synthetisiert, die an GFP gekoppelt sind. Somit werden diese Proteine im Organismus unter Fluoreszenzlicht sichtbar.

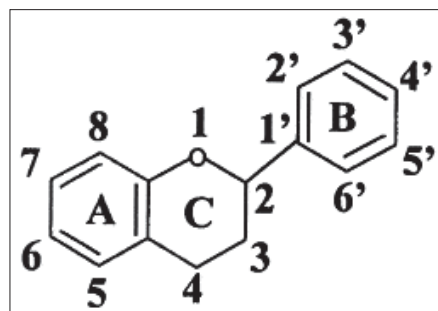
Das Genom von *C. elegans* wurde 1998 vollständig sequenziert, womit dies erstmals bei einem Vielzeller gelang (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

1.2 Flavonoide

1.2.1 Die Stoffklasse der Flavonoide

Flavonoide sind sekundäre Pflanzenstoffe aus Gruppe der Polyphenole, die dort in zahlreichen Zellen vorkommen. Die chemische Grundstruktur der Flavonoide besteht aus zwei aromatischen Ringen (A und B in Abb. 1.2) sowie einem O-heterozyklischen Ring (C), dem so genannten Flavangerüst. Aufgrund der unterschiedlichen Strukturen des heterozyklischen Rings können die Flavonoide in sechs Gruppen unterteilt werden: Flavonole, Flavanole, Flavanone, Flavone, Anthocyane und Isoflavonoide. Innerhalb dieser sechs Gruppen entstehen in den Pflanzen u.a. durch

Abb. 1.2: Flavangerüst



Flavonoide bestehen aus einem heterozyklischen Ring (C) sowie zwei aromatischen Ringen (A und B) (nach Heim et al., 2002)

Hydroxylierung, Methylierung, Sulfatierung und Glycosylierung zahlreiche verschiedene Derivate, sodass unter den Flavonoiden über 4000 verschiedene Substanzen beschrieben wurden (Heim et al., 2002). Aufgabe der Flavonoide in den Pflanzen ist der Schutz vor UV-Strahlung und schädlichen Insekten oder Würmern (Harborne & Williams, 2000).

Die bei solchen Schädigungen entstehenden freien Radikale (reaktive Sauerstoffspezies, ROS) können durch Flavonoide stabilisiert werden. Hierbei sind vor allem die Anzahl und die Position von OH-Gruppen oder Brenzcatechin-Ringen entscheidend. Diese Substituenten dienen als Protonendonatoren für die ROS, wobei die Radikale stabilisiert werden und ein wenig reaktives Flavonoid-Radikal entsteht. Je mehr OH-Gruppen ein Flavonoid besitzt, desto größer ist seine antioxidative Kapazität, wobei vor allem die Position am B-Ring eine wichtige Funktion zu erfüllen scheint (Heim et al., 2002). Neben der direkten Wirkung als Antioxidanzien wird aber auch eine Interaktion von Flavonoiden mit Proteinen

unterschiedlicher Wege der Signaltransduktion beschrieben. Somit sind sie in der Lage, an der Modulation der Genaktivität teilzuhaben (Bartholome et al., 2010; Grünz et al., 2012, Pietsch et al., 2012).

Allerdings werden auch zytotoxische Effekte und Interaktionen mit Arzneimitteln durch Flavonoide beschrieben. So tritt bei Aufnahme sehr hoher Dosen von Flavonoiden eine stärkere Generierung von ROS auf. Dies geschieht auch, wenn bereits geringere Dosen von Flavonoiden in der Zelle mit Eisen- oder Kupferionen in Kontakt treten. Durch diesen Effekt werden DNA-Strangbrüche induziert, was zur vorzeitigen Apoptose der Zelle führt. Eine weitere zytotoxische Eigenschaft von einigen Flavonoiden ist die Interaktion mit Proteinen der mitochondrialen Membran, was zu einem Zusammenbruch des Membranpotenzials und somit zu einer Dysfunktion der Mitochondrien führt. Im Endeffekt wird auch über diesen Mechanismus Apoptose induziert. Diese an sich negativen Effekte könnten allerdings bei der Bekämpfung maligner Zellen in der Chemotherapie von Krebspatienten einmal von positiver Bedeutung sein. Zahlreiche Flavonoide beeinflussen sowohl den Phase-I- als auch den Phase-II-Metabolismus in der Leber, indem sie Cytochrom-P450-Enzyme, Glutathion-S-Transferase oder UDP-Glucosyltransferase inhibieren. Wiederum andere Flavonoide sind in der Lage, diese Enzyme zu induzieren. Daraus können Interaktionen mit anderen Arzneimitteln entstehen, die dann langsamer, bzw. rascher abgebaut und somit in ihrer Wirkung geändert werden (Galati & O'Brien, 2004). Zusammengefasst gilt für die Wirkung der Flavonoide, was für beinahe alle Substanzen gilt: bei sehr großen Dosierungen treten die unerwünschten Wirkungen stärker hervor. Die tägliche Aufnahme von Flavonoiden unterliegt starken regionalen Unterschieden und schwankt zwischen ca. 14 bis 24,5 mg in den USA (Yochum et al., 1999, Sesso et al., 2003) und 102 mg in Schottland (Duthie et al., 2003). Sie hängt vor allem von den Ernährungsgewohnheiten der Bevölkerung ab. In den meisten pflanzlichen Nahrungsmitteln sind Flavonoide enthalten, besonders hohe Mengen kommen in Petersilie, grünem Tee, Blaubeeren und Zitrusfrüchten vor (Graf et al., 2005). In einer großen prospektiven Kohortenstudie konnte nachgewiesen werden, dass die Aufnahme flavonoidhaltiger Nahrungsmittel das Risiko sowohl für kardio- also auch für zerebrovaskulär bedingte Todesfälle verringert, wobei die Höhe der Risikoreduktion mit der Menge an in der Nahrung enthaltenen Flavonoiden korreliert (McCullough et al., 2012). Auch für den Diabetes mellitus Typ2 konnte ein verringertes Risiko durch Aufnahme von Flavonoiden gezeigt werden (Wedick et al., 2012).

1.2.2 Quercetin

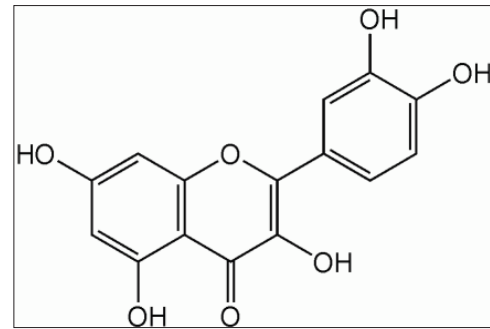
Quercetin ist das am häufigsten in der Nahrung vorkommende Flavonoid. Ihm wird eine mehr als sechsmal größere antioxidative Kapazität als der Referenzsubstanz Trolox zugesprochen (Boots et al., 2008). Russo et al. beschreiben in einem Review von 2012

zahlreiche Wirkungen des Quercetins sowohl aus *in-vitro*-Studien und Tierversuchen als auch aus klinischen Studien: Dass Quercetin ein antikanzerogenes Potential besitzt, konnte an zahlreichen Zelllinien gezeigt werden. In diesen Studien führte eine Exposition der Zellen gegenüber Quercetin zu einer Wachstumshehmung. Auch eine Hemmung der Telomerase konnte nachgewiesen werden. Telomerase ist ein Enzym, das die Telomere

am Ende der DNA verlängert und somit eine größere Zahl an Zellteilungen ermöglicht. Weitere Ergebnisse zahlreicher Studien zeigen eine Induktion der Apoptose, eine Induktion der Autophagozytose, die Stimulierung der NK-Zellen und damit die Aktivierung des körpereigenen Immunsystems gegen Krebszellen sowie eine Hemmung der Angiogenese (Russo et al., 2012).

Ein potenzielles zukünftiges Einsatzgebiet des Quercetins als Pharmakon besteht auch in der Therapie des metabolischen Syndroms, der Volkskrankheit der Industrienationen. Das metabolische Syndrom besteht aus einer Kombination von Bluthochdruck, Adipositas, Dyslipidämie und Diabetes mellitus. Durch das Vorliegen mehrerer kardiovaskulärer Risikofaktoren entsteht beim metabolischen Syndrom eine inflammatorische Gefäßreaktion, die schließlich im Verschluss des Gefäßes endet und in eine Minderversorgung des hinter diesem Verschluss liegenden Gewebes mündet. Sind beispielsweise Gefäße des Herzens betroffen, kann bei diesem Prozess ein Herzinfarkt entstehen. *In vitro* konnte eine Verminderung inflammatorischer Proteine wie TNF- α , Interleukine oder Cyclooxygenasen durch Quercetin nachgewiesen werden. Eine weitere Folge der Entzündungsreaktion der Gefäßwand ist die Aktivierung von Thrombozyten. Dabei wird Thromboxan freigesetzt, was zu einer Vasokonstriktion führt und die weitere Aggregation von Thrombozyten fördert. Im Tierversuch am Kaninchen konnte die Hemmung der Thromboxansynthese durch Quercetin gezeigt werden (Peluso, 2006). In weiteren Tierversuchen an Ratten konnte dem Quercetin die Senkung des Triglycerid-, LDL- und VLDL-Cholesterinspiegels nachgewiesen werden, ebenso eine Erhöhung des protektiven HDL-Cholesterins. Auch wurde ein vasodilatatorischer Effekt beschrieben sowie eine Senkung des Arterioskleroserisikos. Beim gesunden Menschen zeigte eine Einnahme von Quercetin keine akute Wirkung, allerdings wurde das Langzeitrisiko für mit KHK assoziierte Todesfälle gesenkt. Bei vom metabolischen Syndrom betroffenen Patienten konnten mit Quercetin der systolische Blutdruck sowie die LDL-Plasmakonzentrationen gesenkt werden (Peluso, 2006). Daneben wurde auch das Risiko gesenkt, am Bronchialkarzinom sowie an Asthma bronchiale zu erkranken (Knekt et al., 2002).

Abb. 1.3: Chemische Struktur von Quercetin



Wie jedes Arzneimittel besitzt Quercetin auch nicht erwünschte Wirkungen: *In vitro* konnte dem bei der Oxidierung von Quercetin entstehenden Quercetin-Quinon eine Veränderung von Proteinen durch Arylierung von Thiolgruppen nachgewiesen werden. Dieser Effekt wurde allerdings bis jetzt *in vivo* noch nicht beobachtet. Ratten, die mit einer täglichen Dosis Quercetin von 2g pro kg Körpergewicht gefüttert wurden, entwickelten eine schwere chronische Nephropathie und tubuläre Neoplasien. Auch bei Menschen konnte eine Nephrotoxizität nachgewiesen werden, allerdings nur bei einmal wöchentlich intravenös verabreichten Dosen von mehr als 50 mg pro kg Körpergewicht. Bei oraler Einnahme wurde dieser Effekt nicht nachgewiesen (Russo et al., 2012).

Für Quercetin konnte bei *C. elegans* eine Verlängerung der Lebensspanne um 19 % nachgewiesen werden (Kampkötter et al., 2008), bei *S. cerevisiae* sogar um 60 % (Belinha et al., 2007). Auch wirkt es sich positiv auf die Resistenz gegenüber oxidativem und thermalem Stress aus (Belinha et al., 2007; Kampkötter et al., 2007). Neben einer direkten antioxidativen Wirkung des Quercetins wird auch ein Einfluss auf die Genexpression in *C. elegans* vermutet. Bestärkt wurde diese Vermutung dadurch, dass Quercetin zu einer Verdreifachung der Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors DAF-16 führt, der zahlreiche antioxidative Schutzmechanismen aktivieren kann (Kampkötter et al., 2007 & 2008). Eine quercetinbedingte Verlängerung der Lebensspanne konnte dann auch durch Mutation in den Genen *daf-2*, *age-1*, *unc-43* und *sek-1* rückgängig gemacht werden (Pietsch et al., 2009), was dafür spricht, dass Quercetin über diese Gene eine Lebensverlängerung in *C. elegans* bewirkt. Eine Metaanalyse zahlreicher Arbeiten legt den Schluss nahe, dass Quercetin vor allem über die Beeinflussung des *insulin-like signalling* und des p38-MAP-Kinase-Signalwegs zu einer lebensverlängernden Wirkung führt (Pietsch et al., 2012).

1.3 Alterung

Alterung ist definiert als ein Prozess, bei dem mit zunehmendem Alter eine eingeschränkte Leistungsfähigkeit eines Organismus oder einer Zelle auftritt und somit ein langsamer Funktionsverlust resultiert (Hughes & Reynolds, 2005).

Es existieren zahlreiche Theorien, wie Alterung entsteht. Grundlage dieser Theorien sind Beobachtungen aus der Evolutionsforschung. So entsteht ein hohes Alter aufgrund eines mit zunehmendem Alter nachlassenden Selektionsdrucks. Die Individuen, die das fortpflanzungsfähige Alter erreicht haben, überleben und vermehren sich. Gene, die im frühen Lebensalter einen schädlichen Effekt ausüben, führen zu einem frühzeitigen Versterben, verhindern somit die Fortpflanzung und werden dadurch ausselektiert. Dementsprechend können Gene, die einen schädlichen Effekt erst nach dem Eintritt in das fortpflanzungsfähige Alter ausüben, überleben und so einen Funktionsverlust des Organismus bewirken. Die Folge von solchen Mutationen ist definitionsgemäß ein

Alterungsprozess. Andere Mutationen können auch im Laufe des Lebens durch diverse schädigende exogene Einflüsse (z.B. UV-Licht) erworben worden sein. Man spricht in diesem Zusammenhang von einer Akkumulation von Mutationen. Diese Anhäufung von DNA-Schäden sorgt schließlich für einen Funktionsverlust und damit für eine Alterung der Zellen (Halaschek-Wiener et al., 2005).

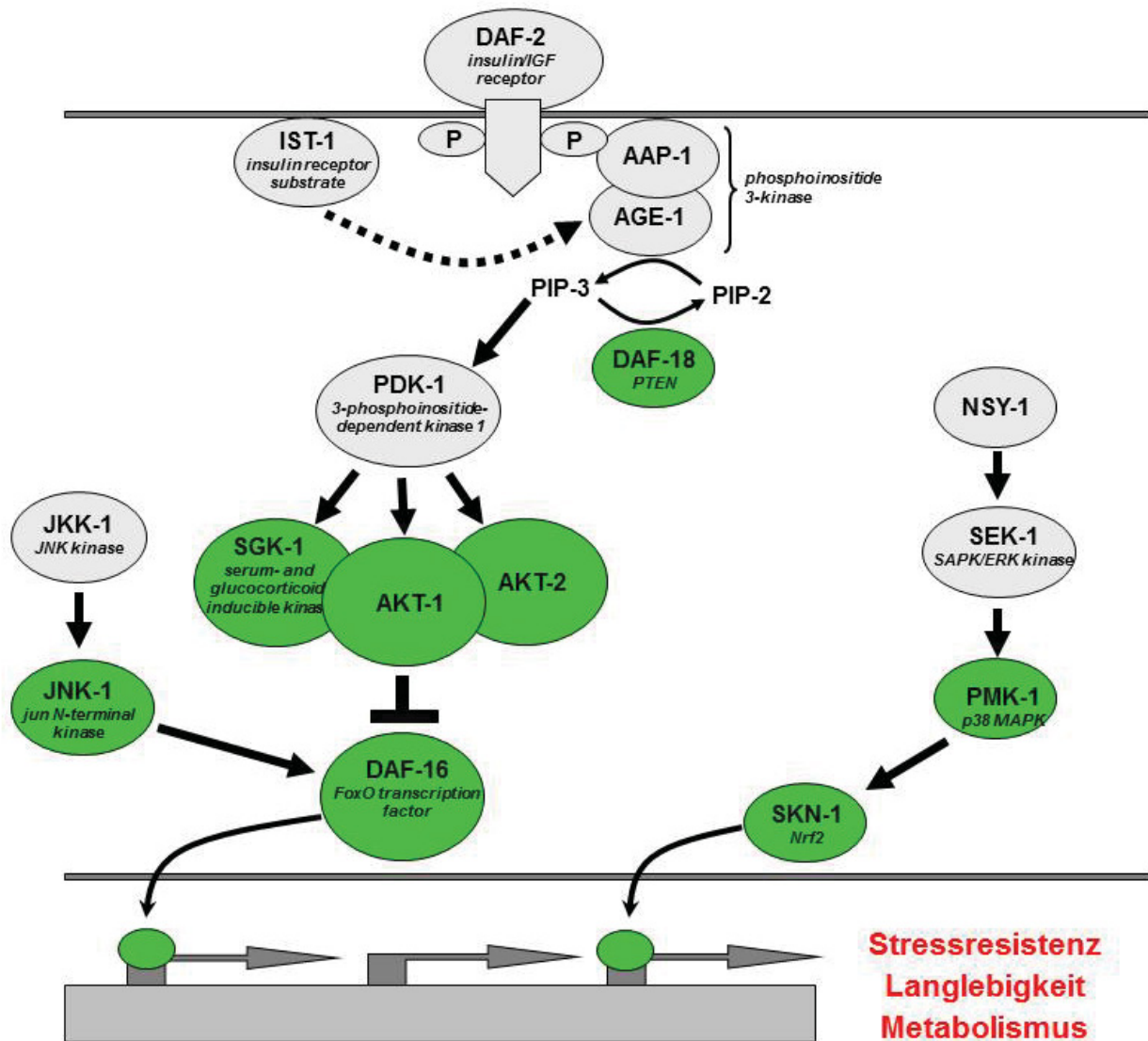
Gene, die für eine gesteigerte Reproduktion und gleichzeitig für den Zeitraum nach der Reproduktionsfähigkeit für eine beschleunigte Alterung sorgen, setzen sich gegenüber solchen Genen durch, die zwar für Langlebigkeit, aber gleichzeitig für eine geringere Zahl an Nachkommen verantwortlich sind. Dies ist ein weiterer Grund für das Entstehen von Alterungsprozessen. Hierbei spricht man von der Theorie der Antagonistischen Pleiotropie. Eine Variante dieser Theorie ist die *Disposable Soma Theory*, die besagt, dass Energie und Ressourcen entweder für die Reproduktion oder für die Aufrechterhaltung der somatischen Zellen des existierenden Organismus benutzt werden können. Nach dieser Theorie setzt sich dasjenige Genom während der Evolution durch, das bei minimalem Aufwand einen Organismus so lange wie möglich funktionsfähig halten kann und dabei gleichzeitig für eine größtmögliche Anzahl an Nachkommen sorgt. Eine gemeinsame Schlussfolgerung all dieser Theorien ist, dass im Sinne der Evolution die Produktion von Nachkommen einem langen Leben vorgezogen wird (Hughes & Reynolds, 2005).

Mechanistische Modelle betrachten die in Zusammenhang mit Alterung beobachteten Prozesse auf Zellebene. Eine wichtige Rolle bei Alterungsprozessen wird der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zugeschrieben. Diese entstehen bei der Zellatmung in den Mitochondrien durch Reduktion von Sauerstoff und können zur Peroxidation von Lipiden oder Nitrierung von Proteinen führen. Beide Mechanismen führen zu einem strukturellen Schaden der Zelle, der bei längerer Dauer zu deren Funktionsverlust führen kann (Finkel & Holbrook, 2000; Hughes & Reynolds, 2005; Halaschek-Wiener et al., 2005). In diesem Zusammenhang können auch Signalkaskaden einen großen Effekt auf die Alterung der Zellen besitzen, so z.B. der Insulinsignalweg. Werden Abwehrmechanismen gegen die ROS in Form von antioxidativen Enzymen heraufreguliert, entstehen weniger zelluläre Schäden und *C. elegans* lebt länger (Braeckman & Vanfleteren, 2006; Kennedy, 2008). Umgekehrt zeigt sich eine verkürzte Lebensspanne, wenn solche Gene, wie z.B. für Superoxid-Dismutase-3 (SOD-3) oder Glutathion-S-Transferase-4 (GST-4), weniger stark exprimiert werden (Murphy et al., 2003). Desweiteren wird die Lebensspanne auch durch hormonelle Interaktionen gesteuert (Van Gilst et al., 2005; Braeckman & Vanfleteren, 2006) sowie bei der Inhibierung mitochondrialer Gene verlängert (Rea et al., 2007). Eine verminderte Aufnahme von Nahrung („Kalorienrestriktion“) geht ebenfalls mit einer verzögerten Alterung einher (Hughes & Reynolds, 2005; Bishop & Guarente, 2007; Rea et al., 2007). Auch für dieses Phänomen scheint es einen separaten Signalweg zu geben (Rea et al., 2007).

Im Sinne der *Disposable Soma Theory* bewirken viele dieser Signalkaskaden allerdings auch häufig eine Reduktion der Reproduktionsfähigkeit (Hughes & Reynolds, 2005).

1.4 Signalwege in *C. elegans*

Abb. 1.4: Signalwege in *C. elegans*



Dargestellt sind von links nach rechts der JNK-Signalweg, der Insulin-ähnliche Signalweg und der p38-MAP-Kinase-Signalweg. Die obere horizontale Linie soll die Zellmembran, die untere horizontale Linie die Kernmembran darstellen. Die Proteine, mit denen sich diese Arbeit beschäftigt, sind grün dargestellt.

1.4.1 Der Insulin-ähnliche Signalweg

Der Insulin-ähnliche Signalweg – im Englischen *insulin-like signalling* (ILS) genannt und daher im Folgenden mit „ILS“ bezeichnet – ist ein hoch konservierter Signalweg, der in verschiedenen Spezies von Säugetieren, Insekten und Würmern sehr ähnlich aufgebaut ist und zum Großteil die gleichen Aufgaben erfüllt. Der ILS im eigentlichen Sinne hat seinen Anfang im, zum Insulin-Rezeptor der Säugetiere homologen, Rezeptorprotein DAF-2 (Kimura et al., 1997). DAF-2 phosphoryliert und aktiviert eine Phosphoinositid-3-Kinase, deren wesentlicher Bestandteil AGE-1 ist. AAP-1 und IST-1 sind Co-Substrate des Insulin-Rezeptors DAF-2 und verstärken die Wirkung von AGE-1. Sie sind allerdings nicht zwingend notwendig für die Aktivierung von AGE-1 (Wolkow et al., 2002). Das aktivierte AGE-1 sorgt für die Bildung von Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat (PIP-3) aus PIP-2. PIP-3 ist für die Funktion der PIP-3-abhängigen Kinase PDK-1 notwendig. Das PTEN-Homolog DAF-18 spaltet PIP-3 zu PIP-2 und antagonisiert somit die Wirkung von AGE-1 (Ogg & Ruvkun, 1998). In Anwesenheit von PIP-3 kann die PIP-3-abhängige Kinase PDK-1 nun die Proteinkinasen AKT-1, AKT-2 und SGK-1 phosphorylieren (Paradis et al., 1999), die ihrerseits dann eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors DAF-16 vornehmen und damit dessen Kernlokalisierung und im weiteren Verlauf die Induktion DAF-16-abhängiger Gene verhindern (van der Heide et al., 2004; Hertweck et al., 2004; Braeckman & Vanfleteren, 2006). Ist DAF-16 im Kern lokalisiert, hat dies noch nicht automatisch eine Aktivität des Transkriptionsfaktors zur Folge. Der *host cell factor 1* (HCF-1) kann im Zellkern einen Komplex mit DAF-16 bilden und diesen dann inhibieren (Li et al., 2008). Neben dem Weg über DAF-2, AGE-1 und die AKT-Kinasen kann DAF-16 auch durch zahlreiche weitere Proteine aktiviert oder inhibiert werden, deren Signalwege selber noch nicht vollständig aufgeklärt sind. So scheint zum Beispiel die TOR-Kinase die AKT-Kinasen ebenfalls zu phosphorylieren (Jones et al., 2009; Robida-Stubbs et al., 2012). Auch der weiter unten erläuterte JNK-Signalweg endet bei DAF-16 (Oh et al., 2005).

