

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

Flavonoide: Quercetin, Kaempferol, Rutin und Fisetin
und ihre Effekte im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

Dissertation

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

vorgelegt von
Ruben Felix Zurawski
(2017)

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. rer. nat. Andreas Kampkötter

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz

Widmung:

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern,
deren unbedingte Liebe und vollständige Unterstützung
mich und mein Leben von Anbeginn geprägt haben.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

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 May 5;234(1-2):113-23. Epub 2007 Feb 21.

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 Feb;149(2):314-23. Epub 2007 Oct 16.

Zurawski R., Büchter C., Pielarski T., Gombitang C., Chovolou., Wätjen W., Kampkötter A., Kahl R. **Einfluss von Flavonoiden und EGb761 auf die Stress-Resistenz von *C. elegans*** Posterbeitrag: 48. Frühjahrstagung der DGPT, 2007 März 13.-15. Mainz

Zusammenfassung:

Flavonoide sind in zahlreichen Varianten ubiquitärer Bestandteil pflanzlicher Nahrung. Die Zahl der bekannten Substanzen nimmt stetig zu und parallel mehren sich die wissenschaftlichen Erkenntnisse über positive Effekte einer flavonoidreichen Ernährung. Im Rahmen medizinischer Forschung wird ein positiver Einfluss der Flavonoide, insbesondere auf Erkrankungen des Alters beschrieben. Sie werden in Einzelfällen bereits pharmakologisch genutzt. Die genaue Wirkweise ist jedoch noch in weiten Teilen unklar und nur in einem Bruchteil der bekannten Substanzen untersucht.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wirkung der Flavonoide Quercetin, Kaempferol, Rutin und Fisetin, die aufgrund ihrer Verbreitung relevante Bestandteile menschlicher Ernährung darstellen.

Mit zellfreien Methoden konnte gezeigt werden, dass alle Testsubstanzen potente Antioxidantien darstellen. Im zweiten Schritt wurde der Einfluss auf Stressresistenz und Lebensspanne des multizellulärer Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* bestimmt. Die mit Quercetin, Kaempferol und Rutin, nicht jedoch die mit Fisetin behandelten Versuchsgruppen zeigten eine erhöhte Resistenz gegen intrazellulären oxidativem Stress. Quercetin verursachte als einzige Substanz eine signifikante Lebensverlängerung unter stressfreien Kulturbedingungen. Ein Zusammenhang mit den radikalfangenden Eigenschaften erscheint naheliegend. Aufgrund der unterschiedlichen Effektstärke und der fehlenden Protektion durch Fisetin, dem stärksten Antioxidanz, ergab sich die Hypothese, dass auch Signalkaskaden relevant beeinflusst wurden.

Mithilfe des transgenen *Caenorhabditis elegans* Stamm TJ 356 konnte gezeigt werden, dass Flavonoide zu einer Translokation des Transkriptionsfaktors DAF-16 in den Nukleus führen. DAF-16 spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Stressresistenz und Lebensspanne der Modellorganismen. Somit konnte eine Interaktion mit diesem zentralen Signalweg belegt werden, die zudem höchstwahrscheinlich für die zuvor beobachteten Effekte mitverantwortlich war.

Im transgenen Stamm CF 1553 wurden Veränderungen in der Expression des antioxidativen Enzyms SOD-3, einem DAF-16 Zielgen, im lebenden Modellorganismus untersucht. Thermaler und oxidativer Stress führten, im Sinne einer Schutzreaktion, zu einer erhöhten SOD-3-Produktion. Die Flavonoide führten unter stressfreien Bedingungen zu einer Erniedrigung der SOD-3 Expression. Die Erniedrigung trotz DAF-16-Translokation belegt einen Einfluss der Substanzen auf weitere DAF-16 unabhängige SOD-3 regulierende Faktoren. Sie stützt zudem die Hypothese, dass die DAF-16-Translokation Folge einer Interaktion mit Signalwegen war und keine ausschließlich direkte Reaktion auf mögliche prooxidative Effekte der Antioxidantien.

Zusammenfassend konnten für die Mehrzahl der Flavonoide positive Effekt im Modellorganismus belegt werden. Hierbei konnte neben dem antioxidativen Effekt eine Interaktion mit relevanten Signalkaskaden nachgewiesen werden. Die verwendeten Methoden ermöglichten dabei eine zeiteffiziente, vergleichende Bewertung der Testsubstanzen.

Die Ergebnisse stützen die Erkenntnisse zu positive Effekten der Flavonoide im Menschen und nähren die Hoffnung, diese in Zukunft zunehmend gezielt pharmakologisch nutzen zu können.

Verzeichnis der Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2/-azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)
ADP	Adenosindiphosphat
AGE-1	AGEing alteration- 1
AKT	Serin-Threonin-Kinase
AP-1	Aktivator Protein- 1
BL-1	<i>C. elegans</i> Stamm, GSH::GFP-Reportermutante
<i>C. elegans</i>	Caenorhabditis elegans
c.i.	Konfidenzintervall
DAF	abnormal Dauer Formation
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimehylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EGb	Extrakt of Ginko biloba
et al.	et alii (und andere)
Fis	Fisetin
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
h	hour (Stunde)
HDL	High-Density-Lipoprotein
HSF-1	Heat-Shock-Transkriptionfaktor
HSP	Hitzeschockproteine
Insulin/IGF	Insulin/Insulin-like-Growth-Faktor
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Jug	Juglone
Kae	Kaempferol
L	Liter
L2	Larvenstadium 2
LDL	Low-Density-Lipoprotein
Lsg.	Lösung
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
Min	Minuten
MW	Mittelwert
N	Stichprobenumfang
NF-κB	Nuclear-Faktor `Kappa-light-chain-enhancer` of activated B-Cells
NGM	Nematode-Growth-Medium
p53	Tumorsuppressorgen mit 53 kD Molekulargewicht
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline mit Tween 20
PDK	PIP3-dependent-kinase
PI-3-Kinase	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphate
PIP ₃	Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphate
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Que	Quercetin
RNAi	Ribonukleinsäure-interference
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
rcf	Relative centrifugal force (relative Zentrifugalkraft)

Rut	Rutin
S.A.	Standard Abweichung
sec.	seconds (Sekunden)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SGK-1	Serum und Glukokorticoide-induzierbare Kinase
SIR 2.1	silent information regulator
SMK-1	Dictyostelium suppressor of mek null Homolog
SOD	Superoxid-Dismutase
T	time (Zeit)
Tab.	Tabelle
TEAC-Assay	Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity-Assay
TOR	target of Rapamycin
TUB-1	TUBby-related
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis:

1 Einleitung:

1.1	Allgemeine Einleitung	1
1.2	Flavonoide als Gegenstand medizinischer Forschung	1
1.3	ROS, Antioxidantien und Signaltransduktion	6
1.4	<i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus	9
1.5	Die Insulin/IGF- Signalkaskade	12
1.6	Zielsetzung	15

2 Ergebnisse:

2.1	Vergleich der antioxidativen Potentiale mittels TEAC-Assay	17
2.2.1	Einfluss der Flavonoide auf oxidativen Stress durch H ₂ O ₂	18
2.2.2	Einfluss der Flavonoide auf oxidativen Stress durch Juglone	20
2.3	Einfluss der Flavonoide auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i>	22
2.4.1	Einfluss von Stressoren auf die DAF-16 Lokalisation in TJ 356	24
2.4.2	Einfluss der Flavonoide auf die DAF-16 Lokalisation in TJ 356	25
2.5.1	Einfluss von Stressoren auf die SOD-3 Induktion in CF 1553	26
2.5.2	Einfluss der Flavonoide auf die SOD-3 Induktion in CF 1553	27
2.6.	Übersicht der Ergebnisse	29

3 Diskussion und Schlussfolgerung:

3.1	Diskussion	30
3.2	Schlussfolgerung	37

4 Materialien und Lösungen: 40

5 Methoden:

5.1	Kultivierung und Grundlegende Untersuchungsmethoden	
5.1.1	NGM-Agarplatten und Flüssigmedium	45
5.1.2	Kultivieren von OP-50 Bakterien	46
5.1.3	Stammhaltung von <i>C. elegans</i>	46
5.1.4	Semisynchronisation von <i>C. elegans</i>	47

5.1.5	UV-Mikroskopie von lebenden <i>C. elegans</i>	48
5.2	Messung des antioxidativen Potentials mittels TEAC-Assay	48
5.3	Methode für die Untersuchung der Stressresistenz von N 2	
5.3.1	Oxidativer Stress durch H ₂ O ₂	50
5.3.2	Oxidativer Stress durch Juglone	51
5.4	Untersuchung der Lebensspanne von N 2	52
5.5	Untersuchung der DAF-16 Lokalisation in TJ 356	53
5.6	Untersuchung der SOD-3 Induktion in CF 1553	55
6	Quellenverzeichnis	57

1 Einleitung:

1.1 Allgemeine Einleitung:

In der aktuellen wissenschaftlichen Forschung gewinnen pflanzliche Polyphenole rasch an Aufmerksamkeit und Bedeutung. Grund sind die wachsende Zahl bekannter Substanzen und sich festigende Erkenntnisse zu positiven Effekten. Die genaue Wirkweise ist jedoch noch in weiten Teilen unaufgeklärt und nur ein kleiner Teil der bekannten Substanzen intensiv erforscht.

Die vorliegende experimentelle Arbeit untersucht vier Vertreter aus der Untergruppe der Flavonoide auf Effekte im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*. Dabei wird der Einfluss auf die Lebensspanne, die Resistenz gegenüber oxidativem Stress, dem ausgewählten Transkriptionsfaktor DAF-16 und eines seiner Zielgene, das antioxidative Enzym SOD-3 untersucht.

Der Fokus des Abschnitts 1.2 liegt auf den Flavonoiden und den für die Humanmedizin relevanten Forschungsergebnissen. Als Schwerpunkte werden zunächst die epidemiologischen und im Anschluss die experimentellen Untersuchungen zu verschiedenen Erkrankungen und Krankheitsmodellen betrachtet. Besondere Aufmerksamkeit erhalten die altersassoziierten Erkrankungen. Die folgenden Abschnitte sollen einen Überblick über Themen geben, die für das Verständnis und bei der Interpretation der anschließenden Untersuchungen von Bedeutung sind. Die Grundlagen des oxidativen Stress und seiner intrazellulären Folgen und zellulärer Schutzsysteme werden in 1.3 dargestellt. Anschließend wird der verwendete Modellorganismus *C. elegans* mit seinen speziellen Eigenschaften vorgestellt, die ihn für die spezielle Untersuchung so wertvoll machen (1.4). Mehrere Experimente beschäftigen sich mit dem Transkriptionsfaktor DAF-16, einer Schlüsselstelle des Insulin/IGF-Wegs in *C. elegans*. Daher wird dieser Signalweg ausführlich und weitere Einflussgrößen kurz dargestellt (1.5). Abschließend wird in Abschnitt 1.6 die Zielsetzung der Arbeit formuliert.

1.2 Einleitung Flavonoide als Gegenstand medizinischer Forschung:

Flavonoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die ubiquitär in allen Pflanzen vorkommen (Manach *et al.*, 2004). Folglich sind Flavonoide fester Bestandteil unserer Ernährung. Studien aus den USA und den Niederlanden zeigen, dass Tee eine der ergiebigsten Quellen in den westlichen Kulturen darstellt. Sie kommen auch in Früchten, Obst, Gemüse, Soja, Kaffee und Wein in größeren Mengen vor (Song & Chun, 2008; Hollman & Katan, 1999). Verschiedene Substanzen wie das Quercetin sind mittlerweile in konzentrierter Form als Nahrungsergänzungsmittel käuflich zu erwerben.

Flavonoide sind eine sehr heterogene Gruppe von Substanzen, die in den Pflanzen unter anderem als Farb- und Bitterstoffe wirken. Mittlerweile sind weit über 8000 Flavonoide bekannt und es kommen regelmäßig weitere hinzu (Arts & Hollman, 2005). Die Basisstruktur dieser Substanzen besteht aus einem O-heterocyclischen Kohlenstoffring und einem aromatischen Ringsystem. An C₂ ist diese Struktur mit einem weiteren aromatischen Ringsystem verbunden (Abbildung 1).

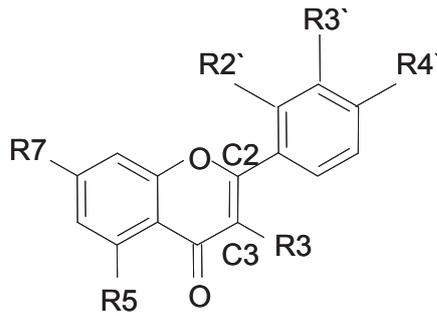


Abb. 1: Basisstruktur der Flavonoide (Yoshimura et al., 2009)

Das Interesse an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen hat in den vergangenen Jahren massiv zugenommen. Das Stichwort „*flavonoid*“ erzielt allein beim Internetportal für wissenschaftliche Fachtexte des National Center for Biotechnology Information und der U.S. National Library of Medicine über 8000 Einträge. Mehr als 75 % davon wurden nach dem Jahr 2000 veröffentlicht (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> [Stand: 10.07.2015]).

In der nichtwissenschaftlichen Öffentlichkeit ist dieses Thema ebenfalls präsent. Das Motto „5 am Tag“ der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. soll die Bevölkerung motivieren, sich vermehrt pflanzlich zu ernähren. Als Begründung werden auch die positiven Effekte sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe angeführt (URL: [http://www.dge.de/wissenschaft/weitere Publikationen/fachinformationen/sekundäre-pflanzenstoffe-und-ihre.wirkung](http://www.dge.de/wissenschaft/weitere_Publikationen/fachinformationen/sekundäre-pflanzenstoffe-und-ihre.wirkung) [Stand: 10.07.2015]). Verschiedene Firmen bewerben ihre Lebensmittel als reich an natürlichen Antioxidantien und Flavonoiden und verweisen auf deren potentiell gesundheitsfördernde Effekte.