Der ILS ist für die Regulation einer Vielzahl von Genen mit verschiedensten Aufgaben zuständig. Fehlt der Rezeptor DAF-2 durch Mutation, so kann man eine mehr als doppelt so lange Lebensspanne von *C. elegans* beobachten (Kenyon et al., 1993; Perez & Van Gilst et al., 2008). Auch eine erhöhte Resistenz gegen pathogene Keime wie *P. aeruginosa* wurde beschrieben (Evans et al., 2008). Außerdem wird durch DAF-2 die Synthese zahlreicher Proteine induziert, die an der Neutralisierung von ROS, am Phase-2-Metabolismus und an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind (Depuydt et al., 2013). Die zu DAF-2 antagonistisch wirkende Lipidphosphatase DAF-18 verlängert die Lebensspanne (Dorman et al., 1995), was auch durch die verkürzte Lebensspanne bei einer Mutation in diesem Gen gezeigt werden konnte (Larsen et al., 1995; Murakami & Johnson, 1996). Veränderte Lebensspannen im Vergleich zum Wildtyp wurden auch bei durch Mutationen oder durch RNAi verringerter Aktivität in anderen Genen des ILS festgestellt: Eine Mutation im *age-1*-Gen führt ebenso zu einer Verlängerung der Lebensdauer (Morris et al., 1996) wie eine

Mutation im *sgk-1*- (Hertweck et al. 2004; Hamilton et al. 2005) oder *akt-1*-Gen (Paradis & Ruvkun, 1998; Hamilton et al. 2005; Braeckman & Vanfleteren, 2006). Obwohl die drei Proteinkinasen AKT-1, AKT-2 und SGK-1 den Transkriptionsfaktor DAF-16 inhibieren, zeigen sich doch unterschiedliche Effekte bei einer Mutation in diesen Genen. Während die verlängerte Lebensspanne bei einer *sgk-1*-Mutation am stärksten ausgeprägt ist, scheint die vorwiegende Aufgabe von AKT-1 die Regulation des Zustands der Dauerlarve zu sein. Bei einer Mutation entstehen zu 100 % Dauerlarven (Hertweck et al., 2004). Bei einer *sgk-1*-Mutation hingegen entwickeln sich nur 50 % der Würmer zu Dauerlarven. Die Aufgabe von AKT-2 ist noch nicht eindeutig beschrieben, die Proteinkinase scheint einerseits bei der Bildung von Dauerlarven eine Rolle zu spielen (Braeckman & Vanfleteren, 2006), andererseits wurden bei einer *akt-2*-Mutation auch schon phänotypisch normale Würmer mit einer nur geringfügig verlängerten Lebensspanne beschrieben (Hertweck et al., 2004). Auch bei der Infektabwehr scheinen die drei Proteinkinasen unterschiedliche Rollen zu spielen: während bei einer *sgk-1*-Mutation keine veränderte Resistenz gegen eine Infektion mit *P. aeruginosa* festgestellt werden konnte, ist diese bei einer *akt-1*- und *akt-2*-Mutation erhöht. Passend dazu ist auch die Expression antimikrobieller Enzyme bei einer *sgk-1*-Mutation nicht verändert, bei den AKT-Kinasen hingegen ist sie erhöht (Evans et al., 2008). Auf Stoffwechselebene wurden SGK-1 und AKT-1 für eine Reduktion des Lipidspeichers verantwortlich gemacht (Soukas et al., 2009). Am besten beschrieben sind bisher die Wirkungen von DAF-16. Neben der verlängerten Lebensspanne konnte auch eine durch DAF-16 hervorgerufene erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress beobachtet werden (Honda & Honda, 1999). Zu diesen Phänotypen korrelierend wurden zahlreiche Gene beschrieben, deren Expression abhängig von DAF-16 reguliert wird. So induziert DAF-16 die für die Abwehr von oxidativem Stress wichtigen Gene für Superoxid-Dismutasen, Glutathion-S-Transferasen, Metallothioneine, Katalasen, Hitzeschock-Proteine und Cytochrom-P450 (McElwee et al., 2003; Braeckman & Vanfleteren, 2006). Daneben werden auch das für die Infektabwehr wichtige Lysozym und die im Lipid- und Hormonstoffwechsel eine Rolle spielenden Fettsäure-Desaturasen und Östradiol-17 β -Dehydrogenasen durch DAF-16 induziert (Murphy et al., 2003). Ein weiteres Indiz für eine Rolle von DAF-16 bei der Abwehr pathogener Keime ist die erhöhte Bildung von Infekt-assoziierten Proteinaggregaten im Darm von *C. elegans* bei Inaktivierung von DAF-16 mittels RNAi (Mohri-Shiomi & Garsin, 2008). DAF-16 hat in verschiedenen Geweben unterschiedliche Auswirkungen. So unterscheiden sich die Phänotypen in Bezug auf Lebensspanne, Bildung von Dauerlarven oder Expression von SOD-3 dadurch, dass DAF-16 in Muskel-, Nerven- oder Epidermiszellen in seiner Aktivität verändert wird (Libina et al., 2003). Der Grund dafür sind verschiedene Isoformen von DAF-16. Diese Isoformen verteilen sich in unterschiedlichem Maße in den Geweben. Sie haben gemeinsame aber auch unterschiedliche Effekte. So gibt es z.B. die Isoform DAF-16d/f, die besonders stark den Lipidmetabolismus beeinflusst und zum Abbau

von Speicherfett führt. Die Isoform DAF-16a verhindert v.a. die Bildung von Dauerlarven. Auch die Verlängerung der Lebensspanne ist bei den verschiedenen Isoformen unterschiedlich stark ausgeprägt. In der Abwehr von Hitzestress wirken die beiden Isoformen additiv (Kwon et al., 2010).

1.4.2 Der JNK-Signalweg

Der JNK-Signalweg ist nicht so gut untersucht wie der ILS. Dementsprechend konnte eine Signalkaskade vom Membranrezeptor bis zum Transkriptionsfaktor hier noch nicht aufgeklärt werden. Die c-Jun-N-terminale Kinase 1 (JNK-1) ist eine Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase), die DAF-16 direkt phosphoryliert und somit aktiviert (Oh et al., 2005). Im Gegensatz zu den AKT-Kinasen sorgt hier also eine Phosphorylierung für die nukleäre Translokation von DAF-16 und nicht für das Verbleiben des Transkriptionsfaktors im Zytosol. JNK-1 wird seinerseits von einer Proteinkinase, der JNK-Kinase-1 (JNK-1), phosphoryliert und somit aktiviert (Kawasaki et al., 1999; Wolf et al., 2008). Diese Aktivierung geschieht vor allem bei Exposition des Wurms gegenüber Stressstimuli wie Hitze, UV-Licht, hyperosmolaren Lösungen, cadmium- oder kupferhaltigen Nährböden und Lipopolysacchariden (Villanueva et al., 2001; Oh et al., 2005; Wolf et al., 2008). Die Expression von JNK-1 erfolgt ausschließlich in Neuronen von *C. elegans*, trotzdem kann JNK-1 auch auf die Lokalisation von DAF-16 in Darmzellen einwirken (Wolf et al., 2008).

Unter normalen Lebensbedingungen ist die Lebensspanne bei einer jnk-Mutation verkürzt. Dies geschieht in Abhängigkeit von DAF-16. Bei Hitzestress sorgt JNK-1 für eine vermehrte Kernlokalisierung von DAF-16 (Oh et al., 2005). Dementsprechend zeigen Mutanten bei Hitzestress von 36 °C eine kürzere Überlebenszeit als der Wildtyp und die Expression von SOD-3 ist reduziert (Wolf et al., 2008). Auch für die normale Entwicklung des Wurms in Nährböden, die Cadmium oder Kupfer enthalten, scheint JNK-1 verantwortlich (Villanueva et al., 2001). Unter Einfluss von Arsen sorgt JNK-1 für eine erhöhte Apoptoserate in Keimzellen (Pei et al., 2008). Aber auch für die Entwicklung der Neuronen und für den Ablauf eines physiologischen Bewegungsmusters ist JNK-1 zuständig. Es verhindert das unkontrollierte Wachstum und die Verzweigung von Neuronen, welche mit einer vorzeitigen Alterung des Wurms assoziiert sind (Tank et al., 2011). Die Fortbewegung von *C. elegans* wird durch eine Mutation im jnk-1-Gen so beeinflusst, dass die Amplitude der Schlängelbewegungen zunimmt und somit nur noch eine geringere Strecke in derselben Zeit zurückgelegt werden kann, wie bei einer normal großen Amplitude (Kawasaki et al., 1999). In der Fortpflanzung spielt JNK-1 ebenfalls eine Rolle. Eine jnk-1-Mutante produziert weniger Nachkommen und diese Nachkommen sind im Vergleich zum Wildtyp in ihrer Entwicklung verzögert (Wolf et al., 2008).

1.4.3 Der p38-MAP-Kinase-Signalweg

Bei *C. elegans* ist SKN-1 ein Transkriptionsfaktor, der sehr ähnliche Aufgaben wie der Säugetier-Transkriptionsfaktor Nrf-2 besitzt und in seiner Basensequenz eine hohe Übereinstimmung zu diesem zeigt (Walker et al., 2000). Aktiviert wird er durch die MAP-Kinase PMK-1 (Inoue et al., 2005; An et al., 2005). Sie ist ein Homolog der Säugetier-MAP-Kinase p38, da die Aminosäuresequenzen der beiden Kinasen zu 60 % übereinstimmen (Berman et al., 2001). PMK-1 wird von der Kinase SEK-1 phosphoryliert (Kim et al., 2002; Kondo et al., 2005), die wiederum von der Kinase NSY-1 phosphoryliert wird (Kondo et al., 2005).

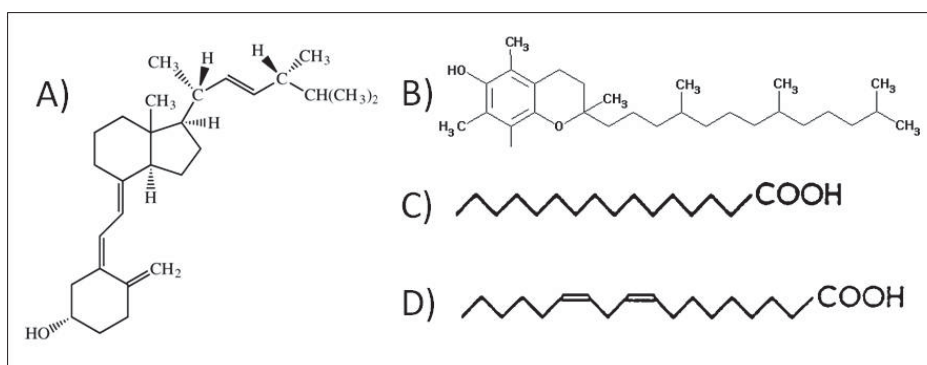
Durch diese Signalkaskade werden Lebensspanne, Stressreaktionen, Infektantworten und Gewebedifferenzierung gesteuert. So zeigen Würmer mit einer geringeren Aktivität von PMK-1 eine erhöhte Sensibilität bei Infektionen mit *P. aeruginosa* (Kim et al., 2002; Troemel et al., 2006), *Y. pestis* (Bolz et al., 2010) und *S. enterica*. Im Zusammenhang damit steht eine durch PMK-1 gesteuerte Apoptose von gonadalen Zellen, deren Wegfall bei pmk-1-RNAi zu einer erhöhten Sterblichkeit bei einer Infektion führt (Aballay et al., 2003). Bei der Immunantwort scheinen auch bestimmte Fettsäuren über eine Aktivierung von PMK-1 eine Rolle zu spielen. Fehlt beispielsweise durch eine Mutation Gamma-Linolensäure, so sind die PMK-1-Spiegel supprimiert und der Wurm ist anfälliger gegenüber Infekten. Wird diese Fettsäure hinzugefügt, so steigen die PMK-1-Spiegel an und der Wurm zeigt eine intakte Immunreaktion (Nandakumar & Tan, 2008). Ein weiterer Auslöser für die Aktivierung von PMK-1 ist oxidativer Stress (Inoue et al., 2005). Fehlt PMK-1, so ist der Wurm deutlich sensibler gegenüber ROS (Schmeisser et al., 2011). Auch bei hypoxischen Bedingungen wird PMK-1 verstärkt exprimiert, allerdings unabhängig vom Level der reaktiven Sauerstoffspezies (Hayakawa et al., 2011). Auch die von PMK-1 beeinflusste Proteinexpression konnte untersucht werden: Lysozym-, C-Typ-Lectin- und NPL-Gene werden durch aktives PMK-1 induziert (Troemel et al., 2006). Der Transkriptionsfaktor SKN-1 ist für eine normale Lebensspanne notwendig. Ist seine Aktivität reduziert, so leben die Würmer kürzer (An & Blackwell, 2003; Tullet et al., 2008; Okuyama et al., 2010). Oxidativer Stress sorgt für eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Inoue et al., 2005), der dann auch neben seinem normalen Expressionsort, den ASI-Neuronen, in Darmzellen exprimiert wird (An et al., 2003). SKN-1-Mutanten sind gegenüber oxidativem Stress sensibler als Wildtyp-Würmer (An & Blackwell, 2003). Auch die Expression der anti-oxidativen Enzyme CTL, CYP, GST und SOD wird durch SKN-1 reguliert (Park et al., 2009; Przybysz et al., 2009). Die Induktion der GST sorgt auch für eine gewisse SKN-1-abhängige Resistenz gegenüber Schwermetallen wie Quecksilber (Vanduyne et al., 2010). Ebenfalls spielt SKN-1 eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Resistenzen gegen Anthelmintika, was mit dessen Einfluss auf die Genexpression von Enzymen im Lebermetabolismus zusammenhängt (Cheo et al., 2012). Das durch Kalorienrestriktion beobachtete Phänomen der Langlebigkeit von *C. elegans* beruht

ebenfalls auf der Aktivierung von SKN-1. Einerseits wird dadurch die Expression von *gst-4* induziert (Onken & Driscoll, 2010), andererseits erhöht sich dadurch die Zellatmungsrate (Bishop et al., 2007). Eine weitere Aufgabe von SKN-1 ist die Regulation der Differenzierung mesodermalen Gewebes (Maduro et al., 2001). Fehlt SKN-1 in embryonalen Würmern, so bilden sich keine Pharynx- und Darmmukosazellen (Choe et al., 2012). Desweiteren wird die Ausbildung des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Darmmukosa von SKN-1 gesteuert (Li et al., 2011). Neben der Aktivierung über den oben beschriebenen p38-Signalweg gibt es noch zahlreiche andere Proteine, die SKN-1 aktivieren können, deren Signalwege aber nicht komplett aufgeklärt sind (Kell et al., 2007). Nicht nur exogene, sondern auch endogene Einflüsse sind für die Regulation des Transkriptionsfaktors zuständig. So beeinflusst Cholesterol ebenso die Expression von SKN-1 (Cheon et al., 2011) wie die Elongation der Proteinbiosynthese (Li et al., 2011).

1.5 Lipide

Die Lipide sind eine in ihrer chemischen Struktur sehr vielfältige Stoffklasse. Man unterscheidet einfache, nicht verseifbare Lipide und zusammengesetzte, verseifbare Lipide. Die nicht verseifbaren Lipide können unterteilt werden in Fettsäuren und Isoprenderivate (Abb. 1.5). Zu den Isoprenderivaten gehören die Terpene, zu denen das Tocopherol (Vitamin E) oder das Retinol (Vitamin A) zählen, und die Steroide, zu denen Cholesterin und die daraus synthetisierten Steroidhormone, aber auch Gallensäuren und Calciferole (Vitamin D) gehören.

Abb. 1.5: Nicht-verseifbare Lipide



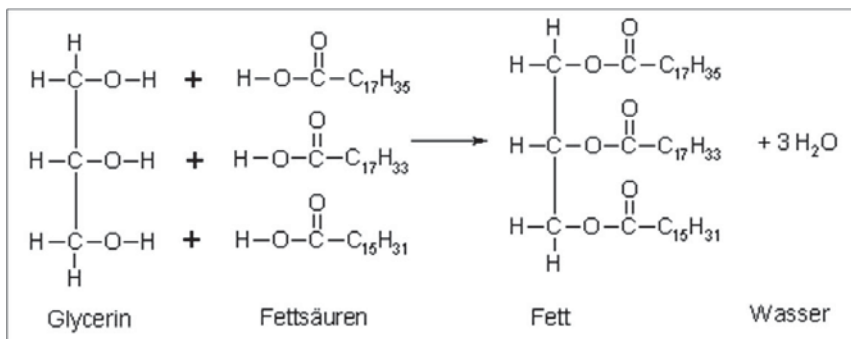
Terpene: A) α-Tocopherol, Steroide: B) Ergocalciferol, Fettsäuren:
C) Palmitinsäure (gesättigte Fettsäure), D) Linolsäure (ungesättigte Fettsäure)

Die Funktion dieser Lipide ist sehr vielfältig. So agieren Calciferol und seine Derivate als Hormone in der Regulation des Kalziumhaushalts. Die Steroidhormone übernehmen als Sexualhormone wichtige Aufgaben bei der Regulation von Wachstum und Entwicklung des

Körpers. Als Nebennierenrindenhormone sind sie essentiell bei der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts oder bei der Anpassung an auf den Organismus einwirkenden Stress. Die Gallensäuren spielen eine Rolle bei der Verdauung von fetthaltiger Nahrung und der Absorption fettlöslicher Stoffe im Darm. Retinole sind Bestandteil des Sehpigments der Sinneszellen der Retina, wo sie für die Umwandlung eines Lichtreizes in einen elektrischen Nervenimpuls mit verantwortlich sind. Außerdem sind sie von wichtiger Bedeutung bei der Regulation der Genexpression verschiedener Zellen und spielen somit eine große Rolle in der Differenzierung von Zellen, u.a. während der Embryogenese. Tocopherole dienen in den Zellen als Radikalfänger und schützen Lipide der Zellmembran vor Oxidation. Die Fettsäuren können bei der Beta-Oxidation in den Mitochondrien oxidiert werden, wodurch Energie in Form von ATP gewonnen werden kann. Aber auch sie spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, v.a. bei Entzündungsreaktionen, da aus ihnen die Mediatoren Prostaglandin und Leukotrien synthetisiert werden.

Die verseifbaren Lipide zeichnen sich dadurch aus, dass eine bis drei Fettsäuren oder Isoprenderivate mit einem Alkohol (Glycerin, Glycerin-3-Phosphat oder Sphingosin) verestert werden (Abb. 1.6). Dabei entstehen entsprechend Triacylglycerine, Phosphoglyceride oder Sphingolipide. Die zusammengesetzten Lipide besitzen einen hydrophilen Anteil, den Alkohol, und einen hydrophoben Anteil, die Fettsäure.

Abb. 1.6: Veresterung von Lipiden



Glycerin und 3 Fettsäuren reagieren unter Entstehung von Wasser zum Speicherfett Triacylglycerin.

Diese Eigenschaft macht die zusammengesetzten Lipide zu idealen Bausteinen der Lipiddoppelmembran, welche die Zelle nach außen hin abgrenzt. In den Lipidmembranen finden sich v.a. Phosphoglyceride und Sphingolipide. Die Triacylglycerine finden sich überwiegend in Fettzellen als Speicherfett und können zur Energiegewinnung der Zelle herangezogen werden (aus: Löffler & Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 7. Aufl., 2003).

Da die Lipide nicht wasserlöslich sind, müssen sie an Proteine gebunden werden, um mit dem Blut transportiert werden zu können. Diese Bindungsproteine werden als Lipoproteine bezeichnet und nach ihrer Dichte in 4 verschiedene Gruppen eingeteilt: Chylomikrone, *very-low-density-lipoproteins* (VLDL), *low-density-lipoproteins* (LDL) und *high-density-lipoproteins* (HDL). Der Lipidanteil am Gesamtgewicht der Proteine nimmt in der o.g. Reihenfolge ab, HDL enthalten also am wenigsten, Chylomikrone am meisten Lipide. Aber auch die Art der Lipide ist in den Lipoproteinen verschieden: Während mit den Chylomikronen und den VLDL überwiegend Triglyceride transportiert werden, ist der Cholesterinanteil in den LDL mit 50 % am höchsten (aus: Löffler & Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 7. Aufl., 2003).

Während hohe Serumspiegel an HDL das Risiko für eine koronare Herzerkrankung senken, sorgen erhöhte Konzentrationen von LDL und Triglyceriden im Serum für ein erhöhtes Risiko der Arteriosklerose. Davon sind v.a. die kardialen, zerebralen und peripheren Gefäße betroffen. Bei sehr hohen VLDL- und Triglyceridspiegeln ist auch das Pankreatitisrisiko erhöht. Neben erhöhten Serumlipiden birgt auch ein erhöhter Anteil an Körperfett bei der Adipositas zahlreiche Risiken: Adipöse Menschen erkranken häufiger an Bluthochdruck, Dyslipoproteinämien, Hyperurikämie und Gicht, Diabetes mellitus Typ 2, Fettleber, koronarer Herzerkrankung, Schlaganfall, Gallensteinen, Thrombosen sowie Arthrose.

Substanzen, mit denen ein erhöhter Lipidgehalt im Serum oder überschüssiges Fettgewebe reduziert werden können, würden einen hohen Beitrag zur Reduktion der Inzidenz der Volkskrankheit Adipositas leisten.

Auch bei *C. elegans* konnte ein Zusammenhang zwischen Fettstoffwechsel und Lebensspanne hergestellt werden. Fehlt beispielsweise das Enzym Fettsäure-Desaturase-3 (FAT-3), so kann der Wurm Fettsäuren ab einer Länge von über 18 C-Atomen nicht mehr synthetisieren und die Lebensspanne ist verkürzt (Hillyard & German, 2009). Auch für eine Mutation im Gen *fat-6* konnte eine verringerte Lebensspanne bei gleichzeitig erniedrigten Lipidspeichern festgestellt werden (Horikawa et al., 2008). Umgekehrt kann allerdings nicht der Schluss gezogen werden, dass eine erhöhte Lipidsynthese die Lebensspanne zwangsläufig verlängert (Perez & Van Gilst, 2008). Paradoxe Weise zeigt sich bei Würmern, die mit wenig Nahrung, also unter der bereits oben erwähnten Kalorienrestriktion, aufgezogen wurden, eine verlängerte Lebensspanne, obwohl der Anteil des Fettspeichers bei diesen Würmern reduziert ist (Mörck & Pilon, 2007). Zu dieser Beobachtung passend konnte auch umgekehrt gezeigt werden, dass durch die antiserotonergen Antidepressiva Mianserin und Methiothepin das Körperfett der Würmer erhöht und gleichzeitig die Lebensspanne vermindert wurde (Zarse & Ristow, 2008).

1.6 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen weitere mögliche Mechanismen der Lebensverlängerung von *C. elegans* durch Quercetin dargestellt und diskutiert werden. Dies ergibt sich aus den oben beschriebenen Beobachtungen der Wirkung des Quercetins auf die Kernlokalisation von DAF-16 und der bereits identifizierten potenziellen Angriffspunkte des Quercetins.

So sollen mögliche Gene des ILS identifiziert werden, über die Quercetin eine Wirkung entfalten könnte.

Um die labortechnische Arbeit zu erleichtern, sollen auch methodische Veränderungen in der Aufzucht von *C. elegans* untersucht werden. So soll dargestellt werden, ob eine Exposition des Wurms mit Quercetin auf Festmedium eine Wirkung mit gleicher Stärke erzielt, wie in Flüssigmedium. Eine solche Haltung auf Festmedium hätte den Vorteil, dass der Wurm gegenüber Kontaminationen besser geschützt ist und damit das häufige Wechseln der Nährmedien reduziert werden könnte.

Aus den festgestellten Beobachtungen eines Zusammenhangs zwischen Fettstoffwechsel und Lebensspannen ergibt sich eine weitere interessante Fragestellung: Welchen Einfluss hat Quercetin auf den Fettstoffwechsel in *C. elegans* und wird dieser evtl. auch über Gene im ILS beeinflusst? Um diese Frage zu beantworten, soll untersucht werden, ob Quercetin den Gehalt an Speicherfett verändert, ob bestimmte Mutationen einen Einfluss auf den Lipidgehalt nehmen und ob Quercetin im Vergleich zum Wildtyp einen anderen Einfluss auf den Lipidgehalt in den Mutationen ausübt.

Aus der Beobachtung, dass die langlebige *sgk-1*-Mutante kleiner ist als der Wildtyp (Jones et al., 2009) und aus der Theorie der antagonistischen Pleiotropie ergibt sich die Fragestellung, ob Quercetin und/oder die Mutationen im ILS einen Einfluss auf das Wachstum und die körperliche Entwicklung von *C. elegans* ausüben und ob das Zusammenwirken zwischen Quercetin und einer Mutation eine Veränderung mit sich bringt.

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

AAK	<i>AMP-activated kinase</i>
AAP	<i>phosphoinositide adapter subunit</i>
Abb.	Abbildung
AGE	<i>ageing alteration</i>
AKT	AKT-Kinase
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
Aufl.	Auflage
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CTL	Katalase
CYP	Cytochrom P
DAF	<i>abnormal dauer formation</i>
d.h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d	Tage
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FAT	<i>fatty acid desaturase</i>
FoxO	<i>forkhead box protein O</i>
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
ILS	<i>insulin-like signalling</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IST	<i>insulin receptor substrate homolog</i>

h	Stunde
HCF	<i>host cell factor</i>
HDL	<i>high-density-lipoproteins</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSF	<i>heat shock factor</i>
JKK	JNK Kinase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
K	Kontrolle
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	koronare Herzkrankheit
LB	<i>lysogeny broth</i>
LDL	<i>low-density-lipoproteins</i>
Lsg.	Lösung
MAP	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPK	MAP Kinase
MgSO_4	Magnesiumsulfat
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
mM	millimolar
μM	mikromolar
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NGM	<i>nematode growth medium</i>
NGM-BS	NGM mit BSA
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NLP	<i>neuron like peptide</i>
NPL	<i>nuclear protein localization</i>
Nrf	<i>Nuclear factor-E2 related factor</i>
NSY	<i>neuronal symmetry</i>

OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
OH	Hydroxid
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit Tween
PDK	<i>phospholipid dependent kinase</i>
PIP-2	Phosphatidylinositolbiphosphat
PIP-3	Phosphatidylinositoltriphosphat
PMK	p38 MAP Kinase
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
Q	Quercetin
RFU	<i>relative fluorescent units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
s.	siehe
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
<i>S. enteric</i>	<i>Salmonella enterica</i>
SEM	<i>sex muscle abnormal</i>
s.g.	so genannt
SGK	Serum-Glukokortikoid regulierte Kinase
SKN	<i>skinhead</i>
SOD	Superoxid Dismutase
TNF- α	Tumornekrose-Faktor- α
TOR	<i>target of rapamycin</i>
Tub	<i>Tubby-related</i>
UDP	Uridindiphosphat
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	ultraviolett
v.a.	vor allem
VLDL	<i>very- low-density-lipoproteins</i>
<i>Y. pestis</i>	<i>Yersinia pestis</i>
z.B.	zum Beispiel

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

Name	Firma
Ammoniumchlorid	Merck
Ampicillin	Calbiochem
Bacto Agar	Becton Dickinson
Bacto Tryptone	Becton Dickinson
BSA	Calbiochem
Calciumchlorid	Merck
Cholesterol	Sigma
D(+)-Glucose	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
DMSO	Merck
EtOH, absolut	Merck
Hefeextrakt	Becton Dickinson
IPTG	Pomega
Juglone	Fluka Chemika
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Natriumchlorid	J.T. Baker
Natriumhydroxid	Merck
Natriumhypochlorit	ZCL
Quercetin	Sigma
Soja-Pepton	Fluka BioChemika
Streptomycinsulfat	Sigma
Tween 20	Biomedicals Inc.
Uracil	ICN Biomedicals

2.2.2 Bakterienstämme

E. coli – OP50

E. coli – OP50-1 (Streptomycinresistenz)

[Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota)]

Skn-1 RNAi-Bakterien

Daf-16 RNAi-Bakterien

Daf-18 RNAi-Bakterien

Empty vector RNAi-Bakterien

2.2.3 *C. elegans* Stämme

N2 – var. Bristol – Wildtyp

(Brenner, 1974)

RB759 – akt-1 (ok525) V – Deletion von 1251 bp des Gens akt-1

(OMRF Knockout Group; International *C. elegans* Gene Knockout Consortium; 2002)

VC204 – akt-2 (ok393) X – Deletion von 719 bp des Gens akt-2

(Mark Edgley; *C. elegans* Reverse Genetics Core Facility at UBC; International *C. elegans* Gene Knockout Consortium; 2002)

VC345 – sgk-1 (ok538) X – Deletion von 852 bp des Gens sgk-1

(Joanne Lau; *C. elegans* Reverse Genetics Core Facility at UBC; International *C. elegans* Gene Knockout Consortium; 2003)

KU25 – pmk-1 (km25) IV – Deletion von 852 bp des Gens pmk-1

(Kunihiro Matsumoto; 2006)

VC8 – jnk-1 (gk-7) IV – Deletion von 1186 bp des Gens jnk-1

(Vancouver KO Group; *C. elegans* Reverse Genetics Core Facility at UBC; International *C. elegans* Gene Knockout Consortium; 2000)

TJ356 – Transgen zls356 [daf-16::daf-16-gfp; rol6]
(Henderson & Johnson, 2001)

CF1553 – Transgen muls84 [sod-3::gfp]
(Libina et al., 2003)

Alle oben aufgeführten Stämme wurden über das Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota) bestellt. Für eine detaillierte Beschreibung der Stämme siehe auch:

<http://www.wormbase.org>

2.2.4 Medien

2.2.4.1 Medien zur Kultivierung von Bakterien

LB-Medium	5 g NaCl 10 g Bacto Tryptone 5 g Hefeextrakt 1 l dH ₂ O
LB-Medium-Zusätze	Ampicillin, Endkonzentration 30 µg/ml
LB-Agar	LB-Medium 15 g Bacto-Agar
LB-Agar-Zusätze	4 ml LB-Agar 50 µg/ml Ampicillin 10 µg/ml Tetracyclin
OP50-Minimalmedium	200 ml M9-Puffer 0,1 ml 2 M NH ₄ Cl 0,1 ml 20 % D-Glucose 20 µl 2 mg/ml Uracil
OP50-Minimalmedium-Zusätze	Streptomycin, Endkonzentration 50 µg/ml

2.2.4.2 Medien zur Kultivierung von *C. elegans*

NGM-Medium	3 g NaCl 2,5 g Soja-Pepton 1 L dH ₂ O autoklavieren und abkühlen 1 ml Lsg. A 0,5 ml Lsg. B 1 ml Lsg. C 25 ml Lsg. D
NGM-Agar	wie NGM-Medium, zusätzlich vor dem Autoklavieren 30 g Bacto-Agar dazu
10 x NGM-BS	10 g BSA 500 µl 100 mg/ml Streptomycin 100 mg NGM sterilfiltrieren
NGM-Amp + IPTG	1978 µl NGM-Medium 2 µl Ampicillin (100 µg/ml) 20 µl IPTG-Stammlsg.

2.2.5 Lösungen und Puffer

Bleiche-Lsg.	50 % 5 M NaOH 50 % Natriumhypochlorit
20 % D-Glucose	20 g D(+)-Glucose 100 ml dH ₂ O sterilfiltrieren Lagerung bei 4 °C
Juglone-Stammlsg.	10 mM Juglone in 96 % EtOH

Lsg. A	0,5 g Cholesterin 100 ml 96 % EtOH sterilfiltrieren
Lsg. B	27,8 g CaCl_2 250 ml dH_2O autoklavieren
Lsg. C	30,1 g MgSO_4 oder 61,1 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 250 ml dH_2O autoklavieren
Lsg. D	27,08 g KH_2PO_4 oder 9,1 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ 250 ml dH_2O autoklavieren
M9-Puffer	6 g Na_2HPO_4 3 g KH_2PO_4 5 g NaCl 0,25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1 L dH_2O autoklavieren
Natriumazid-Lsg.	200 mM Natriumazid in dH_2O 20 mM Natriumazid in dH_2O 2 mM Natriumazid in dH_2O
PBS-Puffer	1,36 mM NaCl 26 mM KCl 81 mM Na_2HPO_4 15 mM KH_2PO_4
Quercetin-Stammlsg.	100 mM in DMSO
2 mg/ml Uracil	0,2 g Uracil 100 ml dH_2O sterilfiltrieren

10 % Tween 20

10 ml Tween 20

100 ml dH₂O

IPTG-Stammlsg.

100 mM in dH₂O

PBST

0,2 ml 10 % Tween 20

1,8 ml PBS-Puffer

2.2.6 Sonstige Materialien

Petrischalen (35 x 10 mm)

Greiner

Petrischalen (60 x 15 mm)

Falcon 351016

Petrischalen (100 x 15 mm)

Falcon 351029

Immersionsöl

Zeiss; Immersol 518N

Objektträger (76 x 26 mm)

Engelbrecht Medizin- und Labortechnik
GmbH

Deckgläschen (18 x 18 mm)

Menzelgläser

Falcon Tubes (50 ml)

Falcon

2.2.7 Geräte

Fluoreszenzmikroskop

Axiolab [Zeiss]

Stereomikroskope

Stemi 2000-C [Zeiss]

L2 [Leica]

Zentrifugen

Microfuge R [Beckmann]

Minifuge 2 [Heraeus Christ]

Photometer

Labmda 5 UV/VIS Spectrometer [Perkin
Elmer]

Inkubator

Schüttelinkubator

2.2.8 Computerprogramme

Graphpad Prism 5

Image-Pro Plus

Lambda 25

MS Office

TINA 2.0

2.3 Methoden

2.3.1 Kultivierung von *C. elegans*

2.3.1.1 Kultivierung auf NGM-Agar

Für die Erhaltung der Wurmulturen wurden die *C. elegans*-Stämme getrennt voneinander in mit NGM-Agar gefüllten Petrischalen (Falcon 351029) gehalten. Als Nahrungsquelle diente eine *E. coli* OP50-Kultur. Die Petrischalen wurden maximal halbvoll mit noch flüssigem, heißem NGM-Agar gefüllt. Nach dem Abkühlen wurde der Agar mit 50-60 µl einer aufkonzentrierten *E. coli* OP50-Kultur bestrichen und für ca. 15-18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Wenn die Platten nicht sofort verwendet werden konnten, wurden sie bei 4 °C gelagert. Alle 4 Tage wurden ca. 20 Würmer mittels eines am Ende verbreiterten Platindrahtes (so genannter „Wurmpicker“) von einer alten auf eine neue Platte überführt. Somit konnten Hungerstress und eine zu hohe Populationsdichte vermieden werden. Die Lagerung der Wurmulturen erfolgte bei 20 °C.

2.3.1.2 Kultivierung in NGM-Flüssigmedium

Um die gleichmäßige Aufnahme eines zu applizierenden Stoffes zu gewährleisten, wurden die Würmer auch in Flüssigkulturen gehalten. Hierzu wurden 4 ml Flüssigmedium, zusammengesetzt aus NGM-BS, einer definierten Menge Bakterien (*E. coli* OP50-1 oder RNAi-Bakterien) von $2,5 \times 10^7$ /ml und dem gewünschten Stoff, in Petrischalen (35 x 10 mm) gegeben. Bei der Durchführung der Lebensspannenuntersuchung wurden die Würmer als junge Adulte (drei Tage alt) vom Fest- in das Flüssigmedium überführt, bei den übrigen Experimenten mit Quercetin-Behandlung wurden bereits die Eier in das Flüssigmedium gegeben. Da das Kontaminationsrisiko in der Flüssigkultur deutlich erhöht ist und sich die Kontamination im Gegensatz zur Platte auch diffus verteilen kann, wurde dem Flüssigmedium Streptomycin in Form von BSA + 10 x Streptomycin zugesetzt. Zusätzlich erfolgte ein Medienwechsel – wenn möglich – täglich, spätestens jedoch alle zwei Tage. Die Überführung der Würmer vom alten in das neue Medium erfolgte mit Hilfe einer Glaskapillare, in welche die Würmer aus dem alten Nährmedium eingesaugt und in das neue Medium ausgepustet wurden.

2.3.1.3 Semisynchronisation von *C. elegans*

Dieses Verfahren diente der Gewinnung von Eiern und damit von annähernd gleich alten Würmern in der Wurmkultur. Die Semisynchronisation basiert auf der Idee, dass alle nicht im Ei befindlichen Würmer abgetötet und aufgelöst werden. Nur die von der Eischale geschützten Embryonen überleben und sind damit in einem Zeitfenster von ca. 9 Stunden gleich alt. Dieses gleiche Alter ist wichtig, um Effekte aufgrund unterschiedlicher Entwicklungsstadien auszuschließen. Ebenfalls wurde die Semisynchronisation zur Beseitigung von Kontaminationen in der Wurmkultur auf der Agarplatte angewandt.

Zu Beginn der Semisynchronisation wurden die Kulturplatten mit 2 ml NGM zwei- bis dreimal abgespült und die dann im NGM befindlichen Würmer in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend sedimentierten die Würmer für ca. 5 Minuten, bis sie sich alle am Boden des Gefäßes befanden. Der Überstand wurde abgesaugt und das Gefäß auf 2 ml mit M9-Puffer aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde dann wiederholt, sodass sich evtl. vorhandene Kontaminationen soweit wie möglich reduzierten. Nach dem letzten Waschgang wurde der Überstand bis auf 0,5 ml abgesaugt und das Eppendorf-Gefäß auf 1 ml mit Bleiche-Lösung aufgefüllt. Unter Invertieren und Vortexen wurde so lange gewartet, bis in der Flüssigkeit keine Fragmente mehr mit bloßem Auge erkennbar waren (Dauer: ca. 5 Minuten). Dann wurde wieder mit M9-Puffer auf 2 ml aufgefüllt und das Eppendorf-Gefäß bei 4 °C und 2500 rpm für eine Minute zentrifugiert, sodass sich am Boden des Gefäßes ein kleines Eipellet bildete. Der Überstand wurde so weit wie möglich entfernt und das Eppendorf-Gefäß mit M9-Puffer auf 2 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation, gefolgt von erneuten Durchlauf dieses Wasch-Zentrifugations-Vorganges. Die Waschvorgänge nach dem Erhalt des Eipelllets dienten der Reduktion des Kontaminationsrisikos. Nach dem letzten Durchgang in der Zentrifuge wurde der Überstand bis auf einen Rest von ca. 200 µl abgesaugt und das Pellet im verbliebenen Restvolumen resuspendiert. Die so erhaltenen Eier wurden dann entweder auf die vorbereiteten NGM-Platten oder in das Flüssig-NGM gegeben.

2.3.1.4 Kryokonservierung von *C. elegans*

Die Würmer wurden mit S-Basal-Medium von der Agarplatte abgespült und in einem Volumen von 2 ml in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurde bei 5000 x g für eine Minute zentrifugiert, sodass ein Pellet entstand. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abpipettiert. Dann wurde 1 ml Einfriermedium dazu gegeben und das Pellet resuspendiert. In Kryoröhrchen wurden die Wurmulturen über Nacht bei -80 °C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff gegeben. Dort konnten sie gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut und auf Agarplatten überführt werden.

2.3.2 Kultivierung von *E. coli*

2.3.2.1 Kultivierung von OP50

Die OP50-Bakterien dienen den Würmern als Nahrungsquelle. Um neue Vorräte anzulegen, wurde aus einer OP50-Bakterienkultur ein Drei-Ösen-Ausstrich auf eine LB-Agarplatte vorgenommen und bei 37 °C für ca. 18 h inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Einzelkultur mit einer Platinöse in 200 ml OP50-Minimalmedium überführt. Dieses wurde dann wieder für ca. 18 h bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert, am folgenden Morgen für 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert (Minifuge 2 [Heraeus-Christ]) und der Überstand bis auf 7,5 – 10 ml verworfen. Die Bakterienpellets wurden anschließend resuspendiert und alle Proben in ein Falcon-Tube gegeben. Es folgte die Messung der optischen Dichte (OD) mit dem Photometer in unterschiedlichen Verdünnungsstufen und eine Umrechnung des erhaltenen Mittelwerts in die Bakterienkonzentration. Somit konnte man sicher sein, dass immer die gleiche Anzahl Bakterien von $2,5 \times 10^7$ /ml in die Wurm-Flüssigkulturen gegeben wurde. Schließlich wurde die Suspension aus dem Falcon-Tube in 2 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei 4 °C gelagert.

2.3.2.2 Kultivierung von OP50-1

Die OP50-1-Bakterien dienen ebenso wie die OP50-Bakterien als Nahrungsquelle für *C. elegans*. Der Vorteil dieses Bakterienstammes ist seine Resistenz gegen das Antibiotikum Streptomycin, das den Flüssigkulturen zur Reduktion des Kontaminationsrisikos zugesetzt wurde. Das Verfahren zur Kultivierung der OP50-1-Bakterien verlief identisch zu dem Vorgehen bei den OP50-Bakterien, mit der Ausnahme, dass dem OP50-Minimalmedium Streptomycin zugesetzt wurde (Endkonzentration 50 µg/ml).

2.3.2.3 Kultivierung von RNAi-Bakterien

Der Einsatz von Doppelstrang-RNA bildenden Bakterien als Nahrung diente dazu, den Abbau von mRNA der Transkriptionsfaktoren DAF-16 und SKN-1 sowie des Signalproteins DAF-18 zu induzieren. Die Kultivierung der RNAi-Bakterien erfolgte, indem zunächst ein Drei-Ösen-Ausstrich aus einer 30 µg/ml Ampicillin enthaltenden Flüssigkultur auf einen Selektionsagar mit 50 µg/ml Ampicillin und 10 µg/ml Tetracyclin gestrichen wurde. Die Platte wurde für etwa 18 h bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Vormittag wurde eine Einzelkolonie in 200 ml LB-Medium + 30 µg/ml Ampicillin gegeben und für ca. 18 h im Schüttelinkubator inkubiert. Dann wurde zur Plasmidinduktion IPTG dazu gegeben (Endkonzentration 1 mM) und eine

weitere Stunde im Schüttelinkubator inkubiert. Es folgten Zentrifugation, Dichtemessung und Aliquotierung in identischer Art und Weise wie bei den OP50-Bakterien.

2.3.3 Behandlung mit Quercetin

2.3.3.1 Flüssigmedium

Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Quercetin in einfachem NGM wurden die Experimente in Flüssigmedium mit NGM-BS durchgeführt. Hierzu wurde 10 x NGM-BS mit NGM 1:10 verdünnt. Die Quercetin-Konzentration betrug 100 μ M, d.h., 4 μ l 100 mM Quercetin-Lösung wurden mit NGM-BS und OP50-1-Kultur auf 4 ml aufgefüllt. Die Kontrollgruppe wurde in 4 ml Flüssigmedium mit 0,1 % DMSO gehalten. Die Quercetin-Behandlung in Flüssigkultur wurde bei den Experimenten zur Lipidakkumulation und zur Messung der Lebensspanne verwendet.

2.3.3.2 Festmedium

Zur Kultivierung auf Festmedium gehörten zwei Komponenten, die beide Quercetin in gleicher Konzentration enthalten sollten: Der Agar selber und die Bakteriensuspension, von der sich die Würmer ernährten. Das Versetzen des Agars mit Quercetin erfolgte, indem zunächst in eine Petrischale von 60 x 15 mm ein bestimmtes Volumen 100 mM Quercetin pipettiert wurde, das dann mit noch flüssigem, ca. 70 °C warmen NGM-Agar auf ein Gesamtvolumen von 4 ml aufgefüllt wurde. Da in unserem Institut bisher nur Erfahrungen mit Quercetin in Flüssigmedium gemacht wurden und wir somit keine Erfahrungen über geeignete Konzentrationen in Festmedium besaßen, wurden für die Experimente zur DAF-16-Lokalisation und zur SOD-3-Expression verschiedene Konzentrationen von 50, 100 und 200 μ M gewählt. Die Kontrollgruppe wurde auf mit 8 μ l DMSO versetztem NGM-Agar gehalten, was dem Quercetin-Volumen bei 200 μ M entspricht, bzw. einer DMSO-Konzentration von 0,2 %.

Auf jede Platte wurde ein Volumen von 40 μ l OP50-Bakterien + Quercetin ausgestrichen. Da ein solch kleines Volumen 100 mM Quercetin-Lösung nicht pipettiert werden konnte, musste die Stocklösung auf 1 mM herunter verdünnt werden. Das Quercetin-Volumen wurde dann mit der Bakteriensuspension auf 40 μ l aufgefüllt und auf die Platte gestrichen. Anschließend wurden die Platten für 15- 18 h bei 37 °C inkubiert.

Um einen Zerfall von Quercetin zu vermeiden, wurden diese Agarplatten jeweils frisch hergestellt und nicht vor der Verwendung mehrere Tage gelagert.

Bei Bedarf wurden die Würmer dann – wie in Kap. 2.3.1.1 beschrieben – auf dem Quercetin-haltigen Agar aufgezogen.

2.3.4 Färbung mit Nil-Rot

Nil-Rot ist ein *in-vivo*-Farbstoff, der Lipide anfärbt. Er wurde bei den Versuchen zur Bestimmung der Lipidakkumulation eingesetzt. Da das Hauptspeicherorgan für Fettgewebe bei *C. elegans* die Darmzellen sind, fand sich dort auch die stärkste Anfärbung. Die Färbung erfolgte in 4 ml Flüssigmedium, bestehend aus NGM-BS, 100 μ M Quercetin, $2,5 \times 10^7$ OP50-1/ml und 250 ng/ml Nil-Rot. In dieses Medium wurden die Würmer überführt und für 20 h inkubiert. Für die Experimente wurden folgende Stämme und RNAi-Behandlungen verwendet: N2, RB759, VC204, VC345, KU25, VC8, TJ356, DAF16-, SKN1- und leer-RNAi.

2.3.5 RNAi-Behandlung

Die RNAi-Behandlung von *C. elegans* (Wildtypstamm N2) in Flüssigmedium ist eine für unser Institut neue Methode. Bisher wurde das Verfüttern von RNAi-Bakterien nur auf Festmedium durchgeführt. Es wurden Bakterien mit Doppelstrang-mRNA verwendet, die in den Würmern die Reduktion der Expression der Transkriptionsfaktoren DAF-16 und SKN-1 sowie des Signalmoleküls DAF-18 bewirkten. Die Doppelstrang-mRNA wurde durch einfaches Füttern in die Würmer eingeschleust. Als Nährmedium wurde NGM-Amp + IPTG eingesetzt, wobei das IPTG die Plasmidinduktion gewährleistete. Da sich die RNAi-Behandlung gegen für die Entwicklung von *C. elegans* wichtige Proteine richtete und zur besseren Vergleichbarkeit der Würmer in gleichen Entwicklungsstadien untersucht werden sollten, wurde die Behandlung erst drei Tage nach Semisynchronisation, also mit Erreichen des L4-Larvenstadiums, gestartet. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Würmer mit $2,5 \times 10^7$ Bakterien/ml gefüttert. Die RNAi-Behandlung wurde bei den Experimenten zur Messung der Lebensspanne und zur Lipidakkumulation verwendet. Als Kontrolle diente hier ein Bakterienstamm, der einen nicht-kodierenden RNAi-Vektor exprimiert, also keinen Abbau von mRNA in *C. elegans* bewirkte.

2.3.6 Messung der Lebensspanne

Die Erfassung der Lebensspannen begann am dritten Tag nach der Semisynchronisation. Die Würmer befanden sich dann im L4-Larvenstadium und es konnte somit gewährleistet werden, dass nur solche Würmer für den Versuch gewählt wurden, die nicht schon vor dem Adultenstadium starben.

Der erste Schritt bestand darin, die Würmer mit M9-Puffer von der Platte zu spülen. Anschließend wurden ausreichend viele mobile und damit gesunde Exemplare mittels Glaskapillare in 2 ml PBST überführt. Die Würmer wurden dann erneut in eine zweite Petrischale mit 2 ml PBST gegeben. Diese Waschschriffe dienten der Verringerung des Kontaminationsrisikos. Anschließend wurden je nach Versuchsansatz 35 oder 40 Würmer in eine 35 x 10 mm Petrischale mit 4 ml Quercetin- bzw. DMSO-haltigem Flüssigmedium überführt. Dann wurden die Kulturen bei 20 °C gelagert. Es folgte ein täglicher Medienwechsel mit vorhergehendem zweifachem Waschgang in PBST und dabei die Auszählung der lebendigen und verstorbenen Würmer. Als tot wurden solche Würmer definiert, die sich auch während des zweiten Waschgangs bei Berührung mit einem Platindraht („*touch provoked movement*“, Lithgow *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2002; Gill *et al.*, 2003) nicht mehr bewegten. Die lebenden Exemplare wurden nach dem zweiten Waschgang in frisches Nährmedium überführt. Für die Lebensspannenanalysen wurden folgende Stämme verwendet: N2, TJ356, RB759, VC345, KU25 und die mit daf-16-, skn-1-, daf-18- und leer-RNAi behandelten N2-Würmer.

2.3.7 Fluoreszenzmikroskopische und densitometrische Untersuchungen

2.3.7.1 Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16

Der transgene Stamm TJ356 exprimiert ein Fusionsprodukt aus dem Transkriptionsfaktor DAF-16 und GFP. Zunächst wurde eine Platte voller Würmer des Stammes TJ356 semisynchronisiert. Die daraus gewonnenen Eier wurden auf eine Quercetin-haltige Agarplatte gegeben und bei 20 °C gelagert. Am dritten Tag hatten die meisten Larven das L4-Stadium erreicht und konnten mit M9-Puffer von der Platte abgespült werden. Aus dem Puffer wurden dann die L4-Larven mit einer Glaskapillare herausgesaugt und in einem Tropfen Puffer auf einen Objektträger überführt. Zu dem Tropfen wurden noch 8 µl 2 µM Natriumazid-Lösung hinzu pipettiert. Dies führte zu einer teilweisen Immobilisierung der Würmer, sodass diese unter dem Mikroskop besser beobachtet werden konnten. Für die Untersuchung der Wirkung von Quercetin auf die DAF-16-Lokalisation bei thermalem Stress wurden die Würmer vor der Auswertung für eine Stunde bei 37 °C im Puffer inkubiert. Bei Anregung mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 546 nm emittiert das GFP Licht mit einer Wellenlänge von 580 nm, welches sich dann mit dem Fluoreszenzmikroskop beobachten lässt. Dort erfolgte dann die Auswertung der DAF-16-Lokalisation. Dazu wurden die Würmer in drei Phänotypen unterteilt: Der Phänotyp mit zytosolischer DAF-16-Lokalisation enthielt nur gleichmäßig grün fluoreszierende Zellen, beim intermediären Phänotyp waren im grün

fluoreszierendem Zytoplasma auch einige grüne Kerne zu erkennen während der Phänotyp mit nukleärer DAF-16-Lokalisation grün fluoreszierende Kerne in dunklem Zytoplasma zeigte.