In der Forschung zur traditionellen chinesischen Medizin gelten sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe als wichtige Komponenten. Eine traditionelle Rezeptur beinhaltet durchschnittlich 10-12 verschiedene Pflanzen (Chen *et al.*, 2006), folglich enthält jede auch zahlreiche Flavonoide. Diese sind potentielle Einflussgrößen auf den menschlichen Organismus und werden als Urheber der therapeutischen Effekte diskutiert. In der Phytotherapie, einer Grundsäule der westlichen Naturheilverfahren, gilt Ähnliches. Hierbei werden jedoch aus einzelnen Pflanzen Extrakte hergestellt, die naturgegeben flavonoidreiche Endprodukte darstellen.

Worauf stützt sich die These, Flavonoide seien gesund? An dieser Stelle sollen zunächst verschiedene epidemiologische Studien betrachtet werden. Die zitierten Arbeiten untersuchten die Zusammenhänge zwischen einer flavonoidreichen Ernährung und chronischen Erkrankungen.

Es existieren zahlreiche Veröffentlichungen mit nachweisbaren kardioprotektiven Effekten durch Flavonoide. Die Autoren bringen dies mit dem französischen Paradoxon in Verbindung, welches im Rahmen des MONICA-Projekts der World Health Organisation entdeckt wurde. Die französische Bevölkerung zeigte dabei, im Gegensatz zum allgemeinen Trend, trotz des Konsums großer Mengen gesättigter Fettsäuren eine bemerkenswert niedrige Rate von koronaren Herzkrankheiten. Dies wird wiederholt in Zusammenhang mit dem Konsum von Wein und den darin enthaltenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen der Trauben gebracht (Vidavalur *et al.*, 2006; Hamer & Steptoe, 2006; Renaud & Lorgeril, 1992). Die epidemiologischen Studien zu kardioprotektiven Effekten der Flavonoide sind jedoch nicht einheitlich positiv ausgefallen. Neben Studien, die eine signifikante Verminderung des Risikos einer koronaren Herzkrankheit

zeigen, finden sich solche, die keine Effekte zeigen konnten (Erdman *et al.*, 2007; Arts & Hollmann, 2005).

Es wird eine positive Rolle einer flavonoidreichen Ernährung in der Tumörprävention diskutiert. In verschiedenen epidemiologischen Studien aus den USA, Skandinavien und den Niederlanden der Jahre 1999 bis 2003 konnte eine Reduktion der Inzidenz des Lungenkarzinoms und Rektalkarzinoms gezeigt werden, jedoch nicht anderer Lokalisationen. Dabei zeigten drei prospektive Kohortenstudien signifikante protektive Effekte, drei weitere keinen oder geringe Effekte, eine einzelne sogar ein erhöhtes relatives Risiko (Arts & Hollmann, 2005). Die Ergebnisse sind nicht einheitlich, von der Tendenz jedoch überwiegend positiv. Bestätigt wird die protektive Wirkung gegen Lungen- und Rektumkarzinome durch verschiedene neuere Studien (Arts, 2008; Bobe *et al.*, 2008;). Weitere epidemiologische Studien lassen vermuten, dass auch die Tumorgenese in weiteren Organen beeinflusst werden kann, beispielsweise in Brust, Prostata oder Ovarien (Wu *et al.*, 2008; Wu and Yu, 2006).

Studien in Tier- und Zellmodellen eröffneten potentielle pharmakologische Einsatzgebiete im Rahmen weiterer Erkrankungen. Darunter befinden sich neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Parkinson (Spencer, 2008; Mandel & Youdim, 2004; Dajas *et al.*, 2003), der Diabetes mellitus (Zanatta *et al.*, 2008), entzündliche Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis, das Asthma bronchiale und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (Santaneglo *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2002; Knekt *et al.*, 2002).

In der Summe betrachtet, betreffen die Studien vor allem die Erkrankungen des alternden Menschen. In unserer Wohlstandsgesellschaft nehmen diese Erkrankungen als Kostenfaktor und als Ursache großen Leids für die einzelnen Betroffenen einen immer höheren Stellenwert ein und sind folglich von besonderem Interesse.

Neben der Frage, ob ein positiver Effekt messbar ist, steht auch die Frage, wie dieser Effekt zustande kommt. In der Folge soll auf Studien und Experimente zu den Wirkmechanismen der Flavonoide in Krankheitsprozessen eingegangen werden. Berücksichtigt werden hier Herz- und Gefäßerkrankungen, Tumorerkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen und entzündliche Prozesse.

Motiviert durch das bereits erwähnte französische Paradoxon wurden die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe als Schutzfaktor vor Herz- und Gefäßerkrankungen untersucht. Anerkannte Risikofaktoren dieser Erkrankungen sind die Bildung und Stabilität artherosklerotischer Plaques, die Plättchenaggregation der Thrombozyten, der Gefäßtonus und die Gewebedefekte nach Infarktereignissen.

In vitro und *in vivo* wurde gezeigt, dass Flavonoide die Oxidation von LDL hemmen (Vidavalur, 2006; Fernandez & Volek, 2006; Milde *et al.*, 2007). Bei gesunden Versuchspersonen erhöhten sie die Konzentration der protektiven HDL (High-Density-Lipoprotein) um durchschnittlich 5,2 % (Erlund *et al.*, 2008). Die Oxidation des cholesterinhaltigen LDL (Low-Density-Lipoprotein) und die Konzentrationen von LDL und HDL sind ein wichtiger Faktor in der Bildung artherosklerotischer Plaques (Chisolm & Steinberg, 2000) und bereits wichtiger Ansatzpunkt moderner Pharmakotherapie.

Ein weiterer Risikofaktor ist die Aktivierung der Thrombozyten. Es wurde gezeigt, dass Flavonoide die Aktivierung von Thrombozyten durch verschiedene Mediatoren verringern können, namentlich Adenosindiphosphat, Thromboxan und Epinephrin. Beeinflusst werden dabei bekannte thrombogene Faktoren, wie das Glykoprotein IIb/IIIa und P-selectin. Die Aggregationshemmung durch Flavonoide ist jedoch

schwächer ausgeprägt als bei gebräuchlichen Pharmaka (Pearson *et al.* 2005, Vidavalur 2006).

An den Gefäßen führen verschiedene Flavonoide zu einer Weitstellung und vermindern die Vasokonstriktion durch körpereigene Mediatoren. (Perez-Vizcaino *et al.*, 2006; Woodman *et al.*, 2005; Rending *et al.*, 2001). Bemerkenswert ist, dass Flavonoide die Effektivität des gefäßerweiternden Stickstoffmonoxid (NO) verbessern können, obwohl sie NO durch ihr antioxidatives Potential inhibieren müssten. Eine Studie mit der Substanz Quercetin konnte beweisen, dass dies im zellfreien Medium tatsächlich geschieht, der NO-Effekt *in vivo* jedoch erhöht wird (López-López *et al.*, 2004).

Alle aufgeführten Effekte können potentiell positiven Einfluss auf die Genese einer Gefäß- und Herzerkrankung haben und es gibt Hinweise, dass Flavonoide auch im Falle einer manifesten Erkrankung von Bedeutung sein können.

In Krankheitsmodellen für Herzinfarkt und Schlaganfall zeigten die Versuchstiere mit Polyphenolbehandlung ein besseres Outcome. So verminderte Kaempferol in Ratten mindestens 40 % der Hirnschäden nach 1 Stunde Ischämie. Beeinflusst werden vor allem die Pathomechanismen, die zu Schäden in der Reperfusionphase, also der Zeit nach Wiederherstellung der Durchblutung, führen (López-Sánchez *et al.*, 2007). Vergleichbares gilt bei Herzischämie für Weinpolyphenole (Sato *et al.*, 2002). Die Autoren wiesen dabei einen verminderten oxidativen Stress (López-Sánchez *et al.*, 2007) und eine Modulation verschiedener Zellkaskaden nach (Perez-Vizcaino *et al.*, 2006).

In der Forschung zur Tumorprävention zeigt sich der janusköpfige Charakter der pflanzlichen Polyphenole. Hier wurden nicht nur zellprotektive Eigenschaften nachgewiesen, die potentielle kanzerogene DNA-Schäden verhindern könnten, sondern auch die Induktion des programmierten Zelltodes, der Apoptose, durch Flavonoide. Dies konnte gezeigt werden in Zellen des Lungenkarzinoms (Lambert *et al.*, 2007), des Colonkarzinoms (Agullo *et al.*, 1994), der Leukämie (Wang *et al.*, 1999), des hepatozellulären Karzinoms (Tanigawa *et al.*, 2008; Granada-Serrano *et al.*, 2006), in Pankreaskarzinomzellen von Menschen und Tieren (Mouria *et al.*, 2002) und Prostatakarzinomzellen (Aalinkel 2008). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Quercetin kam in fast allen zitierten Studien zum Einsatz und zeigte zumeist besonders ausgeprägte Effekte.

Bei der Induktion des programmierten Zelltodes kam es zu messbaren Veränderungen im mitochondrialen und extrinsischen Apoptosesystems (Ramos 2007; Fresco *et al.*, 2006). Verschiedene bekannte Apoptosezeichen waren messbar erhöht (Sharma *et al.*, 2005; Mouria *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1999). Quercetin verschob in experimentellen Zellkulturstudien das Verhältnis der proapoptotischen und antiapoptotischen Proteine der Tumorzellen zu Gunsten der proapoptotischen. Es konnte das Tumorsuppressorgen p 53 induzieren und parallel zellprotektive Faktoren und proliferative Transkriptionswege inhibieren (Aalinkel *et al.*, 2008; Granada-Serrano *et al.*, 2006; Tanigawa *et al.* 2008).

Von einigen Autoren werden Flavonoide als Ergänzung zu bereits etablierten Chemotherapien diskutiert, wo sowohl Zellschutz, als auch Apoptoseinduktion gewünschte Effekte sein können. Anhand verschiedener aggressiver Pankreaskarzinomzellen konnten Nair *et al.* zeigen, dass Teile dieser Effekte umso ausgeprägter sind, je schneller die Zellen proliferieren. Damit verbunden ist eine potentielle Selektivität für Tumorzellen (Nair *et al.*, 2004). Versuche *in vitro* zeigen, dass Quercetin die chemotherapeutische Wirkung von Cisplatin in Hautkrebszellen

verstärken (Sharma *et al.*, 2005), wohingegen es die toxische Wirkung der Medikamente Chloroquin und Doxorubicin reduzieren kann (Farombi 2006; Kaiserová *et al.*, 2007).

Gerade angesichts der teils gegensätzlichen Wirkungen der Substanzen ist die Dosis von entscheidender Bedeutung. Beispielsweise schützen 10 µmol/l Quercetin Rattenhepatomzellen vor Schäden durch Wasserstoffperoxid, wohingegen 50 µmol/l ausreichen, um im gleichen System selbst toxisch zu wirken (Wätjen *et al.*, 2005).

In der Behandlung der Alzheimer-Erkrankung und anderer neurodegenerativer Erkrankungen kommen Ginko biloba Extrakte (EGb) bereits zur Anwendung. Diese enthalten neben anderen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen große Mengen an Quercetin und Kaempferol. In einer Metaanalyse von klinischen Studien an Alzheimer-Patienten kommen Oken *et al.* zu dem Schluss, dass Ginko biloba Extrakte den Verfall von Kognition, Fähigkeiten des täglichen Lebens- und Sozialverhaltens positiv beeinflussen können, ohne unerwünschte Nebenwirkungen zu verursachen (Oken *et al.*, 1998). Weitere Untersuchungen an Menschen sowie Tier- und Zellkulturmodellen stimmen damit überein (Le Bars *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2002; Müller & Chatterjee, 2003).

Als Wirkmechanismen werden positive Veränderungen in der Durchblutung, eine Verlangsamung der Artherosklerose, eine Hemmung der Entzündungsreaktion und eine direkte Zellprotektion beobachtet. Letztere zeigt sich in erhöhter Resistenz von neuronalen Zellen gegen Noxen, Verminderung der schädlichen Lipidperoxidation nach Endotoxinschock und einer besser erhaltenen Redox- und Calciumhomöostase unter Stressbedingungen. Die Substanzen wirken den schädigenden Faktoren, vermutlich als Radikalfänger, Eisenchelatoren und über die Beeinflussung der Apoptose, entgegen (Dajas *et al.*, 2003; Mandel & Youdim 2004).

Die in EGb enthaltenen Flavonoide können die Formation von Amyloid-β-Fibrillen in Zellkulturen und im zellfreien Modell hemmen. Amyloid-β-Fibrillen werden bei der Alzheimer-Erkrankung im ZNS gebildet (Luo *et al.*, 2002). In Zellen des Zentralen Nervensystems lassen sich nach Flavonoidbehandlung Veränderungen in Signalwegen nachweisen. Belegt ist dies für verschiedene Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK) (Mandel *et al.*, 2005), neuronaler Ionenkanäle, Wachstumshormonen und Transkriptionsfaktoren sowie für die Transkription der als protektiv geltenden neuronalen Thyrosin/Threonin-Phosphatase-1 (Müller & Chatterjee, 2003; Watanabe *et al.*, 2001).

Eine Parallele zwischen vielen chronisch verlaufenden Erkrankungen des Alters ist die Bedeutung der Entzündungsreaktion. Dies gilt auch und besonders für die bereits erwähnte Tumorgenese, die koronare Herzkrankheit, die Artherosklerose, die Neurodegeneration, die rheumatoide Arthritis, das Asthma bronchiale und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung. Zahlreiche Veröffentlichungen der letzten Jahre belegen, dass verschiedene Flavonoide die Entzündungskaskade beeinflussen können. Trotz unterschiedlichster Ätiologie und Manifestation der Erkrankungen sind die rekrutierbaren zellulären und azellulären Faktoren der Entzündungskaskade begrenzt. Sie sind daher in verschiedenen Erkrankungen ähnlich oder gleich.

Besonders eingehend untersucht ist die Interaktion der Flavonoide mit dem Arachidonsäurestoffwechsel, der eine bedeutende Schaltstelle in der Bildung von Entzündungsstoffen darstellt (Kim *et al.*, 2004). Der Arachidonsäurestoffwechsel führt zu den proinflammatorischen Prostaglandinen über die Schlüsselenzyme Cyclooxygenase 1 und 2 und über das Enzym Lipoxigenase zu den proinflammatorischen Leukotrienen. Beide Wege können durch verschiedene Flavonoide im Sinne einer

Entzündungshemmung beeinflusst werden, vergleichbar mit der Wirkung nichtsteroidaler antiphlogistischer Pharmaka (Kim *et al.*, 2004).