2.3.7.2 Expression des Enzyms SOD-3

Der transgene Stamm CF1553 exprimiert ein Fusionsprodukt aus dem Enzym SOD-3 und GFP. Zur Untersuchung der SOD-3-Expression wurden Würmer des Stammes CF1553 semisynchronisiert und die daraus gewonnen Eier drei Tage lang auf einer Quercetin-haltigen Agarplatte inkubiert. Ein Teil der L4-Larven wurde dann sofort fluoreszenzmikroskopisch untersucht, der andere Teil wurde einem Hitzestress von 37 °C eine Stunde lang ausgesetzt und konnte sich danach für zwei Stunden regenerieren, ehe er unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert wurde. Die Vorbehandlung vor dem Mikroskopieren war die gleiche wie beim Stamm TJ356, nur dass für das Fotografieren eine Natriumazid-Konzentration von 2 mM notwendig war, um die Würmer komplett zu paralysieren. Die Fotos wurden anschließend densitometrisch ausgewertet. Die Größe der optischen Dichte (OD) diente hierbei als Parameter der SOD-3-Expression: Je stärker die Fluoreszenz, desto größer die Expression des Enzyms. Da das Enzym SOD-3 vor Stress schützt, der bei Hitzebelastung entsteht, sollte durch den thermischen Stress die Expression der SOD-3 induziert werden. Die zwei Stunden Regeneration waren daher notwendig, um den Würmern genügend Zeit zu geben, das Enzym zu synthetisieren. Danach wurde die OD der fluoreszierenden Würmer gemessen, indem die Würmer einzeln abfotografiert und dann mit Hilfe des Computerprogramms TINA 2.0 densitometrisch vermessen wurden. Dazu wurde jeder Wurm mit dem Mousecursor umfahren. Das Programm ermittelte dann die Größe dieser umrandeten Fläche und deren OD. Von der OD wurde dann noch die OD des Hintergrundes abgezogen und man erhielt die reine OD des Wurmes.

2.3.7.3 Akkumulation von Lipiden

Für die Untersuchung der Lipidakkumulation gab es unterschiedliche Behandlungsschemata, eines für die Mutantenstämme und eines für die mit RNAi behandelten Würmer. Bei den Mutanten erfolgte die Quercetin-Behandlung der Würmer direkt nach der Semisynchronisation für drei Tage in NGM-BS. Am dritten Tag wurden die Larven für 20 h mit Nil-Rot gefärbt und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Um eine gleiche Inkubationszeit von Quercetin zu gewährleisten, wurde die Untersuchung unabhängig von den Entwicklungsstadien durchgeführt, d.h., die Würmer der unterschiedlichen Stämme befanden sich nach drei Tagen nicht alle im L4-Stadium, bzw. befanden sich am Tag der Auswertung nicht alle im jungen Adultenstadium. Um eine normale Entwicklung der Würmer

zu gewährleisten, wurden die Eier vor der RNAi-Behandlung zunächst auf Agarplatten überführt, auf der die Larven dann drei Tage bis zum L4-Stadium heranwachsen konnten. Dann wurden sie in das Flüssigmedium, das die RNAi-Bakterien enthielt, gesetzt und mit 100 μ M Quercetin, bzw. 0,2 % DMSO für drei Tage behandelt. Anschließend wurden dem Nährmedium 250 ng/ml Nil-Rot hinzugefügt. Bei Bestrahlung der mit Nil-Rot behandelten Würmer mit Licht von 365 nm Wellenlänge emittiert der Farbstoff Licht von 395 nm Wellenlänge. Dies kann wiederum unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Nach 20 h Inkubationszeit mit Nil-Rot erfolgte die Auswertung wie bei der Messung der SOD-3-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie und Densitometrie. Hierbei wurde die OD als Maß für den Lipidgehalt in den Würmern verwendet: je größer die OD, desto höher der Anteil an akkumulierten Lipiden im Wurm.

2.3.7.4 Größenentwicklung

Um zu sehen, ob das Quercetin einen Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung der Würmer hat, wurde gleichzeitig mit der densitometrischen Auswertung auch die Größe der Würmer ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkungen des Quercetins in festem Agar

3.1.1 Einfluss von Quercetin auf die Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16

Der Transkriptionsfaktor DAF-16, ein Ortholog der humanen FoxO-Transkriptionsfaktoren, steht am Ende des Insulin/IGF-1 ähnlichen Signalwegs und übt in phosphoryliertem Zustand transkriptionsaktivierende Funktionen aus. DAF-16 wird nur bei inaktivem Insulin/IGF-1-ähnlichem Signalweg phosphoryliert und transloziert dann in den Kern. Ist der Signalweg aktiviert, liegt DAF-16 unphosphoryliert im Zytosol vor.

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von DAF-16 durch das Flavonoid Quercetin zugunsten einer Kernlokalisierung verschoben werden kann (Kampkötter et al., 2008; Sack, 2008). Diese Versuche wurden allesamt in NGM-Flüssigmedium durchgeführt, was zwar eine gleichmäßige Konzentration des Quercetins im Medium und somit seine gleichmäßige Aufnahme durch die Würmer gewährleistete, jedoch in der Handhabung der Kulturen deutlich aufwändiger und kontaminationsanfälliger war, als die Haltung der Wurmulturen auf Festmedium (NGM-Agar).

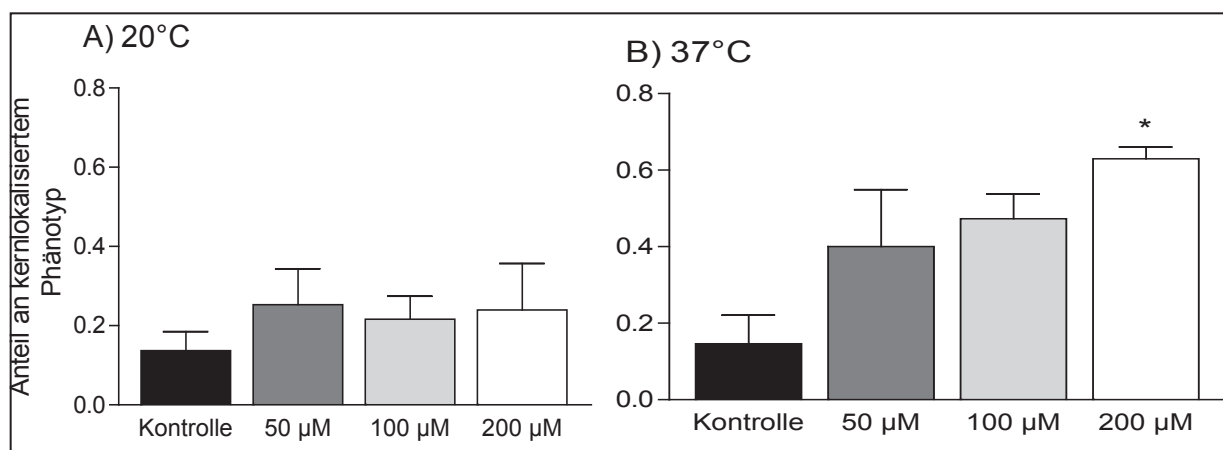
Ob ein ähnlicher Einfluss des Quercetins auf die Lokalisation von DAF-16 auch auf Agar-Platten erreicht werden konnte, wurde untersucht, indem das Quercetin in unterschiedlichen Konzentrationen dem noch flüssigen Agar vor dem Aushärten hinzugefügt wurde. Somit entstanden Platten mit unterschiedlichen Quercetin-Konzentrationen, die dann mit *E. coli* inkubiert wurden. Die Bakteriensuspension enthielt die gleiche Quercetin-Konzentration wie die jeweilige zu inkubierende Platte (s. Kap. 2.3.3.2). Das weitere Vorgehen wird in Kap. 2.3.7.1 beschrieben. Die Versuche wurden bei 20 °C und unter thermischem Stress bei 37 °C durchgeführt. Bei normalen Bedingungen zeigte sich eine leichte Tendenz zur erhöhten Kernlokalisierung von DAF-16. In der Kontrollgruppe zeigten im Mittelwert knapp 14 % der Würmer eine Kernlokalisierung, bei den mit Quercetin behandelten Würmern wurde bei ca. 22 bis 25 % eine Kernlokalisierung beobachtet. Deutlichere Unterschiede zeigten sich bei der Gruppe, die unter Hitzestress gestellt wurde. Hier erhöhte sich der Anteil der Kernlokalisationen von ca. 15 % in der Kontrolle auf 40 % bei 50 µM Quercetin, ca. 47 % bei 100 µM Quercetin und auf 63 % bei 200 µM Quercetin (s. Abb.3.1).

3.1.2 Einfluss von Quercetin auf die Expression von SOD-3

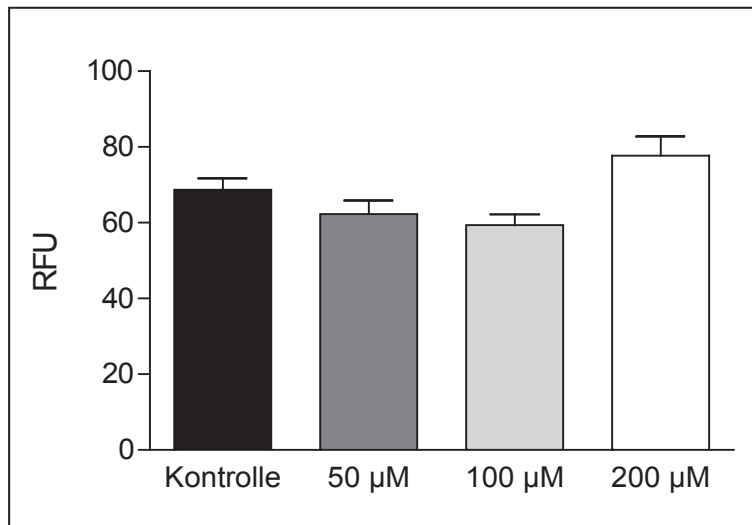
Die Superoxid-Dismutase (SOD) ist ein Enzym, das für den Abbau von Sauerstoffradikalen zuständig ist und somit dazu beiträgt, oxidativen Stress in der Zelle zu reduzieren. Seine Expression wird durch den aktivierten Transkriptionsfaktor DAF-16 erhöht. Eine erhöhte Stressresistenz durch Expression von SOD wird in zahlreichen Arbeiten beschrieben (Samuelson et al., 2007; Honda et al., 2008). Auch konnte nachgewiesen werden, dass unter Quercetin die Resistenz gegenüber oxidativem Stress zunimmt, sowohl bei *C. elegans* als auch in anderen Organismen (Belinha et al., 2007; Smirnova et al., 2009; Kampkötter et al. 2007, 2008).

Kampkötter et al. beschreiben 2008 einen inhibierenden Effekt des Quercetins auf die Expression des Isoenzyms SOD-3. Diese Experimente wurden in Flüssigmedium durchgeführt, nun sollten sie auch auf Festmedium zwecks der bereits oben erwähnten leichteren Handhabbarkeit durchgeführt werden. Hierzu wurde der transgene Stamm CF1553 verwendet, der ein Fusionsprodukt aus SOD-3 und GFP exprimiert. Das Vorgehen bei den Versuchen war analog zur Durchführung der Experimente zur DAF-16-Lokalisation, durchgeführt wurden sie bei 20 °C. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war bis zu einer Konzentration von 100 µM Quercetin auch auf Festmedium eine tendenzielle Verringerung der Expression der SOD-3 zu erkennen. In der Kontrolle wurden ca. 69 relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) gemessen, bei 50 µM Quercetin etwa 62 RFU und ca. 59 RFU bei 100 µM Quercetin. Bei einer Quercetin-Konzentration von 200 µM nahm die Fluoreszenz auf knappe 78 RFU zu (s. Abb.3.2).

Abb. 3.1: Einfluss von Quercetin auf die Lokalisation von DAF-16



Nach der Semisynchronisation wurden Eier des Stammes TJ356 auf NGM-Agar mit 50, 100 und 200 µM Quercetin bzw. als Kontrolle 0,2 % DMSO drei Tage lang bis zum Larvenstadium L4 inkubiert. Die L4-Larven wurden dann fluoreszenzmikroskopisch untersucht und den verschiedenen Phänotypen zugeordnet. **A)** Kernlokalisation bei 20 °C **B)** Kernlokalisation bei 37 °C (3 Experimente; Raumtemperatur: n=81 (Kontrolle), 64 (50 µM), 58 (100 µM) und 62 (200 µM); Thermischer Stress: n=44 (Kontrolle), 60 (50 µM), 50 (100 µM) und 48 (200 µM); *P<0,05; One-way analysis of variance und als Post-Hoc-Test Bonferroni's Multiple Comparison Test; MW±SEM).

Abb. 3.2: Einfluss von Quercetin auf die Expression der SOD-3

Alterssynchronisierte Eier des Stammes CF1553 (SOD-3::GFP) wurden für drei Tage auf Quercetin-haltigen Agarplatten (Kontrolle: 0,2 % DMSO) bis zum L4-Stadium aufgezogen, anschließend von der Platte gespült und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. (2 Experimente; n=31 (Kontrolle), 23 (50 µM), 36 (100 µM) und 25 (200 µM); One-way analysis of variance und als Post-Hoc-Test Bonferroni's Multiple Comparison Test; MW±SEM).

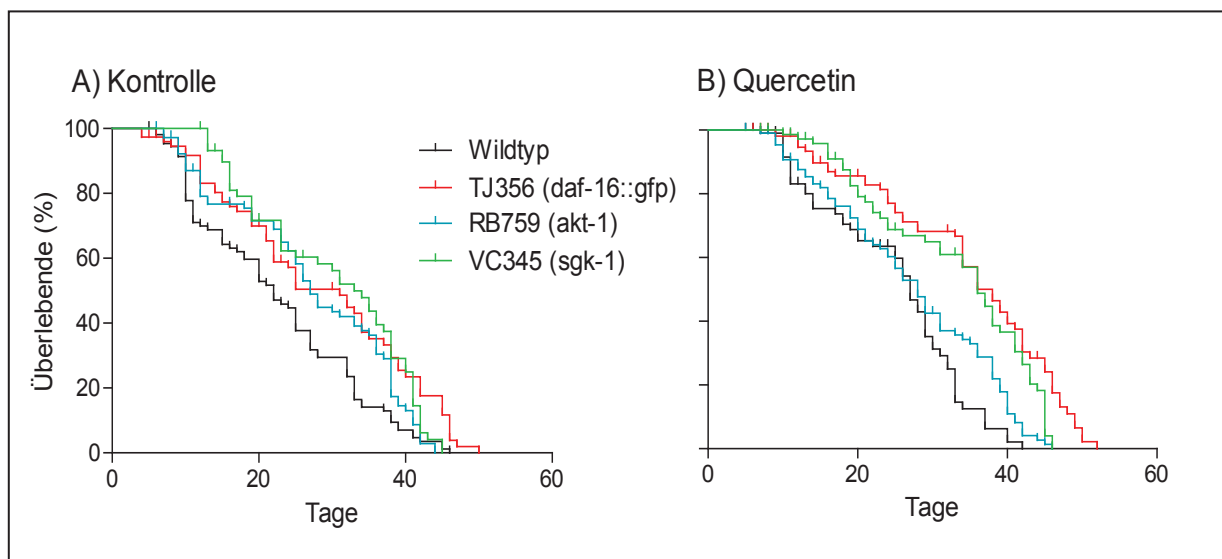
3.2 Einfluss von Quercetin und verschiedener Mutationen im Insulin-Signalweg auf die Lebensspanne von *C. elegans*

3.2.1 Einfluss von ILS-Mutationen und RNAi auf die Lebensspanne von *C. elegans*

Die Lebensspannen der verschiedenen ILS-Mutanten wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht (u.a. Dorman et al., 1995; Hertweg et al., 2004; Hamilton et al., 2005). Die Untersuchung dient der Bestätigung dieser Ergebnisse und im Fall der RNAi-Behandlung als Indikator für eine erfolgreiche RNAi. Im Vergleich der Auswirkungen der Mutationen auf die Lebensspannen wurde bei den Kontrollen ein signifikanter Anstieg der mittleren Lebenszeit in allen Gruppen mit Mutation erreicht. So verlängerte die Überexpression von DAF-16 im Stamm TJ356 dessen Überleben im Vergleich zum Wildtyp um knapp 27 %, eine Minderexpression des Proteins AKT-1 bewirkte eine Verlängerung der Lebensspanne um ca. 21 % und bei der SGK-1-Mutante wurde das Überleben um etwa 34 % verlängert. Wurden die verschiedenen Stämme mit Quercetin behandelt, so ergab sich für den TJ356-Stamm eine Lebensverlängerung von ca. 44 % und für VC345 von knapp 33 %. Bei der AKT-1-Mutante konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum mit Quercetin behandelten Wildtyp festgestellt werden (s. Abb. 3.3).

Um die Aktivität der Transkriptionsfaktoren DAF-16 und SKN-1 sowie der Phosphatase DAF-18 herunter zu regulieren, wurden RNAi-Bakterien mit einer für diese Proteine kodierenden Doppelstrang-RNA als Futterquelle für *C. elegans* verwendet. Durch diese Doppelstrang-mRNA wurde der Abbau der für die entsprechenden Proteine kodierenden mRNA im Wurm induziert und das Protein somit schwächer exprimiert. Als Kontrolle diente ein *E. coli*-Stamm, der einen Leervektor enthielt. Signifikante Reduktionen der Lebensspannen konnten durch RNAi gegen *skn-1* und *daf-16* erzielt werden, hier lebten die Würmer im Mittel 16,2 % (*daf-16* RNAi), bzw. 18,3 % (*skn-1* RNAi) kürzer. Bei *daf-18* RNAi nahm die Überlebenskurve erst in der zweiten Hälfte den zu erwartenden Verlauf an. Eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Anzahl an überlebenden Würmern konnte in der ersten Hälfte nicht beobachtet werden. Dadurch kann in der Gesamtbetrachtung kein lebensverkürzender Effekt beobachtet werden (s. Abb. 3.4).

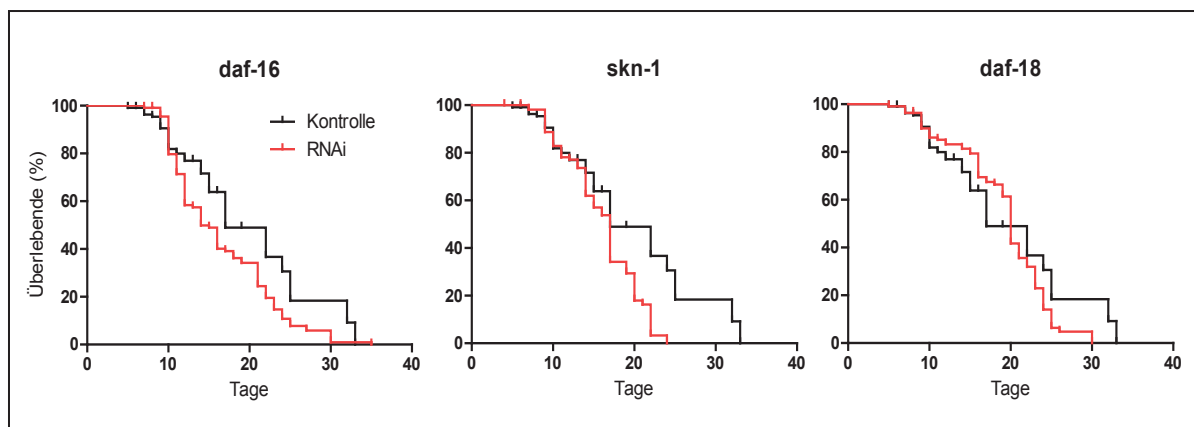
Abb. 3.3: Auswirkung verschiedener ILS-Mutationen mit und ohne Quercetin-Einfluss auf die Lebensspanne von *C. elegans*



Dargestellt sind die Auswirkungen der Mutationen unter Kontrollbedingungen sowie unter Behandlung mit Quercetin. Kontrollgruppe: Wildtyp: 3 Experimente, n=88; TJ356: 2 Experimente, n=59; VC345: 2 Experimente, n=52; RB759: 3 Experimente, n=77; Quercetin-Gruppe: Wildtyp: 3 Experimente, n=57; TJ356: 2 Experimente, n=60; VC345: 2 Experimente, n=53; RB759: 3 Experimente, n=81. (Dargestellt sind Kaplan-Meyer-Überlebenszeitfunktionen. Statistische Auswertung mittels Log-rank Test)

Tab.3.1: Mittlere Lebensspannen von *C. elegans* Wildtyp (N2) und ILS-Mutanten

	N2	TJ356	VC345	RB759	Leer-RNAi	daf-16 RNAi	daf-18 RNAi	skn-1 RNAi
Mittlere Lebensspanne [d]	22,5	28,5	30,2	27,2	19,7	16,5	19,3	16,1
P-Wert	1	0,0005	0,0003	0,024	1	0,0072	0,886	0,0053

Abb. 3.4: Einfluss der RNAi-Behandlung auf die Lebensspanne von *C. elegans*

Ab dem L4-Stadium wurden die Würmer mit RNAi-Bakterien gefüttert, täglich auf Lebendigkeit überprüft und in frisches Medium überführt. Es wurden für jeden Ansatz 3 Experimente durchgeführt. Kontrollgruppe: n=49, daf-16 RNAi: n=105, skn-1 RNAi: n=75, daf-18 RNAi: n=88. (Dargestellt sind Kaplan-Meier-Überlebenszeitfunktionen. Statistische Auswertung mittels Log-rank Test)

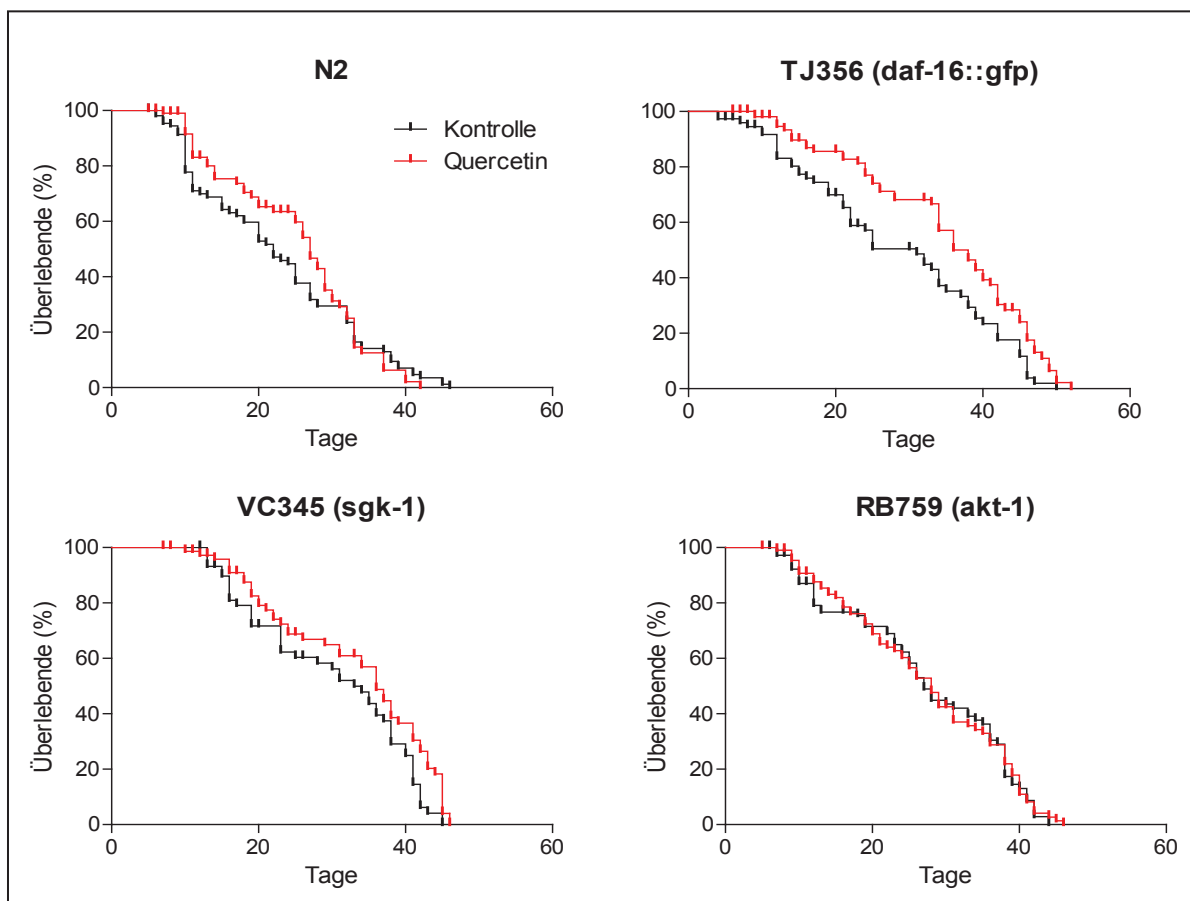
3.2.2 Einfluss von Quercetin auf die Lebensspanne von *C. elegans*

Es konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden, dass Quercetin einen protektiven Effekt gegenüber oxidativem Stress besitzt und somit die Lebensspanne in Organismen wie *S. cerevisiae* oder *C. elegans* verlängert (Belinha et al., 2007; Kampkötter et al., 2007, 2008). Dies warf Fragen über den Mechanismus auf, mit dem Quercetin diesen Effekt erzielen konnte. Diskutiert werden in den Arbeiten von Kampkötter et al. (2007, 2008) ein direkter antioxidativer Effekt von Quercetin, aber auch ein Einfluss dieser Substanz auf die Aktivität von Genen für antioxidative Enzyme, der durch eine Aktivierung des FoxO-Transkriptionsfaktors DAF-16 zustande kommen könnte. Somit war ein Ziel dieser Arbeit, den Effekt von Quercetin auf den Insulin-Signalweg, dessen Endeffektor DAF-16 ist, näher zu untersuchen. Dazu wurde zunächst die Lebensspanne bei Würmern mit unterschiedlichen Mutationen in diesem Signalweg untersucht (s. Kap. 2.3.6). Hierzu wurden die Würmer – wie

in Kap. 2.3.3.2 beschrieben – mit Quercetin, bzw. zur Kontrolle mit DMSO behandelt und täglich auf ihre Lebendigkeit hin überprüft.

Beim Wildtyp-Stamm N2 konnte ein lebensverlängernder, wenn auch nicht signifikanter Effekt von Quercetin nachgewiesen werden, der im Mittel ca. 10 % betrug. Führt man den gleichen Versuch mit dem transgenen Stamm TJ356 durch, der ein GFP-Fusionsprodukt mit DAF-16 bildet und diesen Transkriptionsfaktor überexprimiert, so erzielt man einen deutlich stärkeren Effekt des Quercetins, bei dem die mittlere Lebensspanne um ca. 22 % verlängert wird. Eine Quercetin-Behandlung des Stammes VC345, der eine Mutation im Gen der DAF-16-inhibierenden Proteinkinase SGK-1 trägt und somit den Transkriptionsfaktor DAF-16 verstärkt exprimiert, bewirkte eine signifikante Lebensverlängerung von knapp 10 %. Beim Stamm RB759, einer AKT-1-Mutante, die DAF-16 ebenfalls verstärkt exprimiert, konnte kein lebensverlängernder Effekt des Quercetins nachgewiesen werden (s. Abb. 3.5).

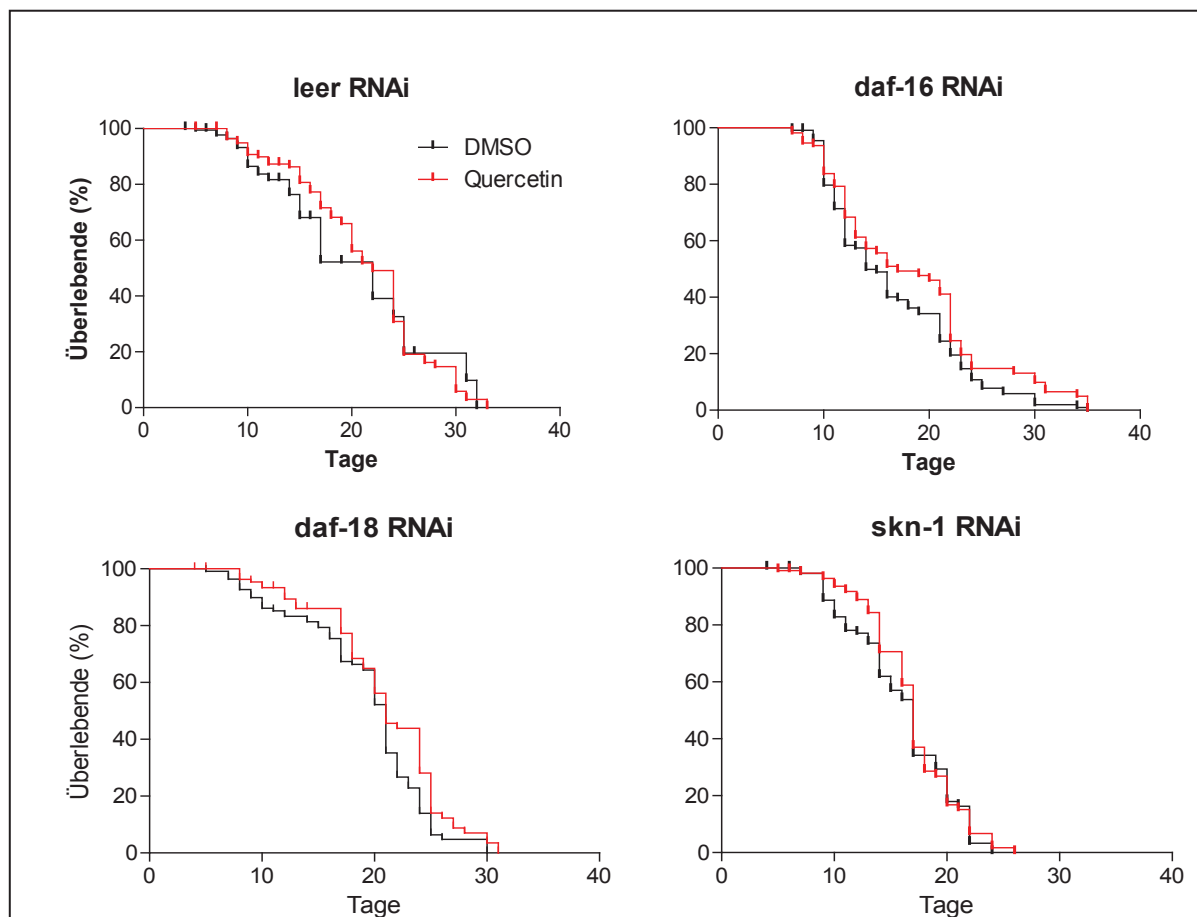
Abb.3.5: Einfluss von Quercetin auf die Lebensspannen von N2, TJ356, VC345 und RB759



Die Würmer wurden ab dem L4-Stadium in NGM-BS mit 100 μ M Quercetin, bzw. als Kontrolle mit dem gleichen Volumen DMSO bis zum Tod täglich gezählt und in frisches Medium überführt. Kontrollgruppe: Wildtyp: n=88, TJ356: n=59, VC345: n=52, RB759: n=77; Quercetin-Gruppe: Wildtyp: n=57, TJ356: n=60, VC345: n=53, RB759: n=81. Mit VC345 und TJ356 wurden 2, mit dem Wildtyp und RB759 wurden 3 Experimente durchgeführt. (Dargestellt sind Kaplan-Meier-Überlebenszeitfunktionen. Statistische Auswertung mittels Log-rank Test)

Tab. 3.2: Mittlere Lebensspannen von ILS-Mutanten bei Quercetin-Behandlung

	Wildtyp	TJ356	VC345	RB759	Leer-RNAi	daf-16 RNAi	daf-18 RNAi	skn-1 RNAi
Mittlere Lebensspanne Kontrollgruppe [d]	22,5	28,5	30,2	27,2	19,7	16,5	19,3	16,1
Mittlere Lebensspanne Quercetin-Gruppe [d]	24,9	34,8	33,1	27,4	21,3	18,4	20,9	16,9
P-Wert	0,4139	0,0032	0,0282	0,7316	0,1712	0,0521	0,0389	0,2780

Abb. 3.6: Einfluss von Quercetin auf die Lebensspannen von RNAi-behandelten *C. elegans*

Die Würmer wurden ab dem L4-Stadium in Flüssigmedium überführt, mit RNAi-Bakterien gefüttert und der Behandlung mit Quercetin/DMSO unterzogen. Täglich wurde überprüft, wie viele Würmer noch lebten. Alle Experimente wurden dreimal durchgeführt. Kontrollgruppe: leer-RNAi: n=45, daf-16-RNAi: n=105, daf-18-RNAi: n=88, skn-1-RNAi: n=75; Quercetin-Gruppe: leer-RNAi: n=66, daf-16-RNAi: n=81, daf-18-RNAi: n=63, skn-1-RNAi: n=70 (Dargestellt sind Kaplan-Meier-Überlebenszeitfunktionen. Statistische Auswertung mittels Log-rank Test)

Um zu untersuchen, ob auch bei der RNAi-Behandlung ein lebensverlängernder Effekt des Quercetins erzielt werden konnte, wurden den RNAi-Ansätzen nun Quercetin bzw. als Kontrolle DMSO hinzugefügt, das Vorgehen war das gleiche wie schon bei den Mutanten-Stämmen. Eine signifikante Lebensverlängerung von ca. 8 % konnte hier bei dem mit daf-18-RNAi behandelten Ansatz beobachtet werden. In der Kontrolle wurde der gleiche Anstieg der Lebenszeit beobachtet, allerdings war er hier nicht signifikant. Gleiches gilt für die Verlängerung der Lebensspanne von ca. 12 % in der mit daf-16-RNAi behandelten Gruppe. Bei den Würmern mit skn-1-RNAi konnte keine signifikante Lebensverlängerung beobachtet werden (s. Abb. 3.6).

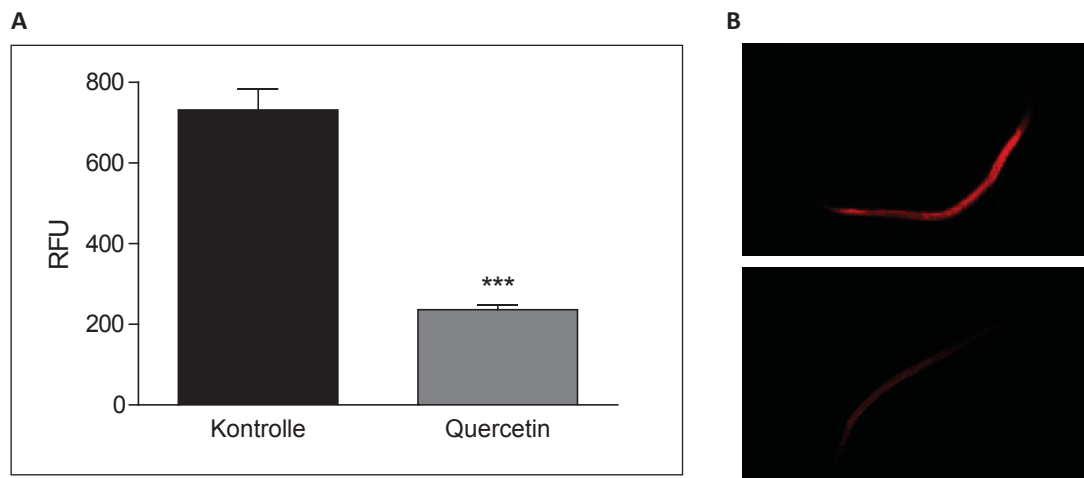
3.3 Einflüsse auf die Lipidakkumulation in *C. elegans*

3.3.1 Einfluss von Quercetin auf die Lipidakkumulation in *C. elegans*

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Quercetin den Lipidmetabolismus auf unterschiedliche Arten beeinflussen kann. So ist es in der Lage, in Ratten-Adipozyten Lipolyse zu induzieren (Kuppusamy, Das, 1992) und die Glucoseaufnahme zu inhibieren (Strobel et al., 2005). Juzwiak et al. (2005) konnten nachweisen, dass Quercetin bei Kaninchen mit erhöhten Serumcholesterinspiegeln sowohl die Konzentration an LDL- und VLDL-Cholesterin und Triglyceriden senkt als auch die HDL-Konzentration erhöht. Außerdem wird die von Lipidplaques befallene Endothelfläche der Aorta reduziert. Auch bei Menschen konnte in einer Studie an japanischen Frauen eine LDL-senkende Wirkung von Quercetin nachgewiesen werden (Arai et al., 2000). Bei *C. elegans* konnte ein Zusammenhang zwischen Lipidmetabolismus und verlängerter Lebensspanne hergestellt werden. So zeigten Horikawa et al. (2008), dass sich bei einer Reduktion der Aktivität des im Fettsäurestoffwechsel aktiven Enzyms FAT-6 sowohl der Lipidspeicher als auch die Lebensspanne der Würmer stark reduziert. Wang et al. konnten 2008 nachweisen, dass eine Triglycerid-Lipase zu einer verlängerten Lebensspanne führt.

Ob auch Quercetin einen Einfluss auf die Speicherung von Lipiden hat, wurde untersucht, indem die Würmer vom Wildtyp (N2), nachdem sie drei Tage lang in Quercetin-haltigem Flüssigmedium aufwuchsen, mit Nil-Rot-Lösung angefärbt wurden und die Fluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop gemessen wurde (s. Kap. 2.3.4 und 2.3.7.3).

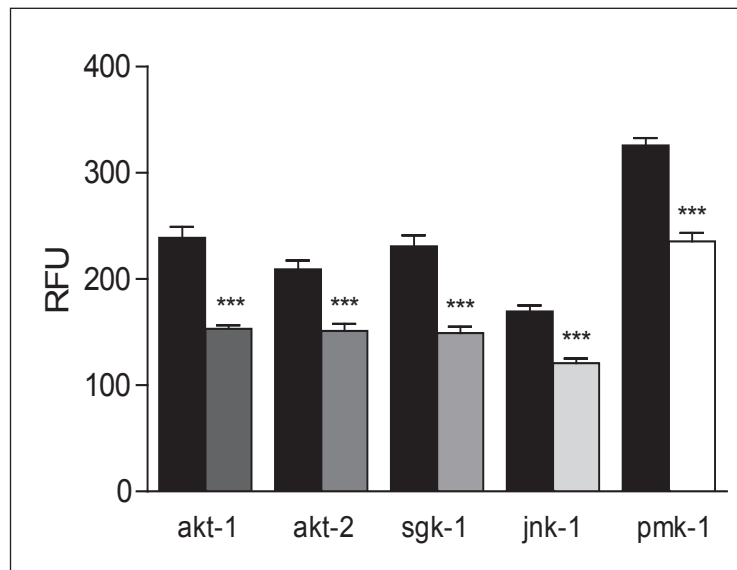
Für den Wildtyp konnte eine um 66,4 % verringerte Fluoreszenz, d.h., eine etwa dreimal geringere Lipidakkumulation nachgewiesen werden (s. Abb. 3.7).

Abb. 3.7: Einfluss von Quercetin auf die Lipidakkumulation im Wildtyp von *C. elegans*

Nach der Semisynchronisation wurden die Eier für drei Tage in Flüssigmedium mit 100 μ M Quercetin (Kontrolle: 0,2 % DMSO) inkubiert und im Anschluss für 20 h mit 250 ng/ml Nil-Rot gefärbt. **A)** Darstellung der RFU. **B)** Oben ein unbehandelter, mit Nil-Rot gefärbter Wurm, unten ein mit Quercetin behandelter, mit Nil-Rot gefärbter Wurm. Beide Würmer sind vom Wildtyp. (3 Experimente; Kontrolle: n=113, Quercetin: n=101; ***P<0,001; Student's T-Test; MW $\pm$ SEM).

Als Nächstes wurden die mutierten Stämme RB759, VC204, VC345, VC8 und KU25 untersucht, bei denen Teile von Genen für die Signaltransduktionsproteine AKT-1, AKT-2, SGK-1 sowie JNK-1 und PMK-1 deletiert waren.

Alle diese Stämme zeigen unter Quercetin-Einfluss eine reduzierte Lipideinlagerung: Beim Stamm RB759(akt-1) verringert sich die Fluoreszenz und damit der Lipidgehalt von 239,0 auf 153,2 RFU um ca. 36 %, bei VC204(akt-2) von 209,1 auf 151,0 um etwa 28 % und bei VC345(sgk-1) von 230,9 auf 149,0 um ca. 35 %. In VC8(jnk-1) wurde eine um fast 29 % geringere Fluoreszenz und damit Fetteinlagerung gemessen (RFU nimmt von 169,6 auf 121,0 ab). KU25(pmk-1) lagert etwa 28 % weniger Lipide ein (Abnahme von 325,8 auf 235,6 RFU), als die unbehandelte Kontrollgruppe (s. Abb. 3.8). Diese durch Quercetin erreichte Verringerung des Lipidgehalts ist in allen Stämmen signifikant, zeigt jedoch beim Wildtyp eine 1,3- bis 1,9-fach stärkere Ausprägung.

Abb. 3.8: Effekt von Quercetin auf die Lipideinlagerung unterschiedlich mutierter Stämme von *C. elegans*

Die nach der Semisynchronisation für drei Tage in 100 μ M Quercetin/0,2 % DMSO inkubierten Larven wurden anschließend für 20 h mit 250 ng/ml Nil-Red gefärbt. Die linken Säulen stellen die Kontrollgruppen dar, die rechten Säulen die mit Quercetin behandelten Gruppen. (RB759(akt-1): n=108 (Kontrolle) und 114 (Quercetin) (beide 3 Experimente), VC204(akt-2): n=115 (K) und 110 (Q) (beide 4 Experimente), VC345(sgk-1): n=115 (K, 4 Experimente) und 128 (Q, 5 Experimente), VC8(jnk-1): n=101 (K) und 96 (Q) (beide 3 Experimente), KU25(pmk-1): n= 111 (K) und 114(Q) (beide 4 Experimente); (***) $P < 0,001$; One-way analysis of variance und als Post-Hoc-Test Bonferroni's Multiple Comparison Test; $MW \pm SEM$).

3.3.1 Einfluss von ILS-Mutationen auf die Lipidakkumulation in *C. elegans*

Vergleicht man die Lipidakkumulation der Mutanten mit der des Wildtyps, ohne die Würmer mit Quercetin behandelt zu haben, so zeigt sich bei allen mutierten Stämmen eine signifikant verringerte Menge an gespeichertem Fett. Bei KU25(pmk-1) zeigt sich mit 53,6 % die geringste Reduktion, bei VC8(jnk-1) fällt sie mit 75,9 % am stärksten aus. Die ILS-Mutanten liegen mit 66,0 % (RB759(akt-1)), 67,1 % (VC345(sgk-1)) und 70,2 % (VC204(akt-2)) zwischen diesen Werten (s. Abb. 3.9 A). Werden die Mutanten mit Quercetin behandelt, ergeben sich folgende Unterschiede bei der Lipidakkumulation: VC8(jnk-1) bleibt der am stärksten beeinträchtigte Stamm, jedoch reduziert sich der Lipidgehalt nur noch um 48,7 %. Die ILS-Mutanten liefern wieder ähnliche Werte, auch hier ist der Effekt, den die Mutation allein hervorruft, durch Quercetin deutlich abgeschwächt. Bei RB759(akt-1) reduziert sich die Fettakkumulation um 35,1 %, bei VC204(akt-2) um 36,0 % und bei VC345(sgk-1) um 36,9 % gegenüber dem Wildtyp. Bei KU25(pmk-1) ergeben sich nun dem Wildtyp beinahe identische Mengen an Speicherfett (s. Abb. 3.9 B).

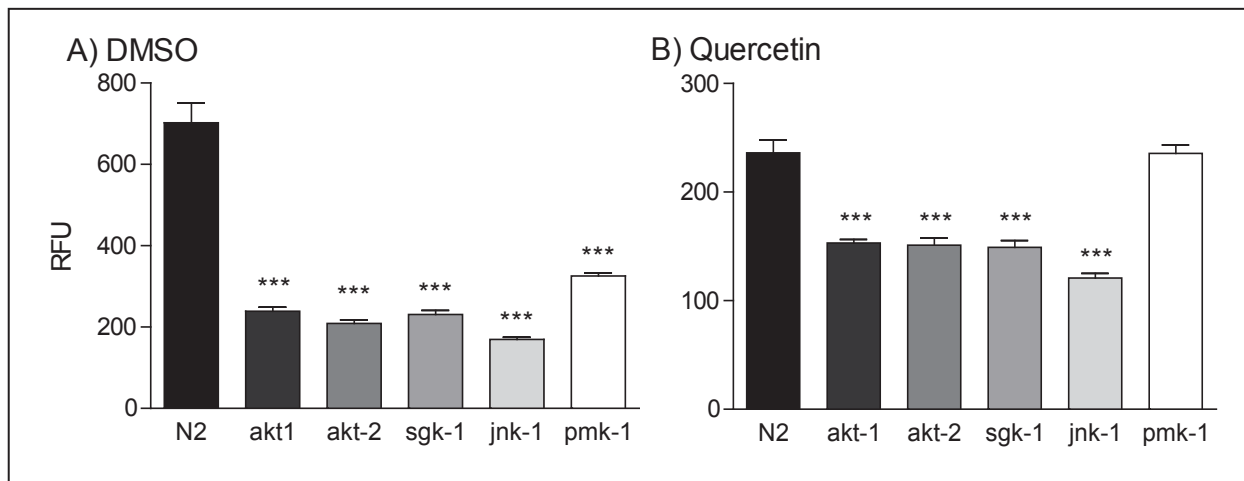
Nun folgte die Bestimmung der Fettakkumulation bei Wildtyp-Würmern, die ab dem L4-Stadium drei Tage lang mit RNAi gegen *daf-16* oder *skn-1* behandelt wurden. Bei diesen Würmern wurde mittels Doppelstrang-mRNA bildenden Bakterien die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren DAF-16 oder SKN-1 reduziert.

Auch hier zeigt sich durch die Quercetin-Behandlung eine signifikant verringerte Lipidmenge. Bei der mit einem Leervektor behandelten Gruppe reduziert sich die Fluoreszenz um 73,5 %. Wird die Expression von DAF-16 mittels RNAi reduziert, so schwächt sich der Quercetin-

Effekt ab und die Fetteinlagerung reduziert sich nur noch um 34,8 %. Bei einer verminderten SKN-1-Expression wird die Lipidakkumulation um 55,3 % verringert (s. Abb. 3.10).

Bei der Betrachtung des alleinigen Effekts der RNAi-Behandlung auf den Lipidgehalt von *C. elegans* fällt auf, dass eine *daf-16*-RNAi den Lipidgehalt signifikant um 14,5 % senkt. Wird hingegen die Expression von SKN-1 reduziert, so lagert der Wurm 17,9 % mehr Fett ein, auch dieser Wert ist signifikant (s. Abb. 3.11 A). Eine Zugabe von Quercetin ergibt bei beiden RNAi-Behandlungen einen signifikant erhöhten Fettspeicher. Bei *skn-1*-RNAi ist er mit 98,4 % fast verdoppelt, bei *daf-16*-RNAi durch Quercetin-Gabe mit 110,1 % im Vergleich zum Wildtyp mehr als verdoppelt (s. Abb. 3.11 B).

Abb. 3.9: Einfluss von Mutationen und Quercetin auf die Lipidakkumulation bei *C. elegans*

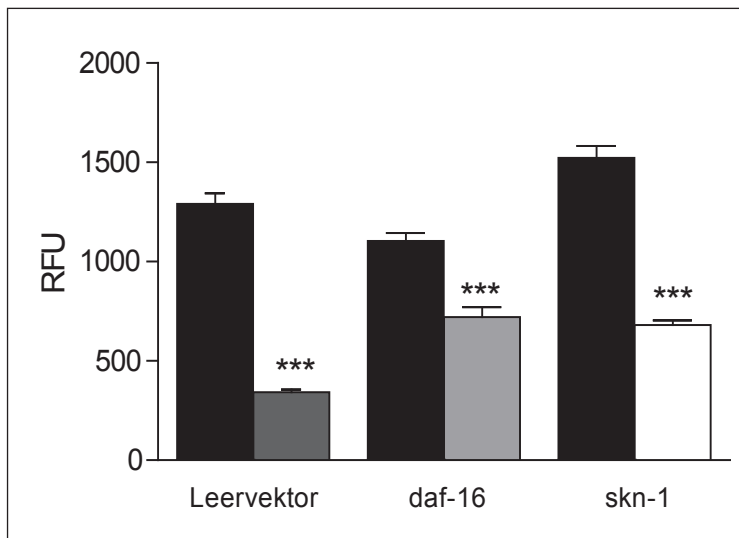


Nach der Semisynchronisation wurden die Eier der unterschiedlichen Stämme für drei Tage in Flüssigmedium + 0,2 % DMSO (A) bzw. 100 μ M Quercetin (B) inkubiert. Im Anschluss daran wurde eine 20-stündige Nil-Rot-Färbung durchgeführt. (RB759(akt-1): n=108 (Kontrolle) und 114 (Quercetin) (beide 3 Experimente), VC204(akt-2): n=115 (K) und 110 (Q) (beide 4 Experimente), VC345(sgk-1): n=115 (K, 4 Experimente) und 128 (Q, 5 Experimente), VC8(jnk-1): n=101 (K) und 96 (Q) (beide 3 Experimente), KU25(pmk-1): n= 111 (K) und 114(Q) (beide 4 Experimente); ***P<0,001 One-way analysis of variance und als Post-Hoc-Test Bonferroni's Multiple Comparison Test; MW $\pm$ SEM).