Für andere Botenstoffe der Entzündungsreaktion konnte ebenfalls eine Hemmung von Wirkung und Produktion durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe aufgedeckt werden. Belegt wurde dies überwiegend *in vitro* mittels Zellkulturen. Flavonoide reduzieren beispielsweise die Menge von Tumornekrosefaktor- α , Interferon- γ und verschiedenen Interleukinen in Abwehrzellen unterschiedlicher Zellreihen. Darunter befinden sich stimulierte Makrophagen (Badia *et al.* 2004; Kowalski *et al.*, 2005), humane Lymphozyten (Miles *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2008), humane Basophilen (Higa *et al.*, 2003) und histaminstimulierte Mastzellen (Min *et al.*, 2007). Als mögliche Ansatzpunkte gelten die Konzentration von Radikalen und der Transkriptionsweg des *Nuclear-Faktor`Kappa-light-chain-enhancer of activated B-Cells* (NF- κ B) (De Stefano *et al.*, 2007; Garcia-Mediavilla *et al.*, 2006; Hämäläinen *et al.*, 2007). Bemerkenswert ist, dass diese Effekte bereits Flavonoidkonzentrationen auftraten, die durch die Nahrungsmittelaufnahme erreichbar sind und die hier zitierten Experimente ausnahmslos Quercetin oder Kaempferol verwendeten, zumeist im Vergleich zu anderen Flavonoiden.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass in der näheren Vergangenheit sehr viele Interaktionsmöglichkeiten von Flavonoiden mit medizinisch relevanten Faktoren entdeckt wurden. Dies bestärkt die positiven Erwartungen, die durch verschiedene epidemiologische Studien geweckt wurden, dass Flavonoide sich in der Behandlung von Krankheiten und zur Erhaltung der Gesundheit gezielt einsetzen lassen.

Als problematisch ist dabei zu bemerken, dass die Gruppe der Flavonoide mit mehreren tausend Substanzen sehr heterogen gestaltet ist. Daher lassen sich die Experimente mit einzelnen Substanzen nicht ungeprüft auf alle Substanzen übertragen. Erschwerend kommt hinzu, dass in den Ernährungsstudien eine solche Vielfalt von Inhaltsstoffen in Frage kommt, dass sich die Erkenntnisse nur bedingt zu gezielter Pharmakotherapie nutzen lassen. Mit Ginko biloba hat sich bereits ein flavonoidreiches Präparat in der westlichen Schulmedizin etabliert, jedoch besteht noch ein großer Forschungsbedarf, um das Potential der Substanzen richtig zu beurteilen und es im Sinne der Medizin auszuschöpfen.

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies, Antioxidantien und Signaltransduktion:

Die Wirkung der Flavonoide als Antioxidantien und die Diskussion um diese Eigenschaft als Ursache für zahlreiche beobachtete Effekte macht es notwendig, sich auch näher mit den intrazellulären Oxidantien zu beschäftigen. Entscheidend ist dabei die Tatsache, dass alle durch Sauerstoffradikale verursachten Effekte prinzipiell durch den antioxidativen Effekt der Flavonoide beeinflusst werden könnten.

Daher soll im Folgenden ein kurzer Überblick gegeben werden über die intrazelluläre Quellen von freien Radikalen, ihre schädigende Wirkung, die Schutzmechanismen der Zellen, die Bedeutung in Signalwegen und im Alterungsprozess. Darin enthalten sind wichtige Grundlagen für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente.

Freie Radikale sind Moleküle mit einem ungepaarten Elektron in einem Molekülorbital. Dieses Elektron verursacht ein stark gesteigertes Potential, mit anderen Substanzen zu reagieren (Winterbourn, 1993).

Die Quellen für freie Radikale in biologischen Systemen sind zahlreich und die bedeutendste Fraktion stellen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffverbindungen dar. Namentlich genannt seien hier aufgrund ihrer Bedeutung als reaktive Sauerstoffspezies das Hyperoxid-Anion (O_2^-), der Radikalbildner Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das extrem reaktive Hydroxylradikal ($\text{HO}\bullet$).

Die Produktion von einer oder mehrerer der genannten Substanzen ist für zahlreiche biologische Vorgänge belegt, zum Beispiel für den unperfekten Elektronentransport der mitochondrialen Atmungskette, den Fettsäuremetabolismus der Peroxisomen, die Aktivität zahlreicher verschiedener Enzyme des Cytochrom P-450-Systems, die Aktivität der Xanthinoxidase und der Membran gebundenen Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase, die Fentonreaktion von Sauerstoffverbindungen mit ionisierten Eisenmolekülen und die Radikalbildung durch Phagozyten im Rahmen der Abwehr von Fremd- und Mikroorganismen, den „*respiratory burst*“ (Beckman & Ames, 1998; Dröge, 2002; Thannickal & Fanburg, 2000; Valko *et al.*, 2004).

Übersteigt die Konzentration der produzierten reaktiven Verbindungen die protektive Wirkung der zelleigenen Abwehrmechanismen entsteht oxidativer Stress. Dieser verursacht in relevantem Ausmaß Schäden an Desoxyribonukleinsäure (DNA), Lipiden und Proteinen. DNA-Veränderungen betreffen sowohl Purin und Pyrimidinbasen als auch das Deoxyribose-Skelett und können zu permanenten Mutationen führen (Valko *et al.*, 2004). Aus der Gruppe der Lipide reagieren besonders mehrfach ungesättigte Fettsäuren an den Kohlenstoff-Doppelbindungen mit den Radikalen. Ihre Oxidation stört die Membranfluidität und die Funktion von Proteinen mit Lipidankern (Beckman & Ames, 1998; Coskun *et al.*, 2005). Bei Proteinen sind vor allem Aminosäureseitenketten mit den empfindlichen Methionin und Cystein betroffen (Valko *et al.*, 2006).

Als Anpassung an die schädlichen Nebenprodukte des aeroben Stoffwechsels verfügen alle Organismen, von den aeroben Bakterien bis zu hochentwickelten Säugetieren, über stark konservierte Schutz- und Reparaturmechanismen (Beckman & Ames, 1998). Enzymatische Schutzmechanismen sind die verschiedenen Formen der Superoxid-Dismutasen, Katalasen und Glutathion-Peroxidasen. Die jeweiligen Reaktionsgleichungen sind in Abb. 2 dargestellt. Die Superoxid-Dismutase (SOD) existiert in verschiedenen Isoformen. An Membranen und im Zytoplasma finden sich vorwiegend Formen mit Kupfer und Zink im aktiven Zentrum. In Mitochondrien überwiegt die Mangan-SOD (Mn-SOD). Sie katalysiert den ersten Schritt zu Hyperoxid-Anionentgiftung. Dabei entsteht Wasserstoffperoxid (McCord *et al.*, 1971). Dies reagiert mit Hilfe der Katalase weiter zu Wasser und Sauerstoffmolekülen. Alternativ, mit Hilfe der Glutathion-Peroxidase unter Verbrauch zweier Glutathionmoleküle, zu Wasser und Glutathion-Disulfid (Crespo *et al.*, 2007; Harris, 1992; Moskaug *et al.*, 2005;).



Abb. 2: Reaktionsgleichungen antioxidativer Enzyme.

Bekannte nichtenzymatische Schutzmechanismen basieren unter anderem auf Vitamin C, Vitamin E und Carotinoiden. Diese können durch ihr antioxidatives Potential mit ROS reagieren und diese entgiften (Fusco *et al.*, 2007;). Ähnliches wird als Wirkmechanismus der Flavonoide diskutiert (Hanneken *et al.*, 2006; Noroozi *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006).

Interessanterweise sind die gleichen Substanzen in hohen Konzentrationen auch prooxidativ und zeigen toxische Effekte. Ein antioxidatives Potential setzt die Fähigkeit einer Substanz voraus, mit anderen zu reagieren. Dies geschieht bevorzugt mit den hochreaktiven Radikalen. Bei Inkubation von Zellen mit großen Mengen von Antioxidantien hingegen zeigen die Zellen Schäden, vergleichbar mit denen bei oxidativem Stress durch Radikale. Der Schadensmechanismus ist, in Abwesenheit höherreaktiver Substanzen, eine Reaktion der Antioxidantien mit Zellstrukturen (Crespo *et al.*, 2007; Robaszekiewicz *et al.*, 2007; Wätjen *et al.*, 2005).

Zwischen Produktion und Entgiftung der ROS entsteht unter Ruhebedingungen ein stabiles Gleichgewicht, die Redoxhomöostase (Dröge, 2002). Verschiedene regulatorische Prozesse nutzen Redoxreaktionen zur Vermittlung von Signalen durch milde Verschiebung des Reduktionsgleichgewichts. Es konnte nachgewiesen werden, dass die ROS-Konzentration im Verhältnis zur Aktivität der DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren wie dem Aktivator Protein-1 (AP-1) und dem nukleären Transkriptionsfaktor NF- κ B steht (Dröge, 2002).

Von zahlreichen Signalwegen wird postuliert, dass sie Radikale über Oxidasen als Teil der Signalkaskaden produzieren. Hierbei kommt es unter anderem zur Vermehrung von H₂O₂ oder O₂⁻. Diese Stoffe reagieren mit nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren (Thannikal & Fanburg, 2000; Valko *et al.*, 2006). NO, H₂O₂ und HO• können zum Beispiel als Transmitter die lösliche Guanylatcyclase stimulieren (Mittal & Murad, 1977).

Mögliche Wirkmechanismen sind die Modifikation von Proteinen durch Oxidation von Cysteinresten, Verbindung zweier Aminosäuren über Disulfidbrücken, Dimerisierung, Dityrosinbildung und die Oxidation von Metallionen (Thannikal & Fanburg, 2000; Valko *et al.*, 2006).

Um die Homöostase zu erhalten ist auch die Genexpression antioxidativer Schutzmechanismen vom Redoxstatus abhängig. Dies wurde bereits für die SOD, Katalase und Glutathionreduktase gezeigt (Crespo *et al.*, 2007; Dröge, 2002; Harris, 1992). Auf diese Weise wird ein Gleichgewicht zwischen notwendiger Aktivität und Schutzfunktion gewahrt. Eine überschießende antioxidative Aktivität würde jene Zellkaskaden stören, deren Funktion von der Redoxhomöostase abhängen. Ein vollständiges Fehlen der SOD erhöht wiederum die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber ROS deutlich (Imamura *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007). Somit übersteigt die Rolle der antioxidativen Systeme, wie der SOD, die Bedeutung eines einfachen Schutzmechanismus.

Der Zusammenhang von oxidativem Stress, Alter und Krankheit wird intensiv untersucht, seit Denham Harman 1956 seine „Free radical Theorie of Aging“ veröffentlichte (Harman, 1956, Harman, 2006). Sie besagt, dass die Kumulation von radikalinduzierten Veränderungen eine entscheidende Größe des Alterungsprozesses darstellt. Laut Harman wird die Zellalterung durch die Radikalschäden und ihre Folgen ausgelöst, die im Laufe der Lebensdauer zunehmen. Im Wechselspiel von Zellfunktion und ROS-Produktion ist ein gewisses Maß an ROS-induzierten Schäden unvermeidbar. Die Reparaturmechanismen der Zelle beheben einen Großteil der Defekte. In der Summe entsteht dennoch eine Kumulation von Schäden während der gesamten

Lebensdauer einer Zelle. Schäden auf dem Genom können an Tochterzellen weitergegeben werden.

Die Verbindung zwischen gesteigertem Energieverbrauch mit erhöhter ROS-Bildung, deren Schadenspotential und einer reduzierten Lebenserwartung führten zur „*Rate of Living Theorie*“. Grundlage ist die Beobachtung, dass die Lebenserwartung von Versuchstieren wie Mäusen und *C. elegans* mit Abnahme der Stoffwechselaktivität, zum Beispiel durch Kalorienrestriktion, zunimmt (Speakman *et al.*, 2002). Hiermit verbunden ist ein reduzierter Sauerstoffverbrauch und folglich geringere ROS-Produktion. Dies steht in direktem Zusammenhang zur „*Free radical Theorie of Aging*“.

Die genannten Publikationen zeigen, dass reaktive Sauerstoffspezies einen bedeutenden Risikofaktor bilden, aber auch eine notwendige regulatorische Funktion erfüllen. Der Körper hat sich durch Schutzmechanismen, wie der SOD, an die permanente Anwesenheit von Radikalen angepasst. Dieser Schutz erscheint jedoch teilweise lückenhaft. In der Folge kommt es zu Zellschäden, die Teil der Krankheitsentstehung und des Alterungsprozesses sind. Als Antioxidantien könnten Flavonoide möglicherweise die radikalinduzierten Effekte beeinflussen. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob durch eine vermehrte Zufuhr von protektiven Faktoren eine Reduktion der schädlichen Folgen möglich wäre. Dabei ist zu bedenken, dass auch die Redoxhomöostase und somit die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflusst werden könnte. Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit die Faktoren Stress, intrazelluläre Abwehr und Signaltransduktion in Modellorganismen betrachtet werden.

1.4 *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus:

Die vorliegende Arbeit verwendet den Nematoden *Caenorhabditis elegans* als Versuchstier für nahezu alle Experimente. Das folgende Kapitel soll den Modellorganismus vorstellen und darstellen, warum er als Versuchsobjekt auch für die Humanmedizin relevant ist. Neben den grundlegenden biologischen Eigenschaften wird besonders auf die Vorteile eingegangen, die ihn als Versuchsobjekt für die gestellten Hypothesen prädestinieren.

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* ist ein erdbewohnender Fadenwurm. Er wurde erstmals 1974 von Sidney Brenner als Modellorganismus verwendet und ist heutzutage hervorragend etabliert (Brenner, 2009).

C. elegans war 1998 der erste Organismus, dessen Genom vollständig sequenziert werden konnte (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Es finden sich für 60 bis 80 % aller *C. elegans*-Gene Homologe beim Menschen (Astin *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2000). Datenbanken wie Wormbase (URL: <http://www.wormbase.org>) ermöglichen einen zentralen Zugriff auf einen Großteil der bekannten Daten.

Die großen genetischen Überschneidungen machen *C. elegans* auch für die Humanmedizin und pharmakologische Grundlagenforschung interessant (Kaletta & Hengartner, 2006). So existieren Modelle für Alterungsprozesse (Schaffitzel & Hertweck, 2006), Übergewicht (Ashrafi, 2007), Tumorerkrankungen (Hara & Han, 1995; Pinkston *et al.*, 2006), und Neurodegeneration. Das Nervensystem von *C. elegans* nutzt Transmitter wie Serotonin und Dopamin mit Signalwegen, die den menschlichen sehr ähnlich sind (Chase & Koelle, 2007).

Zahlreiche für einen Modellorganismus vorteilhafte Eigenschaften ergeben sich aus der Natur des Wurms. *C. elegans* entwickelt sich bei Raumtemperatur +3 °C bis +30 °C gut. Als Hermaphroditen befruchten sich die Exemplare überwiegend selbst, seltener kommen aber auch männliche Tiere vor, die ihre Gene auf die anderen Tiere übertragen können. In der Folge lassen sich Generationen von stabilen Mutanten erzeugen, sofern diese reproduktionsfähig sind. Durch Selektion männlicher Genträger lassen sich Mutanten vermehren und im Idealfall kreuzen.

Die adulten Tiere erreichen eine Größe von ca. 1,3 mm, sind auf festem und in flüssigem Medium in großen Zahlen und kostengünstig kultivierbar. Die stabilen Eier bieten die Möglichkeit der Lagerung im Gefrierstock über lange Zeiträume.

Die durchschnittliche Lebenserwartung der Wildtypen beträgt ca. 21 Tage. Nach 3 bis 4 Tagen und dem Durchlaufen von 4 Larvenstadien sind die Tiere geschlechtsreif und erzeugen jeweils ca. 300 Nachkommen. Somit lassen sich in einem begrenzten Zeitraum mehrere Generationen über die gesamte Lebensspanne beobachten. Dies ist gerade bei den Untersuchungen zu Alterung und Lebenserwartung von unschätzbarem Wert. Selbst einfache Mausmodelle benötigen dafür ein Vielfaches der Zeit.

Unter schlechten Umweltbedingungen kann *C. elegans* ein alternatives L2-Larvenstadium, die Dauerlarve, ausbilden. Dauerlarven fressen nicht, reproduzieren sich nicht und können ungünstige Umweltbedingungen für mehrere Monate überstehen (Hu, 2007).

Die Stabilität der Eier gegenüber äußeren Einflüssen ermöglicht die im Rahmen der Arbeit verwendete Methode der Synchronisation. Hierfür werden Kulturplatten mit gemischter Generation von Tieren mit toxischen Substanzen behandelt. Diese töten die Larven und Adulte. Die Eier bleiben jedoch unbeeinträchtigt. Als Endprodukt entsteht eine Kultur von Tieren, die sich gleichzeitig im Eistadium befanden. Auf diese Weise können altershomogene Versuchsgruppen erzeugt werden.

C. elegans ist transparent, so dass die gesamte Anatomie bis hin zur einzelnen Zelle vom Ei bis zum lebenden Tier mikroskopisch differenzierbar ist. Dies ermöglichte die Aufdeckung der genauen Entwicklung eines *C. elegans* vom Ei, bis zum ausgewachsenen Adulten.

Die Entwicklung jeder Zelle ist bekannt und folgt einem exakten Programm. Durch die gesamte Embryogenese werden 671 Zellen generiert. Davon sterben bei Hermaphroditen 113 und bei Männchen 111 Zellen den programmierten Zelltod (Sulston *et al.*, 1983). Adult besteht ein Hermaphrodit aus exakt 959 und ein Männchen aus 1031 somatischen Zellen. Es entsteht ein Organismus mit verschiedenen Organsystemen, darunter ein Nervensystem, ein Verdauungstrakt, Ausscheidungsorgane, Gonaden und Muskulatur (Abbildung 3). Es finden sich Gewebsinteraktionen, Stoffwechsel und Hormonsysteme. Auch Faktoren wie Resorption, Akkumulation, Entgiftung, Ausscheidung und Vulnerabilität der einzelnen Gewebe gehen als Einflussgrößen in die verschiedenen Experimente ein.



Abb. 3: Lichtbild eines *C. elegans* Hermaphroditen

Die Transparenz ist Grundvoraussetzung für die im Rahmen der folgenden Experimente zur SOD-Aktivität und DAF-16-Lokalisation.

Untersucht wurden in dieser Arbeit der genmanipulierte *C. elegans* Stamm TJ 356. Dieser exprimiert einen an ein grünfluoreszierendes Protein (GFP) gebundenen Transkriptionsfaktor Abnormal-Dauer-Formation-16 (DAF-16) (Henderson & Johnson, 2001). Das DAF-16::GFP-Fusionsprotein leuchtet im Fluoreszenzmikroskop in den Zellen der Nematoden (Chalfie *et al.*, 1994). Das Fluoreszenzmuster verändert sich je nach Lokalisation des Transkriptionsfaktors. Der kontrollierende Insulin/IGF-Signalweg ist in Kapitel 1.5. ausführlich dargestellt.

Der genmanipulierte *C. elegans* Stamm CF 1553 produziert ein SOD-3::GFP-Fusionsprotein (Libina *et al.*, 2003). Das Protein verleiht dem Protein eine Fluoreszenz im UV-Mikroskop (Chalfie *et al.*, 1994). Durch die quantitative Auswertung dieser Fluoreszenz lässt sich das Ausmaß der Enzymproduktion direkt messen.

Die beiden Stämme ermöglichen die Untersuchung der intrazellulären Prozesse am lebenden Tier. Somit fallen alle Störgrößen weg, die durch das Töten der Tiere und postmortale Veränderungen entstehen würden.

Die leichte Kultivierbarkeit mit kurzer Lebensspanne und die Interaktion der verschiedenen Gewebe siedelt *C. elegans* zwischen Zellkulturen und größeren Versuchstieren an. Seine Transparenz, die Möglichkeit stabiler Mutanten, die großen Homologien zu Säugetieren auf Gen- und Proteinebene und das voll sequenzierte Genom rechtfertigen den zunehmenden Einsatz in den verschiedensten Bereichen der Naturwissenschaften, darunter auch der medizinischen Grundlagenforschung.

Höhepunkte der Forschung mit *C. elegans* sind insgesamt drei Nobelpreise. (URL: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2002/ [Stand 01.07.2010]).

Die Transparenz machte Beobachtungen und Grundlagenforschungen zur Regulation von Organentwicklung und Apoptose möglich. Sidney Brenner, Robert Horvitz und John Sulston erhielten hierfür 2002 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Die Entwicklung der *Ribonukleinacid-interference* (RNAi), einer Technik zur Manipulation von Genexpression, bereichert die Genforschung, findet breite Anwendung und gelang erstmals in *C. elegans* (Fire *et al.*, 1998). Für die Entwicklung erhielten Andrew Fire und Craig Mello 2006 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Martin Chalfie, Osamu Shimomura und Roger Tsien erhielten für die Entwicklung des Grünfluoreszierenden-Protein-Fusionsgens (GFP) im Jahre 2008 den Nobelpreis für Chemie. Ihre Entwicklung macht die Lokalisation und Expression von Genprodukten, unter anderem in *C. elegans*, sichtbar (Chalfie *et al.*, 1994) und wird in der vorliegenden Arbeit zur Messung der SOD-Expression und Bestimmung der DAF-16 Lokalisation verwendet.

1.5 Die Insulin/IGF- Signalkaskade:

Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Experimente betrachten den Einfluss der Flavonoide auf die Lebensspanne und Stressresistenz des Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Die Insulin/Insulin-like-growth-factor-Signalkaskade (Insulin/IGF) ist eine wichtige Einflussgröße für diese Parameter. Aufgrund der Bedeutung soll dieser Abschnitt einen Überblick über den Signalweg geben.

Der Transkriptionsfaktor Abnormal-Dauer-Formation-16 (DAF-16) ist eine zentrale Schaltstelle der Signalkaskade und die Superoxiddismutase eines seiner Zielgene. Folglich stehen die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Experimente zur DAF-16 Lokalisation und der SOD-Expression in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Insulin/IGF-Signalweg.

Der Insulin/IGF-Signalweg und seine entsprechenden Homologe finden sich speziessübergreifend unter anderem bei Nematoden und Säugetieren. Die einzelnen Faktoren sind zumeist sehr stark konserviert, was ihre Bedeutsamkeit betont (Kenyon, 2005).

In *C. elegans* spielt der Signalweg eine zentrale Rolle für Entwicklung, Stoffwechsel, Reproduktion, Lebensspanne, Stressresistenz und die Kontrolle des Dauerstadiums (Hertweck *et al.*, 2004).

Infolge intensiver Forschung sind bereits zahlreiche Erkenntnisse über den Insulin/IGF-Weg gewonnen worden und die Signalkaskade zu großen Teilen bekannt. Zur Veranschaulichung sind die Zusammenhänge in Abbildung 4 grafisch dargestellt (Modifiziert nach Hertweck *et al.*, 2004). Die einzelnen Faktoren werden im Folgenden in der Reihenfolge ihrer Aktivierung vorgestellt.

In *C. elegans* finden sich die insulinähnlichen Liganden vermehrt unter guten Umweltbedingungen mit günstiger Temperatur, fehlenden Noxen und ausreichend Nahrung. Dementsprechend sind sie bei Mangelzuständen und Stress vermindert. Die Zahl der bekannten Liganden übersteigt die bei Säugern (Pierce *et al.*, 2001). Sie binden die transmembranäre Rezeptortyrosinkinase DAF-2, die dem Insulin- und IGF-Rezeptoren beim Säuger entspricht. Diese aktiviert die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)/AGEing alteration-1 (AGE-1).

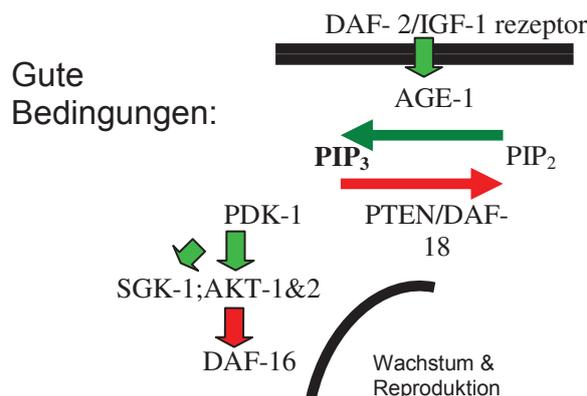
Isolierte *daf-2-* oder *age-1-knock out*-Mutanten zeigen eine enorme Lebensverlängerung (Finkel & Hoolbrook, 2000; Gill, 2006; Pinkston *et al.*, 2006). In Säugetieren lässt sich ein vergleichbarer Effekt nachweisen. Mäuse besitzen zwar unterschiedliche Rezeptoren für Insulin und IGF, aber Defekte in einem oder beiden Rezeptoren bewirken eine Verlängerung der Lebensspanne von bis zu 50 %. Dies gilt auch für gleichartige Veränderungen in Regulatoren oder folgenden Komponenten der Signalwege (Kenyon, 2005).

Gegenspieler von AGE-1 ist die Lipidphosphatase DAF-18, ein Homolog des beim Menschen als Tumorsuppressor bekannten Phosphatase und Tensin homolog (PTEN) (Lian & Di Cristofano, 2005; Wang *et al.*, 2005). Sie wandelt den Botenstoff Inositoltriphosphat (PIP₃) in Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) um. Überwiegt die Inositoltriphosphatproduktion wird die PIP₃-dependent-kinase (PDK) und anschließend die Serine/threonine Kinasen 1 und 2 (AKT-1, AKT-2) und die Serum und Glukokorticoind induzierbare Kinase (SGK-1) aktiviert. Säuger besitzen jeweils gleichnamige Homologe.

Die Kinasen AKT-1, AKT-2 und SGK-1 sind in ihrer Struktur sehr ähnlich und können ihre Wirkung einzeln und gemeinsam als Multimer entfalten. Die Bedeutung von AKT-1 und AKT-2 überwiegt vermutlich bei der Bildung der Dauerformen und die der SGK eher bei Stresstoleranz und Langlebigkeit (Hertweck *et al.*, 2004).

Ziel der Signalkaskade ist die Phosphorylierung des Forkheadtranskriptionsfaktors DAF-16. Ist der Signalweg aktiv, wird DAF-16 phosphoryliert, verbleibt im Zytosol und ist inaktiv. Bei schlechtem Nahrungsangebot, thermalem Stress, oxidativem Stress, Erkrankungen oder Mutationen bleibt das Insulin/IGF-Signal aus. Dann liegt DAF-16 unphosphoryliert vor. In dieser Form kann DAF-16 in den Zellkern gelangen und die Transkription von Zielgenen stimulieren (Hertweck *et al.*, 2004; Kenyon, 2005).

Insulin/IGF-Signalling in *C.elegans*



Insulin/IGF-Signalling in *C.elegans*

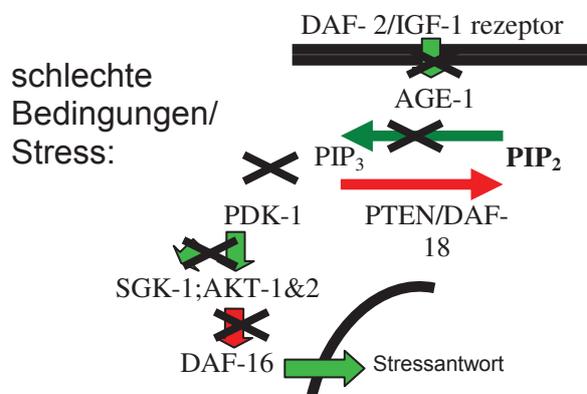


Abbildung 4 a + b: Insulin/IGF-Signalweg modifiziert nach Hertweck *et al.* 2004, mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Bekannte Folge der DAF-16-Aktivierung ist eine verlängerte Lebensspanne, erhöhte Stressresistenz, verstärkte Immunabwehr und Veränderungen des Fettstoffwechsels. Ein klassisches Zielgen codiert die SOD-3, deren Transkription durch DAF-16 vermehrt induziert wird. Gleiches gilt für die Katalase und die Gluthationtransferase (Kenyon, 2005; Oh *et al.*, 2005 a).