Tab. 3.3: Einfluss von Quercetin auf die Nil-Rot-Fluoreszenz verschiedener *C. elegans*-Stämme

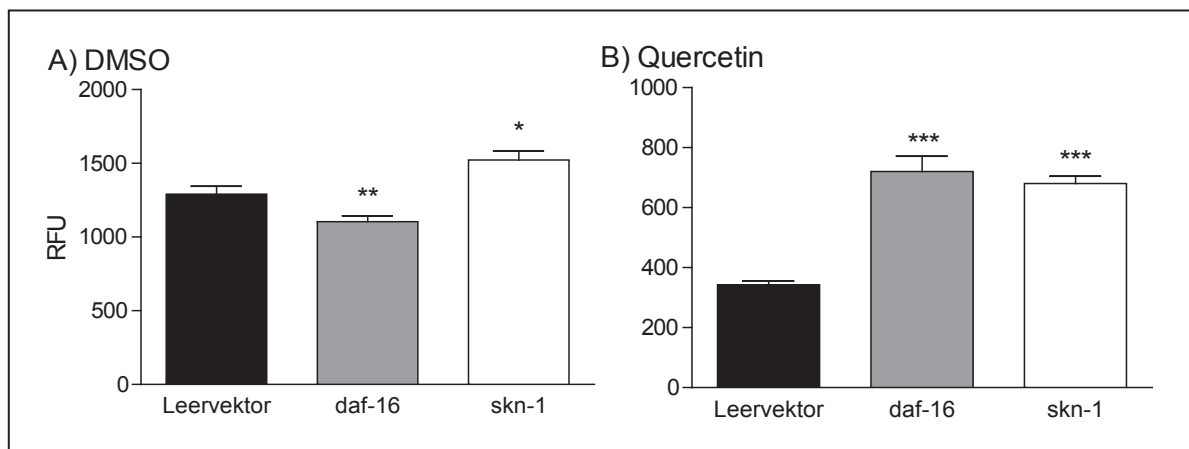
	N2	RB759(akt-1)	VC204(akt-2)	VC345(sgk-1)	VC8(jnk-1)	KU25(pmk-1)
DMSO [RFU]	731,8	239,0	209,1	230,9	169,6	325,8
Quercetin [RFU]	236,0	153,2	151,0	149,0	121,0	235,6

Abb. 3.10: Einfluss von Quercetin auf die Lipidakkumulation bei RNAi-Behandlung von *C. elegans* gegen *daf-16* bzw. *skn-1*



Nach der Semisynchronisation wurden die Würmer für drei Tage auf Festmedium gehalten, ehe sie dann für weitere drei Tage in das RNAi-Bakterien-haltige Flüssig-medium überführt wurden. Hier erfolgte auch die Inkubation über den gleichen Zeitraum mit 100 μ M Quercetin bzw. 0,2 % DMSO. Anschließend wurden die Würmer für 20 h mit Nil-Rot gefärbt und dann fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. (3 Experimente; Leervektor: n=61 (K) und 65 (Q), *daf-16* RNAi: n=65 (K) und 67 (Q), *skn-1* RNAi: n=63 (K) und 73 (Q); ***P<0,001; One-way analysis of variance und als Post-Hoc-Test Bonferroni's Multiple Comparison Test; MW $\pm$ SEM).

Abb. 3.11: Lipidakkumulation unter *daf-16* und *skn-1* RNAi und deren Beeinflussung durch Quercetin



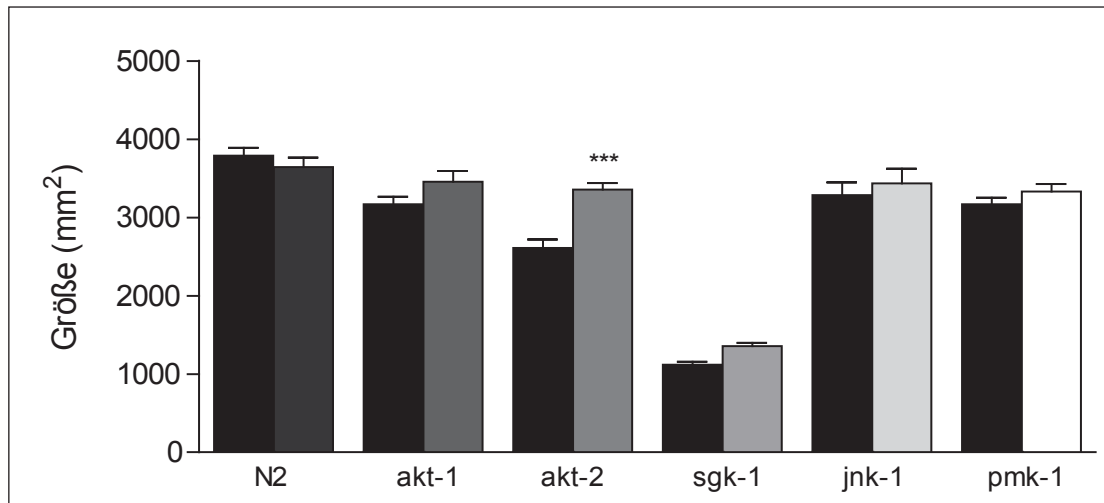
Nachdem die Würmer sich nach der Semisynchronisation für drei Tage auf Festmedium entwickeln konnten, wurden sie in Flüssigmedium überführt, in dem sie für weitere drei Tage der RNAi-Behandlung mit Zusatz von 0,2 % DMSO (A) oder 100 μ M Quercetin (B) unterzogen wurden. Anschließend erfolgt die 20-stündige Färbung mit 250 ng/ml Nil-Rot und die Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop. (3 Experimente; DMSO: Leervektor n=61, *daf-16* RNAi n=65, *skn-1* RNAi n=63; Quercetin: Leervektor n=65, *daf-16* RNAi n=67, *skn-1* RNAi n=73; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; One-way analysis of variance und als Post-Hoc-Test Bonferroni's Multiple Comparison Test; MW $\pm$ SEM).

3.4 Einfluss von Quercetin und ILS-Mutationen auf die Körpergröße von *C. elegans*

Viele Studien stellen einen Zusammenhang zwischen Fettmetabolismus, dem Insulin-like-signalling und körperlicher Entwicklung von *C. elegans* her (Kenyon et al. 1993; Horikawa et al. 2008; Jones et al. 2009). Nachdem ein Einfluss von Quercetin auf den Lipidmetabolismus von *C. elegans* nachgewiesen werden konnte, sollte nun untersucht werden, inwiefern Quercetin auch das Wachstum von *C. elegans* beeinflusst. Hierzu wurden die Körperoberflächen als ein Parameter für Entwicklung und Wachstum der Würmer bestimmt. Die Werte wurden bei der densitometrischen Ermittlung der Fettspeicherung automatisch mitbestimmt.

Zunächst wurde die Körperoberfläche von drei Tage alten Wildtyp-Würmern und den ILS-Mutanten RB759(akt-1), VC204(akt-2), VC345(sgk-1), VC8(jnk-1) und KU25(pmk-1) ermittelt. Hierbei ergab sich, dass Quercetin bis auf eine Ausnahme keinen nennenswerten Einfluss auf das Wachstum von *C. elegans* ausübt. Lediglich bei VC204(akt-2) konnte eine signifikante, um ca. 28,8 % gesteigerte, Größenzunahme durch Quercetin nachgewiesen werden (Abb.3.12).

Abb. 3.12: Einfluss von Quercetin auf die Größe verschiedener *C. elegans*-ILS-Mutanten



Die semisynchronisierten Eier wurden für drei Tage in Flüssigmedium mit 100 μ M Quercetin (rechte Säulen) (Kontrolle: 0,2 % DMSO, linke Säulen) inkubiert. Im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Lipidakkumulation wurde auch die Größe der Würmer erfasst (dargestellt als Oberfläche in mm^2). (N2: n=105 (Kontrolle) und 111 (Quercetin) (beide 3 Experimente), RB759(akt-1): n=108 (K) und 114 (Q) (beide 3 Experimente), VC204(akt-2): n=115 (K) und 110 (Q) (beide 4 Experimente), VC345(sgk-1): n=115 (K, 4 Experimente) und 128 (Q, 5 Experimente), VC8(jnk-1): n=101 (K) und 96 (Q) (beide 3 Experimente), KU25(pmk-1): n= 111 (K) und 114(Q) (beide 4 Experimente); ***P<0,001; One-way analysis of variance und als Post-Hoc-Test Bonferroni's Multiple Comparison Test; MW $\pm$ SEM).

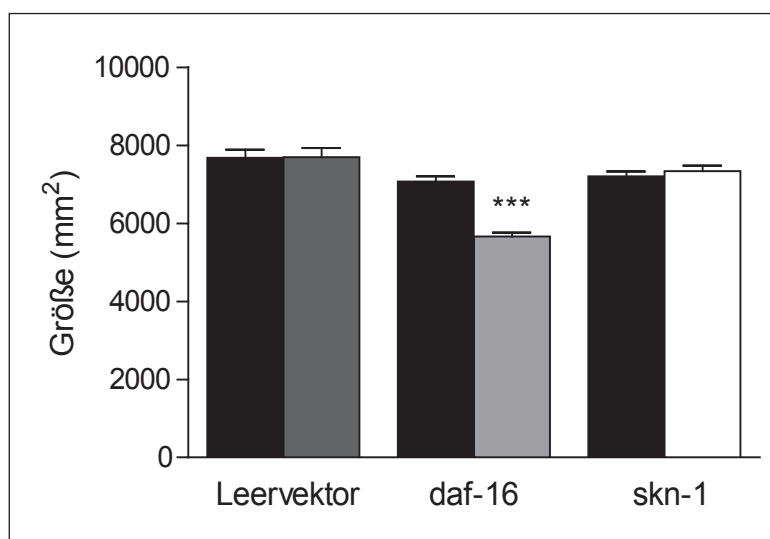
Bei der Betrachtung des Effekts von Quercetin auf mit RNAi gegen DAF-16 und SKN-1 behandelte Würmer zeigt sich nach Herabregulierung der DAF-16-Aktivität eine signifikante Verringerung der Größe um etwa 20 %. Auf die Kontrolle und auf *skn-1*-RNAi übt Quercetin hinsichtlich des Wachstums keinen Einfluss aus (Abb. 3.13).

Die nächste Datenauswertung sollte zeigen, ob überhaupt durch die Mutationen im Insulin-Signalweg eine Auswirkung auf das Wachstum von *C. elegans* besteht. Hierbei zeigt sich, dass sämtliche Mutationen im ILS eine signifikante Verringerung der Größe bewirken. Diese fällt bei verringerter SGK-1-Aktivität mit im Mittel über 70 % kleineren Würmern im Vergleich zum Wildtyp am stärksten aus. Eine *akt-2*-Mutation bewirkt eine Größenreduktion um ca. 31 %, bei Mutationen in den übrigen Genen sind die Würmer 13 bis 16 % kleiner (Abb. 3.14).

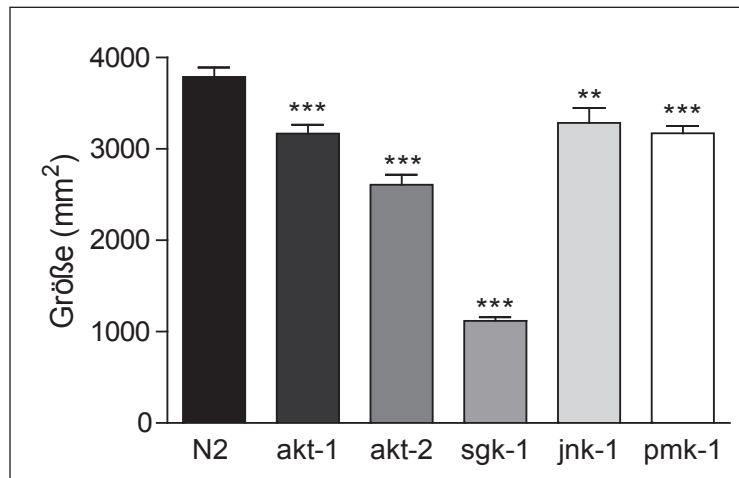
Werden die mit Quercetin behandelten ILS-Mutanten verglichen, so sind mit Ausnahme von VC345(*sgk-1*) die Würmer nach drei Tagen in etwa gleich groß. Es kann nur noch durch die *sgk-1*-Mutation eine signifikante Größenreduktion von knapp 63 % nachgewiesen werden, der Effekt der anderen Mutationen ist unter Quercetin verschwunden (Abb. 3.15).

Eine RNAi-Behandlung von *C. elegans* gegen die Transkriptionsfaktoren DAF-16 und SKN-1 führt unter Kontrollbedingungen zu einer sehr geringen Größenreduktion, bei *daf-16*-RNAi fällt diese mit knapp 7 % signifikant aus (Abb. 3.16 A). Mit Zufuhr von Quercetin kann bei Suppression von DAF-16 diese Größenreduktion auf fast 25 % gesteigert werden. Ein Unterschied bei der Gruppe mit SKN-1-Suppression ist auch durch Quercetin-Behandlung nicht festzustellen (Abb. 3.16 B).

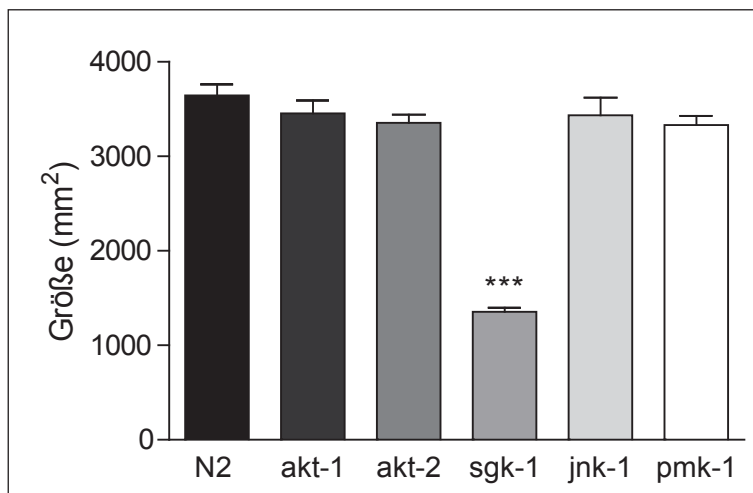
Abb. 3.13: Einfluss von Quercetin auf die Größe von mit RNAi behandeltem *C. elegans*-Wildtyp



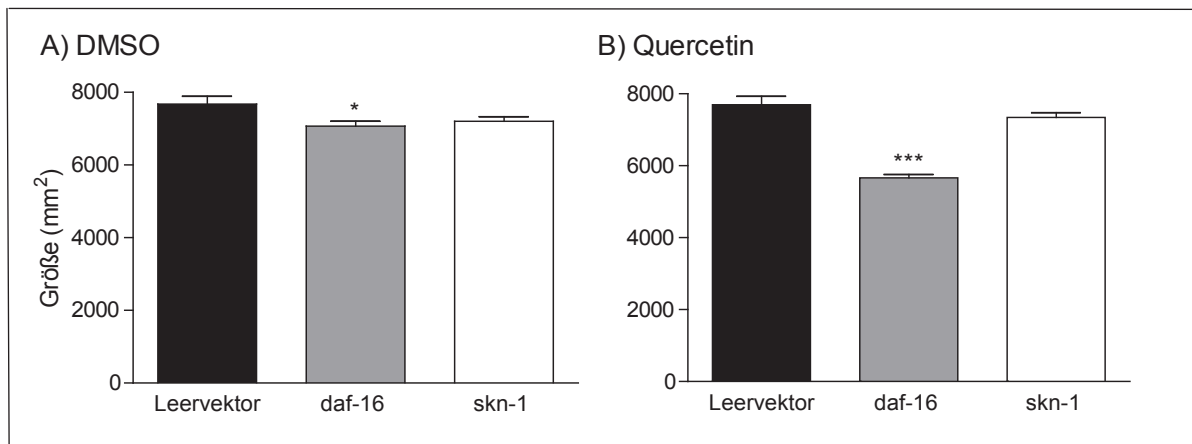
Nach der Semisynchronisation wuchsen die Larven zunächst für drei Tage auf NGM-Agar heran, von dem sie dann für weitere drei Tage in Flüssigmedium überführt wurden, das 0,2 % DMSO (linke Säulen), bzw. 100 mM Quercetin (rechte Säulen) enthielt. Die Größe der Würmer wurde bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Lipidakkumulation erfasst. (3 Experimente; Leervektor: n=61 (K) und 65 (Q), *daf-16* RNAi: n=65 (K) und 67 (Q), *skn-1* RNAi: n=63 (K) und 73 (Q); ***P<0,001; One-way analysis of variance und als Post-Hoc-Test Bonferroni's Multiple Comparison Test; MW±SEM).

Abb. 3.14: Einfluss von ILS-Mutationen auf die Größe von *C. elegans*

Nachdem die Larven für drei Tage in 0,2 % DMSO-haltigem Flüssigmedium inkubiert wurden, konnte die Oberfläche der Würmer im Rahmen der densitometrischen Auswertung der Lipidakkumulation ermittelt werden. (N2: n=105 (3 Experimente), RB759(akt-1): n=108 (3 Experimente), VC204(akt-2): n=115 (4 Experimente), VC345(sgk-1): n=115 (4 Experimente), VC8(jnk-1): n=101 (3 Experimente), KU25(pmk-1): n=111 (4 Experimente); **p<0,01; ***p<0,001; One-way analysis of variance und als Post-Hoc-Test Bonferroni's Multiple Comparison Test; MW±SEM).

Abb. 3.15: Einfluss von Quercetin und ILS-Mutation auf die Größe von *C. elegans*

Die nach der Semisynchronisation drei Tage lang in 100 µM Quercetin-haltigem Flüssigmedium aufgewachsenen Larven wurden densitometrisch auf ihren Lipidgehalt untersucht. Dabei wurde auch die Oberfläche der Würmer ermittelt. (N2: n=111 (3 Experimente), RB759(akt-1): n=114 (3 Experimente), VC204(akt-2): n=110 (4 Experimente), VC345(sgk-1): n=128 (5 Experimente), VC8(jnk-1): n=96 (3 Experimente), KU25(pmk-1): n=114 (Experimente); ***p<0,001; One-way analysis of variance und als Post-Hoc-Test Bonferroni's Multiple Comparison Test; MW±SEM).

Abb. 3.16: Einfluss von RNAi und Quercetin auf die Größe von *C. elegans*

Nach der Semisynchronisation wuchsen die Larven zunächst für drei Tage auf NGM-Agar heran, ehe sie dann in das RNAi-Bakterien enthaltende Flüssigmedium überführt wurden. Anschließend wurden die Würmer auf ihre Lipideinlagerungen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Im Rahmen dieser Auswertung konnte auch die Oberfläche der Würmer ermittelt werden. Abb. A zeigt die Kontrollgruppe, die in 0,2 % DMSO-haltigem Medium heranwuchs, in Abb. B ist die Größe der Würmer dargestellt, die sich in 100 µM Quercetin-haltigem Medium entwickelte. (3 Experimente; Leervektor: n=61 (K) und 65 (Q), daf-16 RNAi: n=65 (K) und 67 (Q), skn-1 RNAi: n=63 (K) und 73 (Q); *P<0,05; ***P<0,001; One-way analysis of variance und als Post-Hoc-Test Bonferroni's Multiple Comparison Test; MW±SEM).

4 Diskussion

4.1 Lebensspannen

Über den Mechanismus, wie Quercetin die Lebensspanne von *C. elegans* erhöht, haben sich bereits einige Arbeitsgruppen Gedanken gemacht. Es herrschen verschiedene mögliche Wirkungsweisen. So konnte gezeigt werden, dass Quercetin den Gehalt an radikalen Sauerstoffspezies in *C. elegans* senkt (Kampkötter et al., 2007). Unklar bleibt jedoch der Mechanismus, über den dies geschieht. Zum Einen könnte Quercetin durch seine molekularen Eigenschaften als Radikalfänger direkt die Sauerstoffradikale abfangen. Vor allem aber scheint sich zu bestätigen, dass durch Quercetin bestimmte Signalwege aktiviert werden, was dann die Aktivierung protektiv wirkender Gene zur Folge hat. Im Raum steht hier insbesondere der ILS.

Zunächst werden durch die Experimente Ergebnisse anderer Forschungsgruppen bestätigt, die zeigen, dass die Signalproteine des ILS in die Regulierung der Lebensspanne von *C. elegans* eingreifen. So konnten Kenyon et al. bereits 1993 zeigen, dass bei einer Inhibition des Insulin-Rezeptors DAF-2 die betroffene Wurmpopulation eine doppelt so hohe Lebensspanne zeigt, wie Würmer vom Wildtyp, und dass dies abhängig von DAF-16 ist. In der hier vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass eine erhöhte DAF16-Aktivität, wie sie in dem Stamm TJ356 vorkommt, zu einer verlängerten Lebensspanne führt. Umgekehrt verkürzt sich die Lebensspanne, wenn DAF-16 mittels RNAi in seiner Aktivität unterdrückt wird.

DAF-16 wird durch zahlreiche andere Proteine in seiner Aktivität reguliert. Zu ihnen zählen unter anderem die in dieser Arbeit untersuchten Signalproteine AKT-1, SGK-1 und DAF-18. SGK-1 scheint hauptverantwortlich für die zytosolische Lokalisation von DAF-16 zu sein (Hertweck et al., 2004; Braeckman & Vanfleteren, 2006). Wird es durch Mutation oder RNAi in seiner Aktivität reduziert, so transloziert DAF-16 in den Kern und aktiviert die Transkription zahlreicher Gene, was u.a. in einer verlängerten Lebensspanne resultiert (Hertweck et al., 2004; Hamilton et al., 2005). Diesen Beobachtungen entsprechen auch die Befunde dieser Arbeit, die für den hier untersuchten Stamm VC345(sgk-1(ok538)) eine verlängerte Lebensspanne zeigen.

Bei AKT-1 handelt es sich um eine Proteinkinase, die hauptsächlich für das Übertreten von *C. elegans* in den Zustand der Dauerlarve, einen sehr robusten und gegen widrige Umweltbedingungen resistenten vegetativen Zustand, verantwortlich ist (Hertweck et al., 2004; Braeckman & Vanfleteren, 2006). Wie stark der Einfluss von AKT-1 auf die Lebensspanne der Würmer ist, wird in den verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedlich beschrieben. Bei Hertweck et al. (2004) kommt es bei der Nullmutation von AKT-1 zu keiner längeren Lebensspanne. Es wird ein Stamm mit einer Mutation im Allel ok525 verwendet, genau wie in der hier vorliegenden Arbeit auch. Nur zeigt sich bei dieser bei dem gleichen

Stamm eine signifikante Lebensverlängerung von ca. 21 %. Dies wird durch die Befunde von Hamilton et al. (2005) bestätigt, bei denen sich eine etwa 60-prozentige Erhöhung der Lebensspanne bei einer gegen akt-1 gerichteten RNAi-Behandlung zeigte. Möglich ist eine Temperaturabhängigkeit der Wirkung von akt-1: Die Lebensspannen wurden, wie auch bei Hamilton et al., bei 20 °C gemessen, bei Hertweck et al. hingegen bei 25 °C.

DAF-18 ist eine Phosphatase, die das zur Aktivierung von AGE-1 und damit des ILS benötigte Phosphatidyl-Inositol-3-Posphat (PIP3) spaltet und somit den ILS antagonisiert (Ogg & Ruvkun, 1998). Mutationen im *daf18*-Gen bewirken eine verkürzte Lebensspanne (Dorman et al., 1995; Larsen et al., 1995; Murakami & Johnson, 1996) sowie eine erhöhte UV-Sensitivität (Murakami & Johnson, 1996). Die Reduktion der Genaktivität von *daf-18* wurde in dieser Arbeit durch RNAi-Behandlung erreicht. Bei den hier dargestellten Experimenten zeigt sich keine veränderte Lebensspanne von *C. elegans*. Allerdings wird durch die RNAi die Genaktivität nur partiell unterdrückt, sodass ein Effekt nicht so stark zur Geltung kommen kann wie bei einer Nullmutation.