Bemerkenswert ist, dass DAF-16-Aktivität in manchen Organsystemen von *C. elegans* positive Effekte auf den gesamten Organismus ausüben kann, in anderen nicht. So erreichen Würmer in Mosaikversuchen bei isoliert erhöhter Aktivität im Darm 60 % der Lebensverlängerung, die bei ubiquitärer Überaktivität erreicht wird. Bei erhöhter DAF-16-Aktivität im Nervensystem werden nur 5-15 % und im Muskel keine signifikante Lebensverlängerung verursacht. Bei DAF-16-*knock-out*-Mutanten reduzieren sich die meisten Effekte gegen Null, was dessen zentrale Bedeutung belegt (Libina *et al.*, 2003).

Der Insulin-IGF-Signalweg ist jedoch nicht der Einzige, der DAF-16 nutzt. Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die alternative Wege zur DAF-16-Aktivierung aufzeigen. Die Signalkaskaden liegen teilweise oder vollständig außerhalb der oben beschriebenen Insulin/IGF-Signalkaskade. Die Januskinase-1 (JNK-1) ist ein MAPK-Weg und bekannt als Faktor bei Stressantwort, Entwicklung und neuronaler Funktion von *C. elegans* (Kawasaki *et al.*, 1999). Für sie konnte ein aktivierender Einfluss auf DAF-16 mit Lebensverlängerung gezeigt werden. Dies geschieht unabhängig von DAF-2 (OH *et al.*, 2005).

Die Erhöhung der Widerstandskraft der Nematoden sowie eine Lebensverlängerung durch vermehrte JNK- Expression ist auf die Funktion von DAF-16 angewiesen (OH *et al.*, 05 b).

Der Heat-shock-transkriptionfactor-1 (HSF-1) reagiert in *C. elegans* auf thermale Belastung mit vermehrter Transkription protektiver Proteine. DAF-16 ist daran beteiligt, aber nicht für alle Zielgene notwendig. Ein Funktionsverlust des *hsf-1*-Gens vermindert die Lebensspanne von *C. elegans* und beschleunigt alterstypische Veränderungen (Schaffitzel & Hertweck, 2006).

Das Protein Silent information regulator-2.1 (SIR-2.1) interagiert unter Stressbedingungen direkt mit DAF-16 und nimmt dadurch positiven Einfluss auf die Lebensspanne und Stressresistenz. Vermehrte SIR-2.1-Genkopien sind in der Lage, diese Effekte zu erhöhen (Berdichevsky *et al.*, 2006).

Ebenfalls DAF-16-abhängige Effekte zeigen die Faktoren Target of Rapamycin (TOR) und TUBby-related-1 (TUB-1). TOR reagiert auf Hormone, Nahrungsbestandteile und Produkte des Aminosäurestoffwechsels und TUB-1 spielt unter anderem eine Rolle im Fettstoffwechsel (Schaffitzel & Hertweck, 2006).

Die zitierten Veröffentlichungen belegen die Wichtigkeit des Transkriptionsfaktors DAF-16, der eine zentrale Schaltstelle des Insulin/IGF-Wegs darstellt. Zudem steht er in Wechselwirkung mit zahlreichen weiteren Prozessen. Dies ist bei der Interpretation der folgenden Experimente zu berücksichtigen.

1.6 Zielsetzung:

Die vorliegende Arbeit untersucht die Effekte von Flavonoiden in *C. elegans*. Dabei sollen drei Ziele verfolgt werden:

Erstes Ziel ist es nachzuweisen, ob die verwendeten Flavonoide einen Einfluss auf die Lebensspanne und Stressresistenz des Modellorganismus *C. elegans* haben.

Zweitens soll untersucht werden, ob etwaige Effekte durch das antioxidative Potential oder direkte Interaktion mit dem Insulin/IGF-Signalweg verursacht werden.

Drittens soll beurteilt werden, ob die angewandten Methoden eine zeiteffiziente Vorauswahl darstellen, um aus der großen Substanzklasse der pflanzlichen Polyphenole potentielle Pharmaka zu selektieren.

Um Effekte und Wirkmechanismen auf die einzelnen Substanzen zurückzuführen ist es notwendig, diese isoliert zu betrachten. Aus dem riesigen Feld bekannter Polyphenole wurden vier Vertreter aus der Gruppe der Flavonoide ausgewählt. Diese sollen parallel untersucht und vergleichend betrachtet werden. Dabei handelt es sich um die Flavonole Quercetin, Kaempferol und Fisetin sowie Rutin, ein Glykosid des Quercetins. Die Strukturformeln sind in Abbildung 5 dargestellt.

Die Substanzen sind bereits in unterschiedlichem Maße Gegenstand der Forschung in der Toxikologie der Heinrich-Heine-Universität gewesen. Dies ermöglicht, die Ergebnisse in einem größeren Kontext zu betrachten. Die Substanzen unterscheiden sich ausreichend in ihrer Struktur, um kein identisches Verhalten erwarten zu lassen. Sie entstammen jedoch der selben Gruppe der Polyphenole, so dass eventuell gemeinsame, gruppentypische Effekte aufgedeckt werden könnten.

Der Modellorganismus *C. elegans* wurde für die genannte Fragestellung bewusst ausgewählt. In der Forschung zu Flavonoiden findet *C. elegans* bislang keine weitreichende Anwendung und stellt insofern eine bemerkenswerte Besonderheit dar.

Die Wahl beruht auf seiner Stellung zwischen höher entwickelten Modellorganismen und Zellkulturen. Durch die kurze Lebensspanne und einfache Kultivierbarkeit ist er deutlich weniger zeit- und kostenintensiv zu untersuchen als Säugetiere. Die Lebensumstände sind einfach zu standardisieren. Die Tiere sind selbstbefruchtende Hermaphroditen und genetisch homogen, was die Anzahl möglicher Confounder-Effekte reduziert. Ihr verhältnismäßig einfacher Aufbau und das begrenzte Genom reduzieren zudem die Menge redundanter Gene.

Dennoch findet sich im Gegensatz zu Zellkulturen eine Gewebeinteraktion. Bei vergleichbarem Aufwand mit Zellkulturen ist es nicht nötig, immortalisierte Zellen zu verwenden, die dadurch einen Verlust typischer Eigenschaften des Alterns erleiden und insbesondere für die Frage nach der Lebensspanne ungeeignet sind.

Die Fragestellungen der Arbeit sollen in mehreren Schritten beantwortet werden.

Im TEAC-Assay wird zunächst das antioxidative Potential der Testsubstanzen quantifiziert. Der Versuch soll Rückschlüsse auf die Bedeutung des antioxidativen Potentials ermöglichen.

Es folgen Experimente zur Lebensspanne und Stressresistenz. Diese stehen inhaltlich mit den epidemiologischen Studien zur polyphenolreichen Ernährung in Verbindung. Mit den reduzierten Einflussgrößen sollen hier eine mögliche Lebensverlängerung oder Lebensverkürzung durch die Testsubstanzen untersucht werden.

Dabei stellt die Zielgröße Lebensspanne die Summe aller positiven und negativen Einflüsse für den Organismus dar.

Die Lebenserwartung unter Stressbedingungen soll weitere mögliche protektive Effekte der Flavonoide aufdecken. Als Stressor dienen extra- und intrazelluläre Sauerstoffradikale. Diese sind bekanntermaßen eine Wirkgröße im Pathomechanismus verschiedener chronischer Erkrankungen und des Alterungsprozesses (Harman, 1956; Loeb *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2006;). Daher ist die Resistenz gegen oxidativen Stress von medizinischem Interesse und steht zudem in direktem Zusammenhang mit der Lebensspanne.

In den abschließenden Versuchen sollen Wirkungen auf molekularer Ebene untersucht werden. Dafür wird mit DAF-16 ein Schlüsselenzym des Insulin/IGF-Signalwegs betrachtet und eines seiner Zielgene SOD-3. Der Signalweg hat bekanntermaßen große Bedeutung für die Lebensspanne und Stressresistenz von *C. elegans* und die SOD-3 ist Teil der zellulären Schutzmechanismen gegen Sauerstoffradikale (Hertweck *et al.*, 2004; Pinkston *et al.* 2006). Somit knüpfen diese Experimente direkt an die übrigen Versuche an.

Die Experimente sind Grundlagenforschung und Teil der übergeordneten Fragestellung: Ob und wie Flavonoide in der Zukunft für die humanmedizinische Pharmakotherapie nutzbar gemacht werden können.

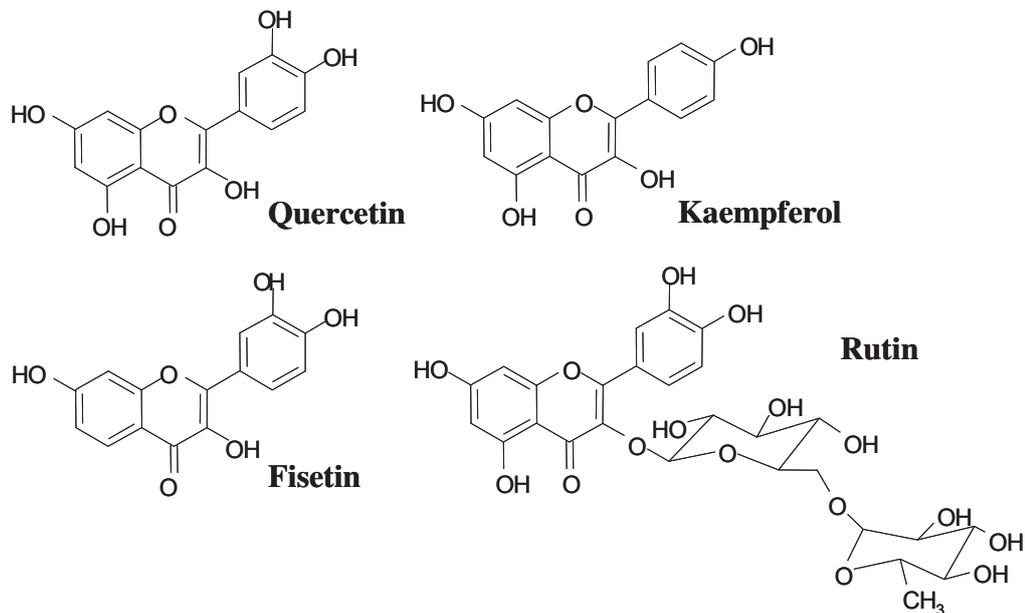


Abb. 5: Strukturformeln der Flavonole Quercetin, Kaempferol, Fisetin und Rutin

2 Ergebnisse:

2.1 Vergleich der antioxidativen Potentiale mittels TEAC-Assay:

Im ersten Versuch sollte das antioxidative Potential der Testsubstanzen Quercetin, Kaempferol, Rutin und Fisetin bestimmt werden. Dies sollte in der Folge die Beurteilung von Zusammenhängen von Effektstärken und antioxidativen Kapazitäten erlauben.

Zur Messung diente der Trolox-equivalent-antioxidative-capacity-Assay (TEAC-Assay). Der Test nutzt das stabile Radikal 2,2'-azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). Die ABTS-Lösung ist blau und entfärbt sich, wenn die Radikale mit den Antioxidantien reagieren. Die Färbung wurde photometrisch vor und drei Minuten nach Zugabe der Testsubstanz bestimmt. Die Differenz ist proportional zur antioxidativen Kapazität der Testsubstanz. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test. Als Vergleichsgröße diente das synthetische Vitamin-E-Derivat Trolox.

Es ließ sich nachweisen, dass alle verwendeten Flavonoide, Quercetin, Kaempferol, Rutin und Fisetin in der Lage waren, die ABTS-Lösung zu entfärben.

Der entfärbende Effekt von Quercetin und Fisetin war deutlich größer als bei Trolox. Quercetin und Fisetin erreichten bei mittleren Konzentrationen ca. das Doppelte des Trolox-Effektes. Der Effekt war bei Kaempferol und Rutin von ähnlichem Ausmaß wie bei Trolox.

In Dosierungen von 25 µM/ml waren nahezu alle Substanzen in der Lage, die ABTS-Lösung während der beobachteten Reaktionszeit gänzlich zu entfärben. Ein Vergleich war in dieser und in höherer Konzentration folglich ohne weitere Aussagekraft.

Anhand der in Tabelle 1 dargestellten Messwerte lässt sich eine Rangfolge des antioxidativen Potentials der Flavonoide und des Trolox ablesen (Fisetin > Quercetin >> Trolox ≥ Rutin ≥ Kaempferol). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Substanzen im Zellfreien Medium vergleichbar oder sogar stärker antioxidativ wirken können als das Vitamin-E-Derivat Trolox.

Die Mittelwerte der Absorptionen sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen. Sie sind in der Tabelle 1 für alle Konzentrationen (2,5; 5; 10; 15 und 25 µM/ml) aufgeführt und in der Abbildung 6 grafisch dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte für die Konzentration von 10 µM/ml mittels t-Test.

Antioxidatives Potential der Flavonoide im TEAC-Assay

Substanz (n)	Abnahme der Absorbtion bei 734 nm [OD _{T=0min} -OD _{T=3min}]; MW ± S.A.				
	Konzentration				
	2,5 µM/ml	5 µM/ml	10 µM/ml	15 µM/ml	25 µM/ml
Trolox (4)	0,06±0,02	0,14±0,01	0,30±0,01	0,47±0,02	0,69±0,003
Quercetin (3)	0,22±0,04	0,36±0,03	0,56±0,06**	0,67±0,02	0,68±0,01
Kaempferol (3)	0,04±0,03	0,13±0,08	0,26±0,02*	0,49±0,10	0,67±0,01
Rutin (3)	0,05±0,00	0,13±0,01	0,28±0,03	0,42±0,05	0,65±0,03
Fisetin (3)	0,23±0,03	0,42±0,05	0,63±0,04**	0,69±0,03	0,70±0,01

Tab. 1: MW, arithmetischer Mittelwert; S.A. Standard Abweichung; n, Stichprobenumfang; *, statistische Signifikanz P<0,05, ** statistische Signifikanz P<0,001.

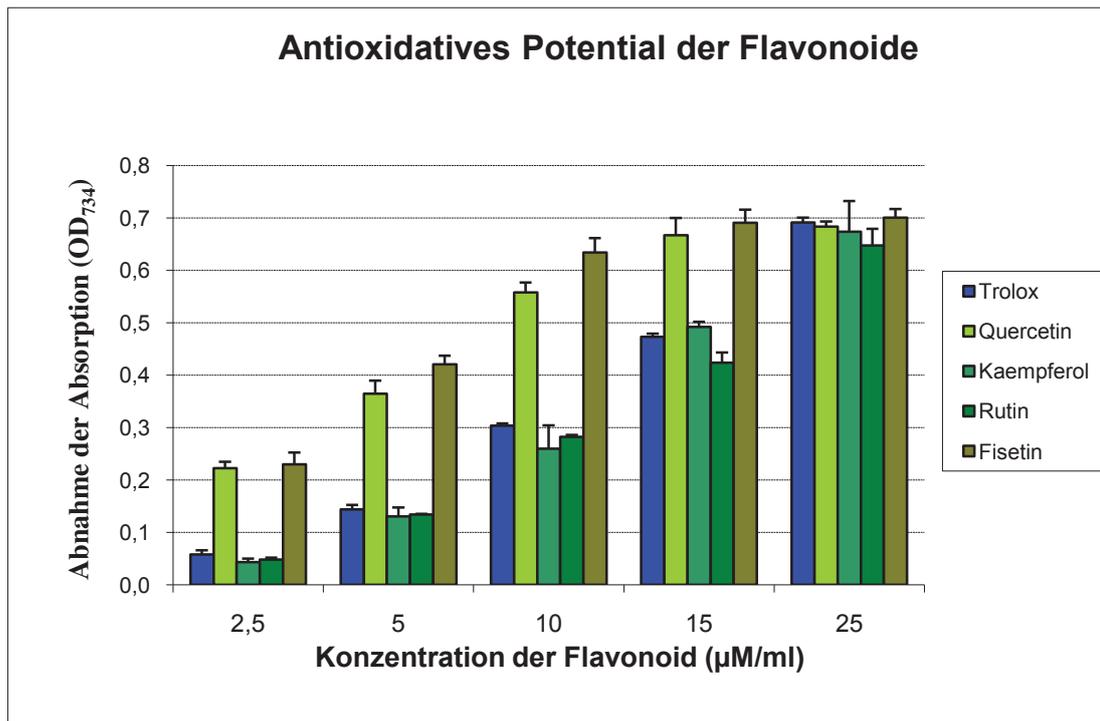


Abb. 6: Das antioxidative Potential der Flavonoide: Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

2.2.1 Einfluss der Flavonoide auf oxidativen Stress durch H₂O₂:

In der Folge sollte untersucht werden, ob Quercetin, Kaempferol, Rutin und Fisetin im lebenden Organismus eine schützende Funktion gegen oxidativen Stress entfalten. Dafür werden Würmer der Gattung *C. elegans* zunächst extrazellulärem oxidativem Stress ausgesetzt. Als Stressor diente H₂O₂.

Zur Messung der Schädigung diente die Fluoreszenzphotometrie in Kombination mit der Substanz Sytox Green. Sytox Green reagiert mit DNS-Bestandteilen, ist jedoch nicht membranpermeabel. Es erzeugt einen Fluoreszenzanstieg ausschließlich in Zellen mit geschädigten Membranen und dadurch erhöhter Permeabilität (Gill *et al.*, 2003).

Für die Untersuchung wurden 3 Tage alte semisynchronisierte Nematoden für 24 Stunden in Nährlösungen mit Quercetin, Kaempferol, Rutin oder Fisetin inkubiert. Die Würmer der Kontrollgruppe erhielten keine Flavonoidbehandlung. Anschließend wurden die Tiere in Medium mit einer letalen Konzentration H₂O₂ überführt und die Fluoreszenz in kurzen Abständen photometrisch gemessen. Bei einem Fluoreszenzanstieg auf 150 % des Ausgangswertes wurde der Wurm als tot gewertet. Die statistische Analyse erfolgte mittels Log-Rank Test.

Gegen den durch H₂O₂ verursachten extrazellulären oxidativen Stress zeigte keine der Testsubstanzen einen deutlichen protektiven Effekt.

Die mit Quercetin und Rutin behandelten Würmer lebten im Mittel ca. 30 Minuten bzw. 10 % länger als die Tiere in der Kontrollgruppe, diese Tendenz zeigte jedoch keine statistische Signifikanz. Mit ca. 15 Minuten gilt Gleiches für Fisetin. Die Lebensspanne der mit Kaempferol behandelten Würmer war nahezu identisch mit dem Wert der Kontrollgruppe.

Die Inkubation mit Flavonoiden konnte die durch 20 mM/ml H₂O₂ verursachten Schäden nicht signifikant beeinflussen.

Die Werte sind in Tabelle 2 genauer aufgeführt und in den Abbildung 7 grafisch dargestellt.

In Vorversuchen zeigte sich, dass für einen deutlich messbaren Anstieg der Fluoreszenz durch Sytox Green ein ausreichendes Maß an Schäden verursacht werden muss. Somit waren einer Verminderung der H₂O₂-Konzentration in diesem System enge Grenzen gesetzt.

Einfluß von Flavonoiden auf die Toxizität von 20mM/ml H₂O₂

Behandlung	Lebensspanne [min]				n (zensiert)	P vs. Kontrolle Logrank-Test
	MW	S.A.	Median	S.A.		
Kontrolle	337,6	15,0	300	10,0	77(5)	
Quercetin	363,7	16,1	330	16,4	77(2)	0,4045
Kaempferol	335,1	14,9	300	11,0	77(3)	0,9223
Rutin	363,9	14,6	330	13,1	77(4)	0,2308
Fisetin	351,9	14,2	315	8,2	77(3)	0,5166

Tab. 2: MW, arithmetischer Mittelwert der Lebenserwartung in Minuten; S.A. Standard Abweichung; Median, mediane Lebenserwartung in Minuten; n, Stichprobenumfang aus 6 unabhängigen Versuchen; zensiert, Versuchstiere, die aufgrund von Messfehlern nicht gewertet wurden; P-Werte im einseitigen Logrank-Test Versuchsgruppe gegen Kontrolle.

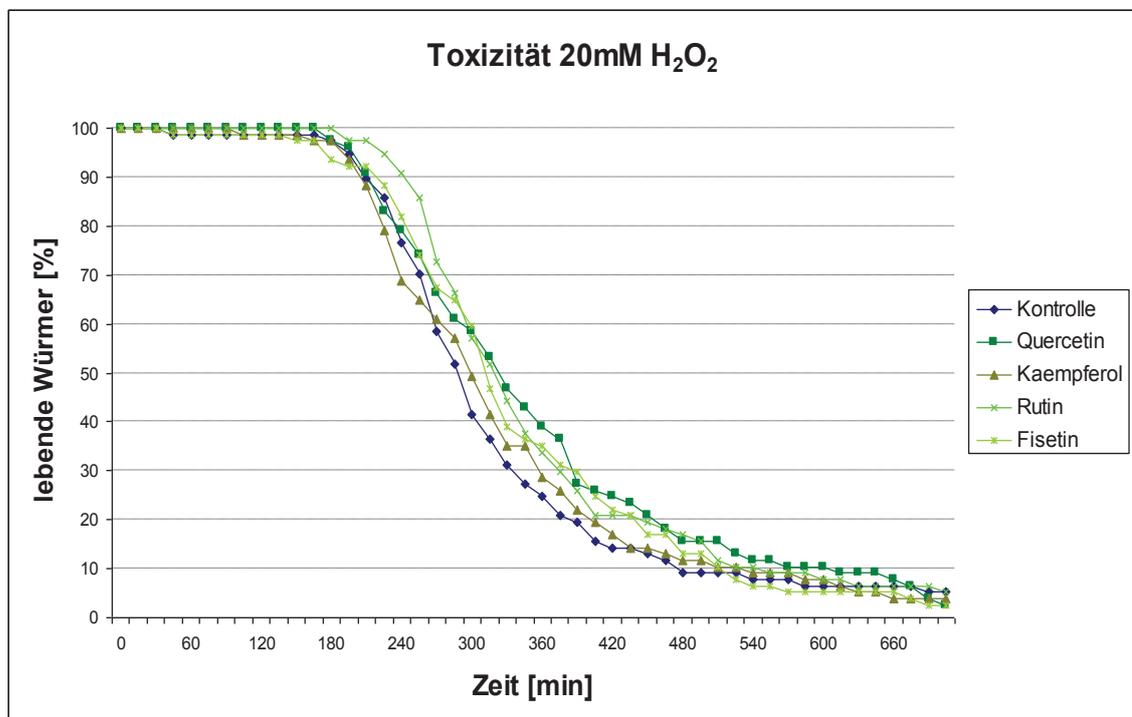


Abb. 7: Der Effekt der Flavonoide auf oxidativen Stress durch H₂O₂

2.2.2 Einfluss der Flavonoide auf oxidativen Stress durch Juglone:

Um den Einfluss der Flavonoide Quercetin, Kaempferol, Rutin und Fisetin auf intrazellulären oxidativen Stress zu untersuchen, wurde die Substanz Juglone verwendet. Juglone erzeugt in Interaktion mit dem intrazellulären Stoffwechsel Sauerstoffradikale (de Castro *et al.*, 2004).

Die semisynchronisierten Würmer vom *C. elegans* Stamm N2 wurden 72 Stunden in flavonoidhaltiger Flüssigkultur aufgezogen, dann in Flüssigmedien ohne Flavonoid, aber mit Stressor in verschiedene Konzentrationen umgesetzt und parallel beobachtet. Die statistische Auswertung erfolgt mittels Log-Rank-Test und Hazard-ratio. Die Hazard-ratio gibt die Todeswahrscheinlichkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe an.

Bei einer Konzentration von 150 $\mu\text{M/ml}$ Juglone überlebten 58,3 % der Kontrollgruppe die ersten 6 Stunden. Die Würmer der Behandlungsgruppen Quercetin, Kaempferol und Rutin zeigten nach 6 Stunden eine deutliche höhere Überlebensrate von ca. 13 bis 16 %. Diese war im Log-Rank Test und in der Hazard-ratio signifikant.

Die Behandlung mit Fisetin bedeutete bei dieser Konzentration keinen Überlebensvorteil. Nach 6 Stunden lebten aus dieser Behandlungsgruppe 3,7 % weniger Tiere als in der Kontrollgruppe. Diese negative Tendenz war statistisch nicht signifikant.

Die Werte sind in Tabelle 3 detailliert aufgeführt und in den Abbildung 8 grafisch dargestellt.

Bei einer Konzentration von 200 μM Juglone überlebten 14,4 % der Kontrollgruppe die ersten 6 Stunden. Die mittlere Überlebenszeit lag bei 6,72 Stunden. Die Behandlungsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Die Würmer der Behandlungsgruppen Quercetin und Kaempferol zeigten tendenziell eine leichte Lebensverlängerung. Bei Rutin war die Überlebensrate etwas geringer als in der Kontrollgruppe. Aus der Gruppe der mit Fisetin behandelten Nematoden überlebten mit 8,8 % der geringste Prozentsatz der Versuchstieren.

Die Zahlen sind in Tabelle 4 im Detail aufgeführt.

Bei einer Konzentration von 250 $\mu\text{M/ml}$ Juglone betrug die mittlere Überlebenszeit in der Kontrollgruppe 2,5 Stunden. Nach 6 Stunden waren alle Würmer verstorben. Die statistische Analyse ergab für keine der Behandlungsgruppen eine signifikante Verlängerung der Lebensspanne.

Bei Konzentrationen unterhalb von 100 $\mu\text{M/ml}$ Juglone und weniger verstarben nur vereinzelte Tiere im Rahmen des Untersuchungszeitraumes.

Aufgrund der geringen Unterschiede in diesen Konzentrationen sind die exakten Zahlen für die Interpretation der Ergebnisse nicht erforderlich und daher nicht angegeben.

Es zeigt sich im Überblick, dass Flavonoide besonders bei einer Konzentration von 150 $\mu\text{M/ml}$ einen messbaren Effekt erzeugen. Bei der Effektstärke ergibt sich eine Rangfolge bei der Quercetin und Rutin einen vergleichbaren Effekt zeigten, der leicht über dem des Kaempferols lag. Fisetin zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Lebensspanne. Die Rangfolge der Wirkstärken korreliert in diesem Versuch nicht linear mit dem antioxidativen Potential der Substanzen.

Die Überlebensspanne der mit Fisetin behandelten Nematoden unter Jugloneinkubation scheint tendenziell eher herabgesetzt als erhöht, diese Tendenz ist nicht signifikant.

Einfluss von Flavonoide auf die Toxizität von 150 µM/ml Juglone

Behandlung	Lebensspanne [h]		Überleben nach 6 h [%]	n	P vs. Kontrolle Logrank-Test	Hazard-ratio (95 % c.i)
	MW; S.E.	SEM				
Kontrolle	15,8±9,8	0,7	58,3	218		
Quercetin	18,9±8,8	0,6	74,2	221	0,00039**	0,57 (0,41-0,79)*
Kaempferol	18,4±8,9	0,6	71,7	205	0,0021*	0,82 (0,45-0,86)*
Rutin	18,8±8,7	0,6	73,1	223	0,00041**	0,58 (0,42-0,80)*
Fisetin	15,2±9,7	0,7	54,6	218	0,29	1,09 (0,82-1,44)

Tab. 3: MW, arithmetischer Mittelwert der Lebenserwartung in Stunden; S.A. Standard Abweichung; SEM, (standard error of the mean) Standardfehler des Mittelwertes; Median, mediane Lebenserwartung in Stunden; n, Stichprobenumfang; *, statistische Signifikanz, $P < 0,05$ im einseitigen Logrank-Test Versuchsgruppe gegen Kontrolle bzw. Hazard-Ratio mit 95 % Konfidenzintervall (95%c.i) < 1 ; ** statistische Signifikanz $P < 0,001$, jeweils Versuchsgruppe gegen Kontrolle.