In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass die vielen Signalwege, welche die Genaktivität einer Zelle regulieren, nicht isoliert für sich arbeiten, sondern untereinander vernetzt sind (Kennedy, 2008). Dies bedeutet, dass DAF-16 nicht nur über den ILS reguliert werden kann, sondern auch über andere Signalwege. Gleichzeitig können die Proteine des ILS nicht nur mehrere nachgeschaltete Proteine des eigenen Signalwegs regulieren, sondern auch in andere Signalwege eingreifen. Somit ist es logisch, dass ein durch so viele verschiedene Faktoren beeinflusstes Phänomen wie die Regulation der Lebensspanne nicht nur auf das Wirken eines einzelnen Signalwegs reduziert werden kann. Der ILS ist der besterforschte Signalweg, daher wurde der Schwerpunkt in dieser Arbeit auf die Untersuchung der Proteine dieses Wegs gesetzt. Andere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. HSF-1 oder AAK-2, beeinflussen die Lebensspanne von *C. elegans* ebenso (Braeckman & Vanfleteren, 2006). Als Beispiel für einen Transkriptionsfaktor, der durch mindestens zwei verschiedene Signalwege reguliert wird, wurde für diese Arbeit SKN-1 ausgesucht. SKN-1 wird zum einen durch den ERK-MAPK-Signalweg aktiviert (Okuyama et al., 2010), zum anderen aber auch in gleicher Weise wie DAF-16 durch die AKT-Kinasen des ILS, AKT-1 und -2 sowie SGK-1, inhibiert (Tullet et al., 2008). Gleichzeitig unterdrückt SKN-1 die Synthese von den ILS aktivierenden Insulin-ähnlichen Peptiden, was zu einer Aktivitätssteigerung von DAF-16 führt (Okuyama et al., 2010). SKN-1, der in Neuronen und Darmzellen von *C. elegans* exprimiert wird (An et Blackwell, 2003), ist nicht nur für Langlebigkeit unter normalen Bedingungen (An et Blackwell, 2003; Okuyama et al., 2010), sondern auch bei kalorienrestriktiver Diät zuständig (Bishop et al., 2007). Die Sensibilität gegenüber oxidativem Stress ist bei *skn1*-Mutanten erhöht (An et Blackwell, 2003; Tullet et al., 2008). Für diese Arbeit wurde SKN-1 mittels RNAi in seiner Aktivität reduziert. Die Lebensspannen der auf diese Weise behandelten Würmer waren um 19,3 % reduziert, was der gleichen

Beobachtung von Okuyama et al. (2010) entspricht, die eine 20-prozentige Reduktion der Lebensspanne bei ihren Würmern beobachteten. Hier bestätigen diese Ergebnisse also eine lebensverlängernde Wirkung von SKN-1.

Nachdem der Einfluss der einzelnen Signalproteine auf die Lebensspanne untersucht wurde, sollten nun mögliche Angriffspunkte des Quercetins in diesen Signalkaskaden untersucht werden. Wie Kampkötter et al. (2007) zeigen konnten, erhöht Quercetin in einer Konzentration von 100 μ M beim Wildtyp die mittlere Lebensspanne um 15 %. Bei Pietsch et al. (2009) sind es 11 % bei gleicher Konzentration und 18 % bei einer Konzentration von 200 μ M. In dieser Arbeit hier wurde eine Lebensverlängerung von ca. 10 % erreicht, die allerdings nicht signifikant ausfällt. Tendenziell werden dadurch jedoch die Ergebnisse der anderen Arbeiten bestätigt. Deutlich ausgeprägter ist der Effekt beim Stamm TJ356(daf-16::gfp), der den Transkriptionsfaktor DAF-16 verstärkt exprimiert. Hier zeigt sich eine signifikante Lebensverlängerung von 22 %. Der Effekt ist also fast doppelt so hoch, wenn mehr DAF-16 vorhanden ist. Dies spricht dafür, dass Quercetin seine Wirkung über den ILS, dessen Endeffektor DAF-16 ist, erzielt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass bei daf16-Mutation immer noch eine Lebensverlängerung durch Quercetin erreicht werden konnte (Saul et al., 2008), was ein direktes Angreifen von Quercetin an DAF-16 eher ausschließt. Weitere nicht durch Quercetin beeinflusste Proteine sind nach der Arbeit von Pietsch et al. (2009) u.a. AKT-2 und SKN-1. Als potenzielle Angriffspunkte für Quercetin wurden gefunden: DAF-2 und AGE-1 aus dem ILS sowie SEK-1 aus dem MAP-Kinase-Signalwegs des Rezeptors TIR-1 und UNC-43 aus den Calmodulin-Kinase2-Signalweg. Die Ergebnisse dieser Arbeit schließen weiterhin eine Wirkung über DAF-18 aus. Durch Quercetin konnte trotz RNAi-Behandlung eine signifikante Lebensverlängerung beobachtet werden. Bei den RNAi-Behandlungen gegen DAF-16 und SKN-1 kann kein signifikanter Effekt erzielt werden. Dennoch ist bei daf-16-RNAi eine Tendenz zu einer immer noch durch Quercetin bewirkten Lebensverlängerung erkennbar, was ein Wirken über diesen Transkriptionsfaktor auch angesichts der Ergebnisse von Pietsch et al. (2009) unwahrscheinlich macht. Bei skn-1-RNAi ist der Unterschied zwischen den Lebensspannen zu gering, um eine Tendenz auszumachen. Damit kommt SKN-1 als potenzieller Angriffspunkt für Quercetin in Frage. Bei den Mutationen ist die Auswertung einfacher, da hier signifikante Unterschiede festgestellt wurden. Demnach ist trotz einer sgk-1-Mutation eine Lebensverlängerung durch Quercetin erreichbar, was SGK-1 als Effektor des Quercetins ausschließt. Bei einer akt-1-Mutation kann durch Quercetin kein Effekt festgestellt werden, weder im Vergleich der mit Quercetin und DMSO behandelten akt-1-Mutanten, noch im Vergleich der mit Quercetin behandelten Mutante zum mit Quercetin behandelten Wildtyp. Somit muss neben DAF-2 und AGE-1 auch AKT-1 als ein Protein angesehen werden, über das Quercetin seine Verlängerung der Lebensspanne erreichen kann.

4.2 Effekt von Quercetin auf die Lokalisation von DAF-16

Dass Quercetin die Translokation von DAF-16 vom Zytosol in den Nukleus bewirkt, konnte bereits gezeigt werden (Kampkötter et al., 2008). Die Würmer wurden mit 100 μ M Quercetin inkubiert und in Flüssigmedium bei 20 °C gehalten. In der gleichen Studie konnte durch HPLC Quercetin in Zelllysaten von mit Quercetin inkubierten Wurmern nachgewiesen werden, was beweist, dass Quercetin von *C. elegans* auch aufgenommen wird und somit im Organismus wirksam sein kann. Außerdem wurde die Stabilität von Quercetin untersucht, indem Proben des Flüssigmediums direkt nach Quercetin-Zugabe und nach 20 Stunden mittels HPLC verglichen wurden. Es zeigte sich in beiden Proben das gleiche Spektrum, was eine Stabilität des Quercetins über 20 Stunden beweist. Mit den Methoden von Kampkötter et al. (2008) steht also eine Vorgehensweise zur Behandlung von *C. elegans* mit Quercetin zur Verfügung, mit der sichergestellt ist, dass Quercetin durch den Wurm aufgenommen wird, und dass Quercetin über einen längeren Zeitraum unverändert in gleicher Konzentration im Flüssigmedium vorliegt. Unter diesen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass bei fast 40 % der mit Quercetin behandelten Würmer DAF-16 im Nukleus lokalisiert war. Dem gegenüber steht eine Kernlokalisation von lediglich 10 % bei der unbehandelten Kontrollgruppe.

Allerdings birgt das Flüssigmedium die Gefahr, dass sich Kontaminationen schnell im kompletten Medium ausbreiten können. Hierdurch sind die Würmer dieser Kontamination unausweichlich ausgesetzt, was nicht selten zu einem raschen Versterben der Würmer führt. Dadurch wird so manche Messung der Lebensspanne stark beeinträchtigt, wenn nicht sogar ein ganzes Experiment unbrauchbar. Daher sollte in der hier vorliegenden Arbeit ein neuer Ansatz der Quercetin-Exposition getestet werden. Die Würmer wurden auf mit Quercetin versetztem NGM-Agar gehalten und ernährten sich von Bakterien, zu deren Suspension ebenfalls Quercetin hinzugefügt wurde. In der Kontrollgruppe zeigt sich eine Kernlokalisation von 13 %, was mit den Ergebnissen von Kampkötter et al. (2008) in Einklang zu bringen ist. Allerdings konnte beim Zusatz von Quercetin nur bei 21 bis 25 % der Würmer eine Kernlokalisation festgestellt werden, wobei die Unterschiede auch nicht signifikant ausfielen. Hier zeigte sich, dass in der geringsten Konzentration (50 μ M) der Effekt tendenziell noch am stärksten war. Beim Erhitzen von glycosyliertem Quercetin zeigte sich in einer Studie, dass diese Quercetin-Verbindungen bei einer Temperatur von 180 °C instabil sind. Allerdings konnte keine Degradation des nicht-glycosylierten Quercetins festgestellt werden (Rohn et al., 2007). Bei höheren Quercetin-Konzentrationen zeigte sich das Problem, dass dessen Löslichkeit in dem noch flüssigen Agar schlecht war und sich makroskopisch sichtbare Präzipitate bildeten. Dies würde erklären, warum der Effekt von Quercetin in Festmedium auf die Kernlokalisation in *C. elegans* deutlich geringer ausfiel als im Flüssigmedium. Daher hielten wir von dem Vorhaben Abstand, die Experimente zur Auswirkung von Quercetin auf

die Lebensspanne von *C. elegans* auf Agarplatten durchzuführen und kehrten zur altbewährten Methode der Haltung in Flüssigmedium zurück.

4.3 Einfluss von Quercetin auf die Expression von SOD-3

In Flüssigmedium konnte eine Verringerung der Expression von SOD-3 um 15 % durch Quercetin in einer Konzentration von 100 μ M festgestellt werden (Kampkötter et al., 2008). Die hier dargestellten Ergebnisse bestätigen diese Entdeckung. Auch auf Festmedium konnte eine Reduktion der SOD3-Aktivität um ca. 13,5 % festgestellt werden. Allerdings erfolgte bei der doppelten Konzentration an Quercetin eine Zunahme der SOD3-Aktivität um 13 %. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten könnte sein, dass Quercetin in geringeren Konzentrationen zunächst als direktes Antioxidans freie Sauerstoffspezies abfängt und somit den oxidativen Stress reduziert. Durch oxidativen Stress wird SOD-3 induziert (Darr und Fridovic, 1995; Tawe et al. 1998). Werden nun die den oxidativen Stress verursachenden Radikale durch Quercetin abgefangen, so verringern sich der Stress und die Aktivität im Promotor des *sod-3*-Gens ebenfalls. Da SOD-3 ein Zielgen von DAF-16 ist (Honda & Honda., 1999; Murphy et al. 2003; Iser et al. 2010) und da Quercetin die Translokation von DAF-16 in den Nukleus bewirkt (Kampkötter et al., 2008), wäre eine mögliche Erklärung, dass bei sehr hohen Quercetin-Konzentrationen die nicht durch ROS veränderten Quercetin-Moleküle die Aktivität des *sod-3*-Gens direkt oder über den ILS hochregulieren.

Da diese Befunde nur Tendenzen zeigten, zudem nicht signifikant waren und wegen der oben beschriebenen Probleme mit der Löslichkeit von Quercetin in höheren Konzentrationen, trugen auch die Experimente zum Einfluss von Quercetin auf die SOD-3-Expression zu der Erkenntnis bei, dass Quercetin in Festmedium einen ähnlichen, aber schwächeren Effekt aufweist, als in Flüssigmedium.

4.4 Einflüsse auf die Lipidakkumulation von *C. elegans*

4.4.1 Einflüsse von Signalproteinen auf die Lipidakkumulation

Viele Studien haben sich mit der Regulation des Lipidstoffwechsels von *C. elegans* beschäftigt. So wurden insgesamt 305 für den Aufbau des Lipidspeichers zuständige Gene und 112 für dessen Abbau identifiziert. Zu ihnen zählen der *tub-1*-Signalweg, der JKK-Signalweg, der ILS und verschiedene über Stammzellen beeinflusste Signalwege (Mukhopadhyay et al., 2005). In dieser Arbeit wurden die bereits erwähnten Proteine des ILS, die zum JKK-Signalweg gehörende, DAF-16 aktivierende Kinase JNK-1, DAF-16 selber

sowie der Transkriptionsfaktor SKN-1 und die ihn aktivierende Kinase PMK-1 auf ihre Wirkung auf den Lipidspeicher untersucht.

Die den Lipidstoffwechsel beeinflussenden Mechanismen greifen in die gastrointestinale Absorption, die Cytochrom-P450-Aktivität, den Glycerin-, Glucose- und Steroidstoffwechsel ein (Ashrafi et al., 2003). So zeigen beispielsweise Würmer, die mit RNAi gegen die Cytochrom-P450-Gene *cyp-35A2*, *cyp-35A3* und einige weitere *cyp-35A*-Untergruppen behandelt wurden, einen beinahe komplett supprimierten Fettspeicher (Menzel et al., 2007). Eine weitere Einflussmöglichkeit ist das Eingreifen in die Regulation von Lipasen. So wird bei stammzellablatierten Würmern durch DAF-16 die Lipase K04A8.5 induziert, was Lipolyse im Darm zur Folge hat (Wang et al., 2009). Auch andere Enzyme des Fettstoffwechsels wären als Angriffspunkte möglich, wie die Fettsäure-modifizierenden Enzyme Fettsäure-Elongase oder -Desaturase. So führt eine verringerte Aktivität im Gen der Fettsäure-Elongase *elo-2* ebenso zu einem geringeren Lipidgehalt in *C. elegans* wie eine reduzierte Aktivität im Gen der Fettsäure-Desaturasen *fat-4*, *fat-6* und *fat-7* (Horikawa et al., 2008). Die o.g. Möglichkeiten greifen in den Abbau des Lipidspeichers ein, aber auch ein Eingreifen in Mechanismen des Aufbaus des Fettspeichers wäre möglich.

In den Experimenten dieser Arbeit zeigte sich, dass RNAi gegen DAF-16 für eine geringe Reduktion des Gehalts an Speicherfett um 14,5 % sorgt. Wird die Aktivität von SKN-1 durch RNAi gesenkt, vergrößert sich der Fettspeicher um 17,9 %. Daraus kann man den Schluss ziehen, dass DAF-16 eher für den Aufbau und Erhalt des Fettspeichers zuständig ist und SKN-1 eher dessen Abbau bewirkt.

In der Literatur finden sich verschiedene Angaben zum Wirken von DAF-16 auf den Lipidspeicher: Einerseits kann durch DAF-16, wie oben beschrieben, eine Lipase induziert werden. Allerdings sind diese Befunde an stammzellablatierten Würmern entdeckt worden (Wang et al., 2009). DAF-16 reguliert auch die Expression von Cytochromen (Murphy et al., 2003; McElwee et al., 2003). Unter Inhibierung von einigen CYP-450-Genen wurde ein supprimierter Lipidspeicher beobachtet (s.o.). Allerdings müsste, wenn dies der vorrangige Mechanismus der Regulation des Lipidgehalts in *C. elegans* durch DAF-16 wäre, ein eher steigernder Einfluss auf die Lipidakkumulation bei *daf-16*-RNAi zu beobachten sein. Somit spielt dieser Mechanismus als Erklärung für die Ergebnisse eher eine untergeordnete Rolle. Durch eine *daf-16*-Mutation wurde aber auch eine Reduktion der *de-novo*-Fettsäuresynthese beobachtet (Perez & Van Gilst, 2008), was zu einem geringeren Anteil an Speicherfett führte. Im Gegensatz zum sterilen Wurm werden bei fertilen Tieren durch DAF-16 zahlreiche Lipasen supprimiert (McElwee et al., 2003), die dann bei RNAi gegen DAF-16 verstärkt induziert werden. Außerdem werden die oben beschriebenen Fettsäure-Desaturasen durch DAF-16 induziert (Murphy et al., 2003) und bei verminderter Aktivität dieser Enzyme wurde ein geringerer Fettspeicher beobachtet (Horikawa et al., 2008). Dementsprechend können eine unter *daf-16*-RNAi verminderte *de-novo*-Lipidsynthese, eine geringere Suppression der

Lipasen sowie eine verringerte Expression der Fettsäure-Desaturasen als Erklärung für die beobachteten Ergebnisse dienen.

RNAi gegen SKN-1 erhöht in den Experimenten den Lipidgehalt der Würmer um knapp 18 %. Neben der dauerhaften Aktivität in den ASI-Neuronen wird SKN-1 bei Stresssituationen auch in Darmzellen aktiv (An et Blackwell, 2003). Unter diesem Einfluss werden dann Superoxid-Dismutasen, Katalase, Glutathion-S-Transferase, NLPs (*neuron-like peptides*), Hitzeschock-Proteine und eben auch Cytochrom-P450 hochreguliert. Wie bereits erwähnt, baut eine Reihe von Cytochromen den Fettspeicher auf. Ein erhöhter Fettspeicher durch *skn-1*-RNAi spricht also dagegen, dass SKN-1 diesen über die Cytochrome reguliert. Herabreguliert werden Gene, die in Zellhomöostase, Entwicklung, Reproduktion und Wachstum involviert sind (Park et al., 2009). Entsprechend umgekehrt ist das Expressionsmuster dann bei RNAi. Dementsprechend wirkt SKN-1 also eher der Speicherung von Fett entgegen, was den Befund des erhöhten Lipidgehalts unter *skn-1*-RNAi erklären würde. Dazu passt auch eine Studie, in der unter kalorienrestriktiven Bedingungen die Aktivität von SKN-1 gemessen wurde. Hierbei ist SKN-1 in der Lage, die Zellatmung zu erhöhen (Bishop et al., 2007), was eine erhöhte Synthese von ATP und damit einen erhöhten Substratverbrauch zur Folge hat. Dies könnte zu Lipolyse führen. Allerdings konnte dieser Zustand nur unter kalorienrestriktiven Bedingungen und nicht unter normaler Diät beobachtet werden.

Auf Stufe der die Transkriptionsfaktoren aktivierenden Kinasen konnten unterschiedliche Beobachtungen gemacht werden: Eine *jnk-1*-Mutation führt zu einer Reduktion des Lipidspeichers im Wurm um knapp 75 % im Vergleich zum Wildtyp. Diese Reduktion ist deutlich stärker, als man angesichts der bei *daf-16*-RNAi beobachteten Ergebnisse erwartet hätte, passt aber vom Trend her, da JNK-1 durch die Aktivierung von DAF-16 zu synergistischen Effekten führen sollte. Eine mögliche Erklärung für den großen Unterschied im Effekt auf die Lipidspeicherung zwischen Mutation und RNAi-Behandlung ist, dass bei der RNAi das Gen nicht komplett unterdrückt werden kann und somit noch eine Restaktivität vorhanden ist. Nach bestem Gewissen des Autors wurde keine Studie zum Fettspeicher bei *jnk-1*-Mutation publiziert, sodass hier keine Referenzwerte zur Diskussion herangezogen werden können.

Gleiches gilt für Studien zum Fettgehalt bei reduzierter Aktivität von PMK-1. Im Vergleich zu allen anderen Mutanten ist der Gehalt an Speicherfett bei den *pmk-1*-Mutanten erhöht, allerdings im Vergleich zum Wildtyp immer noch signifikant um ca. 53 % niedriger. Angesichts der synergistischen Wirkung von PMK-1 und SKN-1 müsste der gleiche Effekt auf den Lipidspeicher bei Reduktion der Aktivität der beiden Gene erwartet werden. Zumindest ist bei den mit Quercetin behandelten Würmern sowohl bei der *pmk-1*-Mutante als auch bei der *skn-1*-RNAi-Behandlung keine Reduktion des Fettspeichers zu beobachten.

Auch die AKT-Kinasen zeigen einen im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduzierten Lipidgehalt. In der Literatur finden sich hierzu widersprüchliche Angaben. Jones et al. fanden

2009 bei *sgk-1*-Mutanten einen erhöhten Fettspeicher, gleiches wurde für die *akt-1*- und die *sgk-1*-Mutanten im selben Jahr auch von Soukas et al. beobachtet. Passend dazu wurde auch bei der *daf-2*-Mutante, bei der die Aktivität der AKT-Kinasen ebenfalls reduziert ist, ein erhöhter Lipidspeicher gefunden (Ashrafi et al., 2003; Perez & Van Gilst et al., 2008). Im Gegensatz dazu konnte allerdings bei der *sgk-1*-Mutante auch eine Reduktion des Speicherfetts nachgewiesen werden (Yen et al., 2010).

Die große Anzahl an Genen, die in den Fettstoffwechsel von *C. elegans* eingreifen und die vielen verschiedenen Signalwege, die an der komplexen Regulation des Lipidstoffwechsels beteiligt sind, machen eine Zuordnung bestimmter einzelner Gene/Proteine speziell zu bestimmten Aufgaben im Lipidstoffwechsel sehr schwer. Minimale Veränderungen in der Durchführung der Experimente oder in der Aufzucht der Würmer reichen aus, um eine kleine Veränderung in der Genexpression zu bewirken. Dies kann dann durch ein verändertes Zusammenspiel zahlreicher Mechanismen der Regulation des Fettstoffwechsels gegensätzliche Auswirkungen auf die Akkumulation von Lipiden haben. Aber auch methodische Kritik darf nicht unerwähnt bleiben. So ist die Messung von Speicherfett mittels Nil-Rot-Färbung in letzter Zeit kritisiert worden. So akkumuliert der Farbstoff auch in Peroxisomen. Bei hungernden Würmern konnte eine erhöhte Nil-Rot-Fluoreszenz gemessen werden, obwohl der Fettspeicher, mit biochemischen Methoden gemessen, geringer ist (O'Rourke et al., 2009). Auch ist die Anfärbung mit Nil-Rot an die Anwesenheit von Speicherorganellen im Darm gebunden, den s.g. *gut granules*. Kann der Wurm durch eine Mutation diese Speicherorganellen nicht bilden, so zeigt sich eine geringere Fluoreszenz in den Darmzellen, obwohl bei diesen Mutanten der biochemisch gemessene Triacylglyceringehalt nicht geringer ist als beim Wildtyp (Schroeder et al., 2006).

Da in den Experimenten dieser Arbeit die Bedingungen nicht durch einen Hungerzustand der Würmer beeinträchtigt waren und die beschriebene Mutation zur Verhinderung der Bildung von Lipid-Speicherorganellen nicht vorlag, wurden die Experimente trotzdem mit Nil-Rot durchgeführt. Dieser Farbstoff findet bei den meisten Autoren Anerkennung zur Messung des Fettgehalts und ermöglicht eine Bestimmung *in vivo*, was den natürlichen Bedingungen näher kommt als die Messung am fixierten Wurm.

4.4.2 Einflüsse von Quercetin auf die Lipidakkumulation

Bei den Versuchen zeigt sich, dass Quercetin in der Lage ist, den Lipidgehalt in *C. elegans* um zwei Drittel zu senken. In der Literatur lassen sich keine Studien finden, die ebenfalls die Auswirkungen von Quercetin auf den Fettgehalt in *C. elegans* untersucht haben. Jedoch finden sich sehr viele Untersuchungen zu der Auswirkung von Quercetin auf den Fettstoffwechsel und mit ihm assoziierte Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Arteriosklerose bei Säugetieren und Menschen. Es wird berichtet, dass Quercetin die

Leberververfettung bei Mäusen, die mit fetthaltiger Diät ernährt wurden, reduziert (Kobori et al., 2011). Ähnliches konnte auch für Rattenadipozyten nachgewiesen werden, in denen Quercetin Lipolyse induziert (Kuppusamy & Das, 1992). Außerdem konnte beobachtet werden, dass bei Mäusen, die mit einer lipidhaltigen Diät ernährt wurden, der Energieverbrauch der Mäuse durch Quercetin erhöht wird (Stewart et al., 2008). Interessanterweise lässt dieser Effekt nach 3 Wochen nach, korrelierend mit einem in diesem Zeitraum beobachteten Abfall der Plasma-Quercetin-Konzentration. Eine LDL-Cholesterin-senkende Wirkung des Quercetins konnte sowohl bei Kaninchen (Juzwiak et al., 2005) als auch bei japanischen Frauen (Arai et al., 2000) nachgewiesen werden. Anti-arteriosklerotische Eigenschaften des Quercetins konnten ebenfalls am Kaninchen aufgezeigt werden, bei dem durch Quercetin die Fläche an arteriosklerotischen Plaques auf der Aorta gesenkt werden konnte (Juzwiak et al., 2005). Bei LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen wurde die gleiche Beobachtung gemacht: Ein Extrakt aus Maulbeerblättern sowie das in diesen Maulbeerblättern enthaltene Quercetin-3,6-Malonylglukosid reduzierten die von Lipidplaques befallende Aortenoberfläche, Quercetin in Reinform hingegen zeigte diesen Effekt nicht (Enkhmaa et al., 2005). Der in Mäusen gezeigte, Quercetin-vermittelte gesteigerte Energieverbrauch konnte beim Menschen nicht nachgewiesen werden (Egert et al., 2011). Die untersuchten sechs Frauen zeigten auch keinen Gewichtsverlust durch Quercetin. Allerdings waren diese alle gesund und normalgewichtig und die Plasmakonzentrationen des Quercetins waren auch deutlich niedriger als bei den ausschließlich mit einer lipidhaltigen Diät ernährten Mäusen. Insofern ist der lipidsenkende Effekt des Quercetins bei *C. elegans* nicht ganz überraschend.

Die Auswirkungen des Quercetins auf den Fettspeicher bei ILS-Mutanten fallen deutlich schwächer, aber immer noch signifikant aus. Bei sämtlichen Stämmen reduziert Quercetin den Lipidgehalt. Dieser Effekt fällt bei der akt-1-Mutation mit einem um 36 % verringerten Fettspeicher am deutlichsten aus, fast genauso groß ist die Reduktion bei der sgk-1-Mutante. Bei Mutationen im jnk-1-Gen wird eine Fettreduktion um 29 % erreicht und bei akt-2- und pmk-1-Mutationen wird das Speicherfett durch Quercetin um 28 % verringert. Bei der Behandlung von *C. elegans* mit daf-16-RNAi reduziert sich der Lipidgehalt um 34,8 %. Diese Befunde zeigen, dass keinem der getesteten Gene eindeutig und allein die Regulation des Fettspeichers zugeschrieben werden kann. Wäre dies der Fall, so wäre in der betroffenen Mutante kein Effekt des Quercetins nachweisbar. Allerdings ist der Effekt des Quercetins deutlich schwächer, wenn ein Protein aus den o.g. Signalkaskaden fehlt. Somit lässt sich durchaus vermuten, dass Quercetin über den ILS, den JNK- oder den p38/MAPK-Signalweg in die Regulation des Lipidhaushalts eingreift. Da aber noch zahlreiche andere Regulationsmechanismen existieren, lässt sich die durch Quercetin erreichte Reduktion des Fettspeichers nicht durch den Ausfall eines einzelnen Gens rückgängig machen. Dies lässt auch den Schluss zu, dass Quercetin, neben den getesteten Signalwegen, andere

Angriffspunkte in der Regulation des Lipidstoffwechsels besitzt. Mögliche Angriffspunkte des Quercetins in den Fettstoffwechsel wären auf Ebene des ILS eine Regulation der o.g. Lipase über DAF-16 oder der Fettsäuredesaturasen. Denkbar wäre auch ein Einwirken des Quercetins über SKN-1 auf den Energiehaushalt. Es könnte ein kalorienrestriktiver Zustand imitiert werden, bei dem sowohl der Lipidspeicher reduziert, als auch die Lebensspanne verlängert wird. Die Feinregulation der beobachteten Ergebnisse bleibt Gegenstand von Spekulationen und könnte durch Untersuchungen der Proteinexpression, z.B. durch Western-Blot-Analysen, in zukünftigen Arbeiten noch genauer analysiert werden.

4.5 Einflüsse auf die Körpergröße von *C. elegans*

Was die körperliche Entwicklung von *C. elegans* angeht, so haben alle untersuchten Mutationen des ILS einen geringen Einfluss auf die Größe der Würmer, am stärksten ausgeprägt ist er bei einer Mutation im *sgk-1*-Gen. Dies wird auch durch eine bereits vorhandene Arbeit von Soukas et al. (2009) bestätigt. Auch bei der *daf-16*-RNAi fällt die Körpergröße geringfügig kleiner aus, als beim Wildtyp. Eine Behandlung mit Quercetin hat überwiegend keinen Einfluss auf die Größe von *C. elegans*, auch diese Ergebnisse stimmen mit bereits vorhandenen Befunden überein (Pietsch et al., 2009). Einzig bei der *akt-2*-Mutation wird die Entwicklung des Wurms scheinbar durch Quercetin beschleunigt, die behandelten Tiere sind zum Untersuchungszeitpunkt knapp 29 % größer als die Exemplare aus der Kontrollgruppe.

Im Widerspruch dazu steht die Beobachtung, dass bei einer Quercetin-Behandlung von mit *daf-16*-RNAi behandelten Würmern die Körpergröße leicht abnimmt.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Quercetin die Lebensspanne eher nicht über eine verzögerte Entwicklung und damit eine langsamere Alterung verlängert.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss von Quercetin auf die Kernlokalisierung von DAF-16 auch in Festmedium tendenziell bestätigt werden. Allerdings fiel der Effekt geringer aus als im Flüssigmedium, sodass zur besseren Verwertbarkeit der Ergebnisse nicht zu einer methodischen Änderung gegriffen wurde.

Dass Quercetin die Expression von SOD-3 in geringeren Konzentrationen reduziert, konnte hier bestätigt werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass bei höheren Konzentrationen die Expression von SOD-3 ansteigt. Möglicherweise wirkt Quercetin hier, neben seiner Eigenschaft als Radikalfänger, in höheren Konzentrationen als Genregulator des *sod-3*-Gens. Als potenzielle Angriffspunkte für die Verlängerung der Lebensspannen durch Quercetin kommen nach dieser Arbeit SKN-1 und AKT-1 in Frage, bei beiden Proteinen konnte durch eine verminderte Expression kein lebensverlängernder Effekt des Quercetins mehr nachgewiesen werden. V.a. SKN-1 könnte hier eine interessante Rolle spielen, da er beide beobachteten Effekte des Quercetins reguliert: Er begünstigt sowohl eine verlängerte Lebensspanne als auch einen verringerten Fettspeicher. SKN-1 könnte damit auch eine Schlüsselrolle in Zusammenhang zwischen Lebensspanne und Lipidmetabolismus spielen.

Wie bereits erwähnt senkt Quercetin drastisch den Fettspeicher in *C. elegans*. Der Mechanismus bleibt unklar, zu viele Regulationsmechanismen greifen hier ein, sodass die Wirkung eines in seiner Funktion reduzierten Regulatorproteins von anderen Proteinen zumindest teilweise ersetzt werden kann. Dennoch lassen sich Tendenzen erkennen, dass sowohl der ILS als auch SKN-1 eine Rolle in der Regulation des Lipidstoffwechsels spielen, in die Quercetin über diese Proteine eingreifen kann. Auf diesem Bereich ergeben sich weitere interessante Untersuchungsmöglichkeiten für zukünftige Arbeiten.

Einen Zusammenhang zwischen Quercetin und einer Wirkung auf die körperliche Entwicklung von *C. elegans* konnte in dieser Arbeit nicht hergestellt werden. Somit ist eher auszuschließen, dass über diesen Mechanismus eine Lebensverlängerung durch Quercetin erzielt wird.

6 Literaturverzeichnis

- Aballay A, Drenkard E, Hilbun LR, Ausubel FM. *Caenorhabditis elegans* innate immune response triggered by *Salmonella enterica* requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway. *Current Biology* 2003; (13): 47-52.
- An JH, Blackwell TK. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev* 2003; (17): 1882-1893.
- An JH, Vranas K, Lucke M, Inoue H, Hisamoto N, Matsumoto K, Blackwell TK. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; (102): 16275-16280.
- Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinae N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL concentration. *J Nutr* 2000; (130):2243-2250.
- Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 2003; (421):268-272.
- Bartholome A, Kampkötter A, Tanner S, Sies H, Klotz LO. 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. *Arch Biochem Biophys* 2010; (501): 58-64.
- Belinha I, Amorim MA, Rodrigues P, de Freitas V, Moradas-Ferreira P, Mateus N, Costa V. Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* 2007; (55): 2446-2451.
- Berman K, McKay J, Avery L, Cobb M. Isolation and characterization of pmk-(1-3): three p38 homologs in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol Res Commun* 2001; (4): 337-344.
- Bishop NA, Guarente L. Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* 2007; (447): 545-549.
- Bolz DD, Tenor JL, Aballay A. A conserved PMK-1/p38 MAPK is required in *Caenorhabditis elegans* tissue-specific immune response to *Yersinia pestis* infection. *J Biol Chem*; (285): 10832-10840.
- Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 2008; (585): 325-337.
- Braeckman BP, Vanfleteren JR. Genetic control of longevity in *C. elegans*. *Exp Gerontol* 2006; (42): 90-98.
- Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974; (77): 71 – 94.

- C. elegans Sequencing Consortium. : Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 1998; (282): 2012 – 2018.
- Choe KP, Leung CK, Miyamoto MM. Unique structure and regulation of the nematode detoxification gene regulator, SKN-1: implications to understanding and controlling drug resistance. *Drug Metab Rev* 2012; (44): 209 – 223.
- Depuydt G, Xie F, Petyuk VA, Shanmugam N, Smolders A, Dhondt I, Brewer HM, Camp DG, Smith RD, Braeckman BP. Reduced insulin/IGF-1 signaling and dietary restriction inhibit translation but preserve muscle mass in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Proteomics* 2013; PMID: 24002365.
- Dorman JB, Albinder B, Shroyer T, Kenyon C. The *age-1* and *daf-2* genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1995; (141): 1399-1406.
- Duthie GG, Gardner PT, Kyle JA. Plant polyphenols: Are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc* 2003; (2): 599-603.
- Egert S, Rimbach G, Müller MJ. No evidence for a thermic effect of the dietary flavonol quercetin: a pilot study in healthy normal-weight women. *Eur J Appl Physiol* 2011; (111): 869-873.
- Enkhmaa B, Shiwaku K, Katsube T, Kitajima K, Anuurad E, Yamasaki M, Yamane Y. Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* 2005; (135): 729-734.
- Evans EA, Chen WC, Tan MW. The DAF-2 insulin-like signaling pathway independently regulates aging and immunity in *C. elegans*. *Aging Cell* 2008; (7): 879-893.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; (408): 239-247.
- Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 2004; (37): 287-303.
- Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: Epidemiological evidence. *J Med Food* 2005; (8): 281-290.
- Grünz G, Haas K, Soukup S, Klingenspor M, Kulling SE, Daniel H, Spanier B. Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. *Mech Ageing Dev* 2012; (133): 1-10.
- Halaschek-Wiener J, Khattra JS, McKay S, Pouzyrev A, Stott JM, Yang GS, Holt RA, Jones S, Marra MA, Brooks-Wilson AR, Riddle DL. Analysis of long-lived *C. elegans daf-2* mutants using serial analysis of gene expression. *Genome Res* 2005; (15): 603-615.

- Hamilton B, Dong Y, Shindo M, Liu W, Odell I, Ruvkun G, Lee SS. A systematic RNAi screen for longevity genes in *C. elegans*. *Genes Dev* 2005; (19): 1544-1555.
- Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000; (55): 481-504.
- Hayakawa T, Kato K, Hayakawa R, Hisamoto N, Matsumoto K, Takeda K, Ichijo H. Regulation of anoxic death in *Caenorhabditis elegans* by mammalian apoptosis signal-regulating kinase (ASK) family proteins. *Genetics* 2011; (187): 785-792.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002; (13): 572-584.
- Hertweck M, Göbel C, Baumeister R. *C. elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. *Dev Cell* 2004; (6): 577-588.
- Hillyard SL, German JB. Quantitative lipid analysis and life span of the fat-3 mutant of *Caenorhabditis elegans*. *J Agric Food Chem* 2009; (57): 3389-3396.
- Honda Y, Honda S. The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J* 1999; (13): 1385-1393.
- Honda Y, Tanaka M, Honda S. Modulation of longevity and diapause by redox regulation mechanisms under the insulin-like signaling control in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* 2008; (43): 520-529.
- Horikawa M, Nomura T, Hashimoto T, Sakamoto K. Elongation and Desaturation of Fatty Acids are Critical in Growth, Lipid Metabolism and Ontogeny of *Caenorhabditis elegans*. *J Biochem* 2008; (144): 149-158.
- Hughes KA, Reynolds RM. Evolutionary and mechanistic theories of aging. *Annu Rev Entomol* 2005; (50): 421-445.
- Inoue H, Hisamoto N, An JH, Oliveira RP, Nishida E, Blackwell TK, Matsumoto K. The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes Dev* 2005; (19): 2278-2283.
- Iser WB, Wilson MA, Wood WH 3rd, Becker K, Wolkow CA. Co-regulation of the DAF-16 target gene, *cyp-35B1/dod-13*, by HSF-1 in *C. elegans* dauer larvae and *daf-2* insulin pathway mutants. *PLoS One* 2011; (6): e17369.
- Jones KT, Greer ER, Pearce D, Ashrafi K. Rictor/TORC2 Regulates *Caenorhabditis elegans* Fat Storage, Body Size, and Development through *sgk-1*. *PLoS Biol* 2009; (7): e60.

- Juzwiak S, Wojcicki J, Mokrzycki K, Marchlewicz M, Bialecka M, Wenda-Rozewicka L, Gawronska-Szklarz B, Drozdik M. Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. *Pharmacol Rep* 2005; (57): 604-609.
- Kampkötter A, Nkwonkam CG, Zurawski RF, Timpel C, Chovolou Y, Wätjen W, Kahl R. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology* 2007; (234): 113-123.
- Kampkötter A, Timpel C, Zurawski RF, Ruhl S, Chovolou Y, Proksch P, Wätjen W. Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008; (149): 314-323.
- Kawasaki M, Hisamoto N, Iino Y, Yamamoto M, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. A *Caenorhabditis elegans* JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons. *EMBO J* 1999; (18): 3604-3615.
- Kell A, Ventura N, Kahn N, Johnson TE. Activation of SKN-1 by novel kinases in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 2007; (43): 1560-1566.
- Kennedy BK. The genetics of ageing: insight from genome-wide approaches in invertebrate model organisms. *J Intern Med* 2008; (263): 142-152.
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 1993; (366): 461-464.
- Kim DH, Feinbaum R, Alloing G, Emerson FE, Garsin DA, Inoue H, Tanaka-Hino M, Hisamoto N, Matsumoto K, Tan MW, Ausubel FM. A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science* 2002; (297): 623-626.
- Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. Daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1997; (277): 942-946.
- Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002; (76): 560-568.
- Kondo M, Yanase S, Ishii T, Hartman PS, Matsumoto K, Ishii N. The p38 signal transduction pathway participates in the oxidative stress-mediated translocation of DAF-16 to *Caenorhabditis elegans* nuclei. *Mech Ageing Dev* 2005; (126): 642-647.
- Kuppusamy UR, Das NP. Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem Pharmacol* 1992; (44): 1307-1315.
- Kwon ES, Narasimhan SD, Yen K, Tissenbaum HA. A new DAF-16 isoform regulates longevity. *Nature* 2010; (466): 498-502.

- Larsen PL, Albert PS, Riddle DL. Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1995; (139): 1567-1583.
- Li J, Ebata A, Dong Y, Rizki G, Iwata T, Lee SS. *Caenorhabditis elegans* HCF-1 functions in longevity maintenance as a DAF-16 regulator. *PLoS Biology* 2008; (6): e233.
- Li X, Matilainen O, Jin C, Glover-Cutter KM, Holmberg CI, Blackwell TK. Specific SKN-1/Nrf stress responses to perturbations in translation elongation and proteasome activity. *PLoS Genet* 2011; (7): e1002119.
- Libina N, Berman JR, Kenyon C. Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell* 2003; (115): 489-502.
- Maduro MF, Meneghini MD, Bowerman B, Broitman-Maduro G, Rothman JH. Restriction of mesendoderm to a single blastomere by the combined action of SKN-1 and a GSK-3 β homolog is mediated by MED-1 and -2 in *C. elegans*. *Mol Cell* 2001; (7): 475-485.
- McCullough ML, Peterson JJ, Patel R, Jacques PF, Shah R, Dwyer JT. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *Ame J Clin Nutr* 2012; (95): 454-464.
- McElwee J, Bubbs K, Thomas JH. Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16. *Aging Cell* 2003; (2): 111-121.
- Menzel R, Yeo HL, Rienau S, Li S, Steinberg CE, Stürzenbaum SR. Cytochrome P450s and short-chain dehydrogenases mediate the toxicogenomic response of PCB52 in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 2007; (370): 1-13.
- Mohri-Shiomi A, Garsin DA. Insulin signaling and the heat shock response modulate protein homeostasis in the *Caenorhabditis elegans* intestine during infection. *J Biol Chem* 2008; (283): 194-201.
- Mörck C, Pilon M. Caloric restriction and autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* 2007; (3): 51-53.
- Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1996; (382): 536-539.
- Mukhopadhyay A, Deplancke B, Walhout AJM, Tissenbaum HA. *C. elegans* tubby regulates life span and fat storage by two independent mechanisms. *Cell Metab* 2005; (2): 35-42.
- Murakami S, Johnson TE. A genetic pathway conferring life extension and resistance to uv stress in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1996; (143): 1207-1218.
- Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, Li H, Kenyon C. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2003; (424): 277-283.

- Nandakumar M, Tan MW. Gamma-linolenic and stearidonic acids are required for basal immunity in *Caenorhabditis elegans* through their effects on p38 MAP kinase activity. *PLoS Genet* 2008; (4): e1000273.
- Ogg S, Ruvkun G. The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. *Mol Cell* 1998; (2): 887-893.
- Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrzikapa N, Jiang F, Davis RJ, Tissenbaum HA. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; (102): 4494-4499.
- Okuyama T, Inoue H, Ookuma S, Satoh T, Kano K, Honjoh S, Hisamoto N, Matsumoto K, Nishida E. The ERK-MAPK pathway regulates longevity through SKN-1 and insulin-like signaling in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 2010; (285): 30274-30281.
- Onken B, Driscoll M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One* 2010; (5): e8758.
- O'Rourke EJ, Soukas AA, Car CE, Ruvkun G. *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. *Cell Metab* 2009; (10): 430-435.
- Paradis S, Ailion M, Toker A, Thomas JH, Ruvkun G. A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 1999; (13): 1438-1454.
- Paradis S, Ruvkun G. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev* 1998; (12): 2488-2498.
- Park SK, Tedesco PM, Johnson TE. Oxidative stress and longevity in *Caenorhabditis elegans* as mediated by SKN-1. *Aging Cell* 2009; (8): 258-269.
- Pei B, Wang S, Guo X, Wang J, Yang G, Hanq H, Wu L. Arsenite-induced germline apoptosis through a MAPK-dependent, p53-independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Chem Res Toxicol* 2008; (21): 1530-1535.
- Peluso, MR. Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Exp Biol Med* 2006; (231): 1287-1299.
- Perez CL, Van Gilst MR. A ¹³C Isotope labeling strategy reveals the influence of insulin signaling on lipogenesis in *C. elegans*. *Cell Metab* 2008; (8): 266-274.
- Pietsch K, Saul N, Menzel R, Stürzenbaum SR, Steinberg CE. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology* 2009; (10): 565-578.

- Pietsch K, Saul N, Swain SC, Menzel R, , Steinberg CE, Stürzenbaum SR. Meta-Analysis of Global Transcriptomics Suggests that Conserved Genetic Pathways are Responsible for Quercetin and Tannic Acid Mediated Longevity in *C. elegans*. *Front Genet* 2012; (3): doi: 10.3389/fgene.2012.00048. eCollection 2012.
- Przybysz AJ, Choe KP, Roberts LJ, Strange. Increased age reduces DAF-16 and SKN-1 signaling and the hormetic response of *Caenorhabditis elegans* to the xenobiotic juglone. *Mech Ageing Dev* 2009; (130): 357-369.
- Rea SL, Ventura N, Johnson TE. Relationship between mitochondrial electron transport chain dysfunction, development, and life extension in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* 2007; (5): 2312-2329.
- Robida-Stubbs S, Glover-Cutter K, Lamming DW, Mizunuma M, Narasimhan SD, Neumann-Haefelin E, Sabatini DM, Blackwell TK. TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell Metab* 2012; (15): 713 – 724.
- Rohn S, Buchner N, Driemel G, Rauser M, Kroh LW. Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. *J Agric Food Chem* 2007; (55): 1568-1573.
- Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. : *Biochem Pharmacol* 2012; (83): 6-15.
- Samuelson AV, Carr CE, Ruvkun G. Gene activities that mediate increased life span of *C. elegans* insulin-like signaling mutants. *Genes Dev* 2007; (21): 2976-2994.
- Author: Saul N, Pietsch K, Menzel R, Steinberg CE. Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: is DAF-16 involved? *Mech Ageing Dev* 2008; (129): 611-613.
- Schmeisser S, Zarse K, Ristow M. Lonidamine extends lifespan of adult *Caenorhabditis elegans* by increasing the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Hor Metab Res* 2011; (43): 687-692.
- Schroeder LK, Kremer S, Kramer MJ, Currie E, Kwan E, Watts JL, Lawrenson AL, Hermann GJ. Function of the *Caenorhabditis elegans* ABC transporter PGP-2 in the biogenesis of a lysosome-related fat storage organelle. *Mol Biol Cell* 2007; (18): 995-1008.
- Sesso HD, Gaziano JM, Liu S, Buring JE. Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr* 2003; (77): 1400-1408.
- Soukas AA, Kane EA, Carr CE, Melo JA, Ruvkun G. Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 2009; (23): 496-511.
- Stewart LK, Soileau JL, Ribnicky D, Wang ZQ, Raskin I, Poulev A, Majewski M, Cefalu WT, Gettys TW. Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Metabolism* 2008; (57): 39-46.

- Strobel P, Allard C, Perez-Acle T, Calderon R, Aldunate R, Leighton F. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Biochem J* 2005; (386): 471-478.
- Tank EM, Rodgers KE, Kenyon C. Spontaneous age-related neurite branching in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 2011; (31): 9279-9288.
- Troemel ER, Chu SW, Reinke V, Lee SS, Ausubel FM, Kim DH. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genet* 2006; (2): e183.
- Tullet JM, Hertweck M, An JH, Baker J, Hwang JY, Liu S, Oliveira RP, Baumeister R, Blackwell TK. Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell* 2008; (132): 1025-1038.
- Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 2004; (380): 297-309.
- Van Gilst MR, Hadjivassiliou H, Jolly A, Yamamoto KR. Nuclear hormone receptor NHR-49 controls fat consumption and fatty acid composition in *C. elegans*. *PLoS Biol* 2005; (3): e53.
- Vanduy N, Settivari R, Wong G, Nass R. SKN-1/Nrf2 inhibits dopamine neuron degeneration in a *Caenorhabditis elegans* model of methylmercury toxicity. *Toxicol Sci* 2010; (118): 613-624.
- Villanueva A, Lozano J, Morales A, Lin X, Deng X, Hengartner MO, Kolesnick RN. jkk-1 and mek-1 regulate body movement coordination and response to heavy metals through jnk-1 in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 2001; (20): 5114-5128.
- Walker AK, See R, Batchelder C, Kophengnavong T, Gronniger JT, Shi Y, Blackwell TK. A conserved transcription motif suggesting functional parallels between *Caenorhabditis elegans* SKN-1 and Cap'n'Collar-related basic leucine zipper proteins. *J Biol Chem* 2000; (275): 22166-22171.
- Wang MC, O'Rourke EJ, Ruvkun G. Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. *Science* 2008; (322): 957-960.
- Wedick NM, Pan, A, Cassidy A, Rimm EB, Sampson L, Rosner B, Willett W, Hu FB, Sun Q, van Dam RM. Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Am J Clin Nutr* 2012; (95): 925-933.
- Wolf M, Nunes F, Henkel A, Heinick A, Paul RJ. The MAP kinase JNK-1 of *Caenorhabditis elegans*: location, activation, and influences over temperature-dependent insulin-like signaling, stress responses, and fitness. *J Cellular Physiol* 2008; (214): 721-729.

- Wolkow CA, Muñoz MJ, Riddle DL, Ruvkun G. Insulin receptor substrate and p55 orthologous adaptor proteins function in the *Caenorhabditis elegans* daf-2/insulin-like signaling pathway. *J Biol Chem* 2002; (277): 49591-49597.
- Yen K, Le TT, Bansal A, Narasimhan SD, Cheng JX, Tissenbaum HA. A comparative study of fat storage quantitation in nematode *Caenorhabditis elegans* using label and label-free methods. *PloS One* 2010; (5): e12810.
- Yochum L, Kushi LH, Meyer K, Aaron F. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am Journal Epidemiol* 1999; (149): 943-949.
- Zarse K, Ristow M. Antidepressants of the serotonin-antagonist type increase body fat and decrease lifespan of adult *Caenorhabditis elegans*. *PloS One* 2008; (3): e4062.

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.

20.01.2014, Holger Bosbach