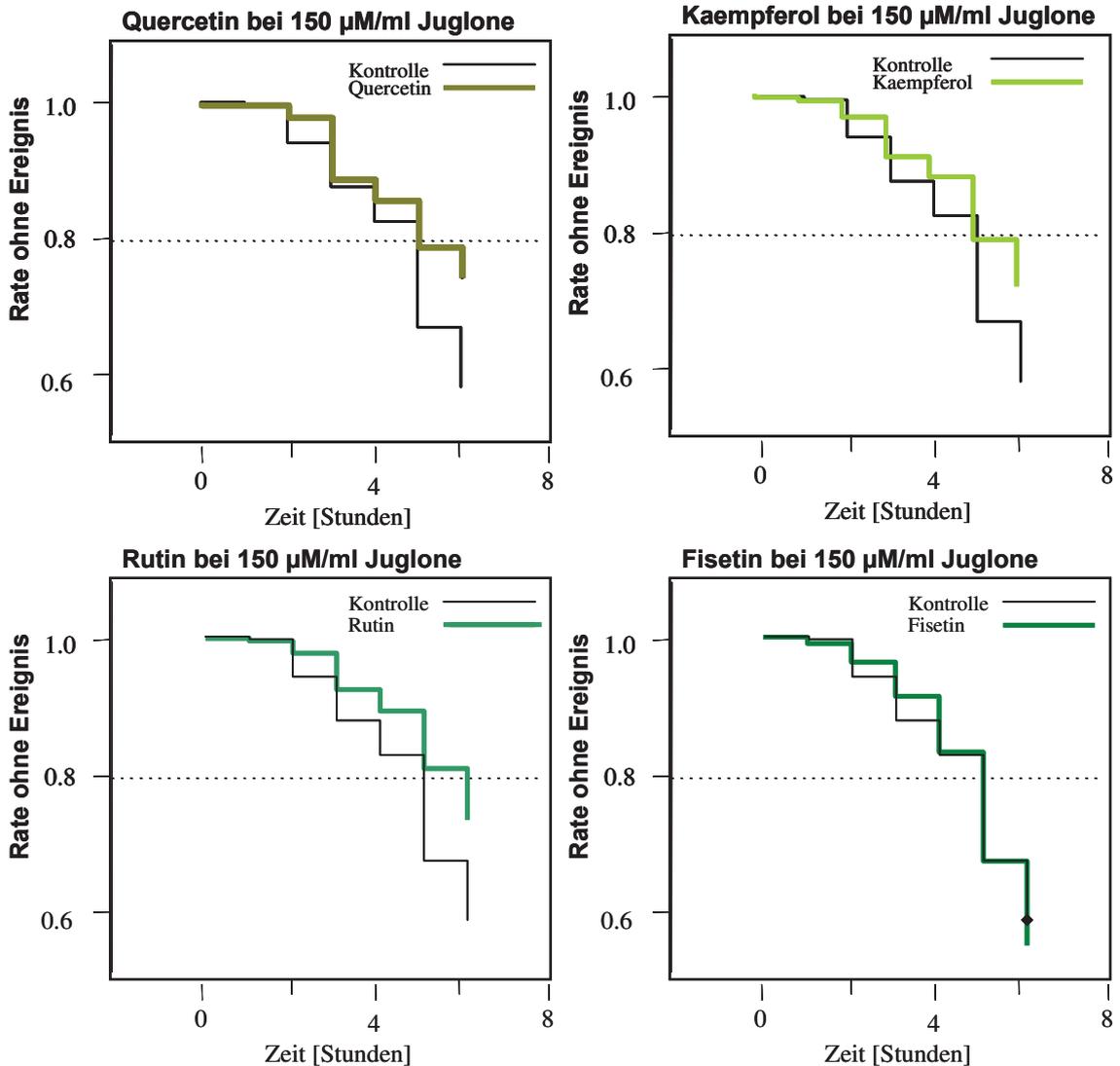


Abb. 8: Effekt der Flavonoide auf intrazellulären oxidativen Stress durch 150 µM/ml Juglone

Einfluss von Flavonoiden auf die Toxizität von 200 µM/ml Juglone

Behandlung	Lebensspanne [h]		Überleben nach 6 h [%]	n	P vs. Kontrolle Logrank-Test	Hazard-ratio (95% c.i)
	MW; S.E.	SEM				
Kontrolle	6,7±7,8	0,7	14,4	139		
Quercetin	8,0±8,4	0,7	20,9	139	0,02	0,77(0,59-1,009)
Kaempferol	7,9±8,5	0,7	21,1	133	0,066	0,82(0,63-1,07)
Rutin	5,7±6,8	0,6	11,6	147	0,21	1,11(0,86-1,43)
Fisetin	5,3±6,1	0,5	8,8	147	0,16	1,14(0,89-1,47)

Tab. 4: MW, arithmetischer Mittelwert der Lebenserwartung in Stunden; S.A. Standardabweichung; SEM, (standard error of the mean) Standardfehler des Mittelwertes; Median, mediane Lebenserwartung in Stunden; n, Stichprobenumfang; *, statistische Signifikanz, $P < 0,05$ im einseitigen Logrank-Test Versuchsgruppe gegen Kontrolle bzw. Hazard-Ratio mit 95 % Konfidenzintervall (95% c.i) < 1 ;

2.3 Einfluss der Flavonoide auf die Lebensspanne von *C. elegans*:

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass alle verwendeten Flavonoide ein antioxidatives Potential besitzen. Zudem besaßen die Nematoden vom *C. elegans* Stamm N2 nach der Behandlung mit Quercetin, Kaempferol und Rutin eine erhöhte Lebensspanne unter moderaten intrazellulären oxidativen Stress.

Im nächsten Versuch sollte untersucht werden, ob die Substanzen auch unter standardisierten Bedingungen ohne Stressor Einfluss auf die Lebenserwartung des Modellorganismus haben.

Für die Untersuchung der Einflüsse von Flavonoiden auf die Lebensspanne wurden adulte *C. elegans* vom Wildtypstamm N 2 verwendet. Diese sind nicht mehr in der Lage, in das Dauerstadium zu wechseln.

Die Tiere wurden auf Festmedium herangezogen und anschließend in Flüssigkulturen mit Flavonoiden überführt. Die statistische Analyse erfolgte per einseitigem Log-Rank-Test und Hazard-ratio im Vergleich zu einer nur mit dem Lösemittel der Flavonoide behandelten Kontrollgruppe.

Die Tiere der Kontrollgruppe lebten im Mittel 21,08 Tage. Bei den Würmern der Behandlungsgruppen Kaempferol und Rutin zeigten die Flavonoide keinen Einfluss auf ihre Lebensspannen. Die mittleren Lebensspannen sowie der Verlauf der Überlebenskurven in beiden Behandlungsgruppen entsprachen in Dauer und Verlauf nahezu der Kontrollgruppe.

Die Fisetin Gruppe zeigte eine ca. 1 Tag kürzere mittlere Lebensspanne als die Kontrollgruppe. Der Median war mit 16 Tagen deutlich niedriger. Bemerkenswert ist der Kurvenverlauf. Ab dem 12. Tag des Experiments fällt diese bei der Fisetinbehandlungsgruppe deutlich rascher ab als bei der Kontrollgruppe. Dieser Trend kehrt sich jedoch in der späten Phase um, so dass sich die Kurven von Fisetinbehandlung und Kontrolle am 28. Tag kreuzen.

Die Behandlung mit Kaempferol, Rutin und Fisetin zeigte in der statistischen Analyse der mittleren Lebensdauer keinen signifikanten Einfluss auf die Lebensspanne der Versuchstiere.

Die mit Quercetin behandelten Würmer lebten im Mittel 24,3 Tage. Dies entspricht einer Steigerung der mittleren Lebensspanne im Vergleich zur Kontrollgruppe von ca. 15 %. Nach initial parallelem Kurvenverlauf zur Kontrollgruppe verstarben ab dem 11. Tag weniger Tiere als in der Behandlungsgruppe.

Entsprechend verlief die Quercetin-Kurve oberhalb der Kurve der Kontrolle und näherte sich dieser erst gegen Ende des Experiments wieder an.

Die Zahlen sind in Tabelle 6 zusammengefasst und in Abbildung 9 grafisch dargestellt.

Einfluß der Flavonoide auf die Lebensspanne von *C. elegans*

Behandlung	Lebensspanne [Tage]			P vs. Kontrolle Logrank-Test	Hazard-Ratio (95 % c.i.)
	MW; S.A.	Median; S.A.	n (zensiert)		
Kontrolle	21,08; 0,82	21; 1,00	121 (4)		
Quercetin	24,30; 1,01	25; 2,12	120 (11)	0,0012*	0,66 (0,51-0,86)*
Kaempferol	21,25; 0,97	22; 3,13	120 (15)	0,26	0,92 (0,70-1,19)
Rutin	22,30; 0,82	22; 1,19	121 (9)	0,22	0,91 (0,70-1,18)
Fisetin	19,93; 0,98	16; 0,88	120 (5)	0,38	0,95 (0,73-1,14)

Tab. 6: MW, arithmetischer Mittelwert der Lebenserwartung in Tagen; S.A. Standardabweichung; Median, mediane Lebenserwartung in Tagen; n, Stichprobenumfang; zensiert, Versuchstiere, die während des Versuchs verloren gingen; *, statistische Signifikanz, $P < 0,05$ im einseitigen Logrank-Test Versuchsgruppe gegen Kontrolle bzw. Hazard-Ratio mit 95 % Konfidenzintervall (95 % c.i.) < 1 ;

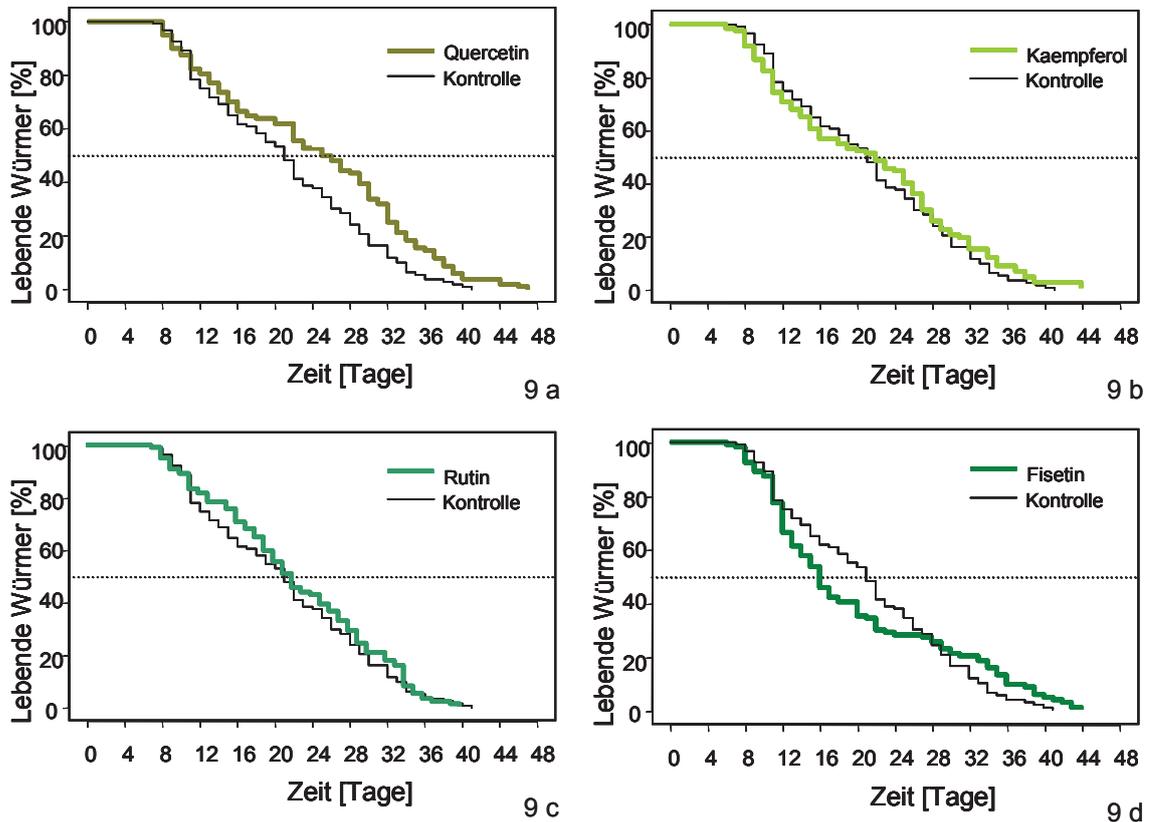


Abb. 9 a-d: Einfluss der Flavonoide auf die Lebensspanne von *C. elegans*

2.4.1 Einfluss von Stressoren auf die DAF-16 Lokalisation in TJ 356:

Es konnte gezeigt werden, dass die Flavonoide einen positiven Einfluss auf die Stressresistenz von *C. elegans* ausüben und Quercetin die mittlere Lebensdauer unter stressfreien Kulturbedingungen verlängert. An dieser Stelle stellte sich die Frage, ob diese Effekte auf die Beeinflussung von intrazellulären Signalwegen zurückzuführen sind.

DAF-16 ist ein zentraler Faktor in der Insulin/Insulin-like-Growthfaktor-Signalkaskade. Diese besitzt in *C. elegans* erwiesenermaßen große Bedeutung für die Regulation von Stressresistenz und Lebensspanne, also jene Faktoren, die von den Flavonoiden beeinflusst wurden.

Daher sollte untersucht werden, ob Flavonoide einen Einfluss auf die Lokalisation des Forkheadtranskriptionsfaktors DAF-16 haben.

Die folgenden Experimente nutzten den *C. elegans* Stamm TJ 356. Dieser Stamm produziert infolge von Genmanipulation ein DAF-16::GFP-Fusionsprotein. Die Lokalisation von DAF-16 kann in lebenden Würmern leicht im UV-Mikroskop bestimmt werden (Henderson & Johnson, 2001).

Zunächst wurde untersucht, wie sich thermaler und oxidativer Stress auf die subzelluläre Lokalisation des DAF-16::GFP-Fusionsprotein im TJ 356 Stamm auswirken. Die Versuchsgruppen wurden für 2 Stunden bei 37 °C bebrütet oder für 1 Stunde mit 150 µM/ml Juglone inkubiert. Als Referenz wurde eine unbehandelte Kontrollgruppe untersucht.

Die DAF-16-Lokalisation wurde anschließend im Fluoreszenzmikroskop bestimmt und die Würmer entsprechend des Verteilungsmusters den Kategorien „zytosolisch“, „intermediär“ und „nukleär“ zugeordnet (siehe Abbildung 10 und 14a-c im Methodenteil).

In der Kontrollgruppe zeigten mit 88 % die überwiegende Anzahl der Würmer eine zytosolische Lokalisation und deutlich geringere Anteile zeigten eine intermediäre oder nukleäre Lokalisation.

In den Behandlungsgruppen zeigten alle Würmer eine nukleäre Lokalisation von DAF-16, unabhängig davon, ob sie thermalem oder oxidativem Stress ausgesetzt wurden. Die Mutante TJ 356 reagierte auf beide Stressoren mit einer Translokation von DAF-16 aus dem Zytosol in den Kern. Das Ausmaß der Verschiebung ist statistisch hoch signifikant.

Die statistische Analyse erfolgt mittels Chi²- Homogenitätstest, der untersucht, ob zwei oder mehr Stichproben einer homogenen Grundgesamtheit entstammen können. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen und in Tabelle 6 aufgeführt.

DAF-16 Lokalisation in TJ 356 nach oxidativem und thermalen Stress

Behandlung	Lokalisation [%] (absolute Zahlen)			n	P vs. Kontrolle Chi ² -Test
	zytosolisch	intermediär	nukleär		
Kontrolle	88% (283)	4% (12)	8% (28)	323	
Hitze (37°C)	0	0	100% (298)	298	0**
Juglone (150µM)	0	0	100% (378)	378	0**

Tab. 6: n, Stichprobenumfang; *, statistische Signifikanz P<0,05, **, statistische Signifikanz P<0,001, (0 entspricht einem P<1e-09) jeweils im Chi²-Homogenitätstest Versuchsgruppe gegen Kontrolle.

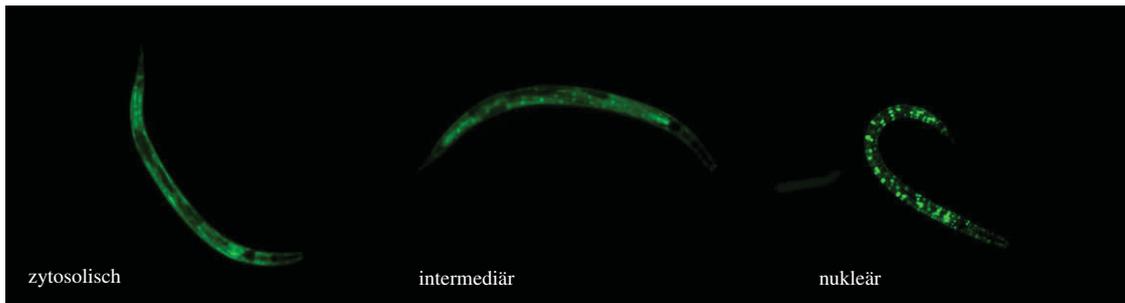


Abb. 10: TJ 356 mit DAF-16 in verschiedenen Lokalisationen: UV-Lichtmikroskopbild in Originalfarben.

2.4.2 Einfluss der Flavonoide auf die DAF-16 Lokalisation in TJ 356:

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie sich die Flavonoide auf die Lokalisation von DAF-16 auswirken.

Die Würmer wurden in Flüssigkultur aufgezogen, welche die Flavonoiden Quercetin, Kaempferol, Rutin oder Fisetin enthielten. Die Lokalisation wurde im UV-Mikroskop untersucht. Als Kontrolle dienten TJ 356 Würmer, deren Medium ausschließlich das Lösungsmittel DMSO zugesetzt wurde.

In der Kontrollgruppe lag DAF-16 bei 81 % der Würmer überwiegend im Zytosol vor und nur bei 14 % im Nucleus. Bei allen Behandlungsgruppen kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Verschiebung der Verhältnisse der DAF-16-Lokalisation vom Zytosol zum Nucleus.

Den stärksten Effekt zeigten die Nematoden nach Behandlung mit Quercetin. Der Anteil der als nukleär bewerteten Nematoden war in dieser Gruppe mit 38 % mehr als verdoppelt. Bei Kaempferol und Fisetin kam es zur gleichsinnigen Entwicklung. Der Effekt war bei beiden Substanzen ungefähr gleich stark, aber mit 26 bzw. 28 % geringer ausgeprägt, als bei Quercetin. Bei Rutin war der Effekt am geringsten, jedoch zeigte sich mit 20 % immer noch eine deutliche Erhöhung der als nukleär gewerteten Versuchstiere. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war diese Verschiebung bei allen Substanzen statistisch signifikant. Die Analyse erfolgte mittels Chi²-Homogenitätstest. Die Daten sind Mittelwerte aus 8 unabhängigen Versuchen, in Tabelle 7 aufgeführt und in Abbildung 11 grafisch dargestellt.

Der Versuch zeigte, dass alle Flavonoidbehandlungen in *C. elegans* Nematoden vom Stamm TJ 356 zu einer signifikant vermehrten Translokation von DAF-16 aus dem Zytosol in den Kern führten.

DAF-16 Lokalisation in TJ 356 nach Flavonoidbehandlung

Behandlung	Lokalisation [%] (absolute Zahlen)			n	P vs. Kontrolle
	zytosolisch	intermediär	nukleär		Chi ² -Test
Kontrolle	81% (399)	5% (26)	14% (68)	493	
Quercetin	54% (247)	8% (39)	38% (172)	458	0**
Kaempferol	64% (295)	10% (47)	26% (122)	464	1,42e-08**
Rutin	72% (343)	8% (39)	20% (95)	477	0,004*
Fisetin	64% (306)	8% (40)	28% (132)	478	1,96e-08**

Tab. 7: n, Stichprobenumfang; *, statistische Signifikanz $P < 0,05$; ** statistische Signifikanz $P < 0,001$, (0 entspricht einem $P < 1e-09$) jeweils im Chi²-Homogenitätstest Versuchsgruppe gegen Kontrolle.

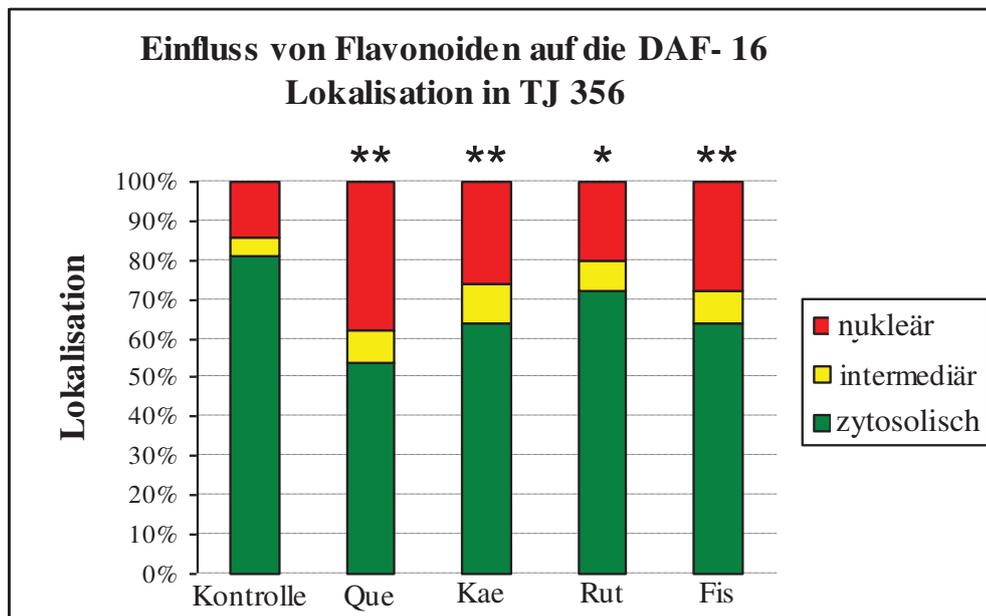


Abb. 11: Der Einfluß der Flavonoide auf die DAF-16-Lokalisation im *C. elegans* Stamm TJ 356: Que, Quercetin; Kae, Kaempferol; Rut, Rutin; Fis, Fisetin; *, statistische Signifikanz $P < 0,05$, **, statistische Signifikanz $P < 0,001$, jeweils im Chi²- Homogenitätstest Versuchsgruppe gegen Kontrolle.

2.5.1 Einfluss von Stressoren auf die SOD-3 Induktion in CF 1553:

Die Experimente zur DAF-16 Lokalisation in TJ 356 zeigten, dass oxidativer Stress, thermaler Stress und eine Behandlung mit Flavonoiden eine Verschiebung des Transkriptionsfaktors in den Kern verursachen. Darauf aufbauend sollte untersucht werden, ob dies auch zu einer Beeinflussung von DAF-16-Zielgenen führt. Ein bekanntes DAF-16-Zielgen ist die mitochondriale Superoxiddismutase-3 (SOD-3) (Kenyon, 2005, OH *et al.*, 2005 a;). Sie ist im Stoffwechsel von *C. elegans* für den Abbau reaktiver Sauerstoffspezies mitverantwortlich. Im Folgenden wurde zunächst untersucht, wie sich die Stressoren auf die SOD-3-Expression auswirken, um in einem zweiten Schritt einen Vergleich mit der Wirkung der Flavonidbehandlung zu ermöglichen.

Für dieses Experiment wurde der transgene *C. elegans* Stamm CF 1553 verwendet. Er exprimiert ein fluoreszierendes SOD::GFP-Fusionsprotein. Durch die quantitative Auswertung der Fluoreszenz lässt sich das Ausmaß der Enzymproduktion messen.

Für den Versuch wurden semisynchronisierte Nematoden vom Stamm CF 1553 einer Temperatur von 37 °C bzw. einer Konzentration von 150 µM/ml Juglone ausgesetzt. Als Referenz diente eine unbehandelte Kontrollgruppe. Die Messung fand am lebenden Wurm statt.

Die Kontrollgruppe erreichte einen Mittelwert der Fluoreszenz von 293,34 (od-Bkg)/mm². Sowohl thermaler als auch oxidativer Stress führten zu einer signifikanten Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Bei 37 °C stieg der Wert um 17 % an. Unter der Behandlung mit 150 µM/ml Juglone stieg der Wert um 8 %. Beide Erhöhungen sind im t-Test Versuchsgruppe gegen Kontrolle statistisch signifikant.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 7 unabhängigen Versuchen. Die genauen Zahlen sind in Tabelle 8 aufgeführt und in Abbildung 12 grafisch dargestellt.

SOD-3 Expression in CF-1553 nach oxidativen und thermalen Stress

Behandlung	Fluoreszenz [(od-Bkg)/mm ²]			n	P vs. Kontrolle t-Test
	MW	S.A.	SEM		
Kontrolle	293,3	75,4	5,7	176	
Hitze	343,4	102,5	9,7	109	3,128e-06**
Juglone	316,9	98	9,4	111	0,023*

Tab. 8: Fluoreszenz [(od-Bkg)/mm²]; od, Fluoreszenz des Nematoden; (Bkg), Hintergrundfluoreszenz; [mm²] Messfläche; MW, arithmetischer Mittelwert der Fluoreszenz; S.A. Standard Abweichung; SEM, standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes); n, Stichprobenumfang; *, statistische Signifikanz P<0,05, ** statistische Signifikanz P<0,001, jeweils im t- Test Versuchsgruppe gegen Kontrolle.

2.5.2 Einfluss der Flavonoide auf die SOD-3 Induktion in CF 1553:

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, wie sich die Flavonoide auf die SOD-3-Expression auswirken.

Um die Wirkung der Flavonoide auf die SOD-3-Expression zu untersuchen, wurden die Versuchstiere in flavonoidhaltiger Flüssigkultur aufgezogen. Als Referenz diente eine mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Kontrollgruppe. Die Fluoreszenz des SOD::GFP-Fusionsprotein wurde am lebenden Wurm gemessen.

Bei der Kontrollgruppe wurde eine Fluoreszenzintensität von 293,34 (od-Bkg)/mm² gemessen. Alle Behandlungsgruppen zeigten eine im Vergleich zur Kontrollgruppe niedrigere Fluoreszenz. Das Ausmaß der Abnahme war bei den Behandlungsgruppen Quercetin, Rutin und Fisetin nahezu identisch. Nach der Behandlung mit Quercetin betrug die mittlere Fluoreszenz 85 %, bei Rutinbehandlung 87 % und nach Fisetinbehandlung 86 % der Kontrollgruppe. Die Behandlung mit Kaempferol führte zu der geringsten Abnahme mit einer mittleren Fluoreszenz von 94 % der Kontrollgruppe.

Alle Ergebnisse sind im t-Test Versuchsgruppe gegen Kontrolle statistisch signifikant. Die Zahlen finden sich in Tabelle 9 und sind in Abbildung 12 grafisch dargestellt.

Einfluss der Flavonoide auf die SOD-3 Expression in CF-1553

Behandlung	Fluoreszenz [(od-Bkg)/mm ²]			n	P vs. Kontrolle t-Test
	MW	S.A.	SEM		
Kontrolle	293,3	75,4	5,7	176	
Quercetin	249,85	73,1	5,6	170	1,011e-07**
Kaempferol	275,87	78,2	6,1	166	0,036*
Rutin	254,75	72,3	5,7	174	4,005e-06**
Fisetin	252,42	72,5	5,4	179	3.178e-07**

Tab. 9.: Fluoreszenz [(od-Bkg)/mm²]; od, Fluoreszenz des Nematoden; (Bkg), Hintergrundfluoreszenz; [mm²] Messfläche; MW, arithmetischer Mittelwert der Fluoreszenz; S.A. Standard Abweichung; SEM, standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes); n, Stichprobenumfang; *, statistische Signifikanz P<0,05, ** statistische Signifikanz P<0,001, jeweils im t-Test Versuchsgruppe gegen Kontrolle; ** P<0,001.

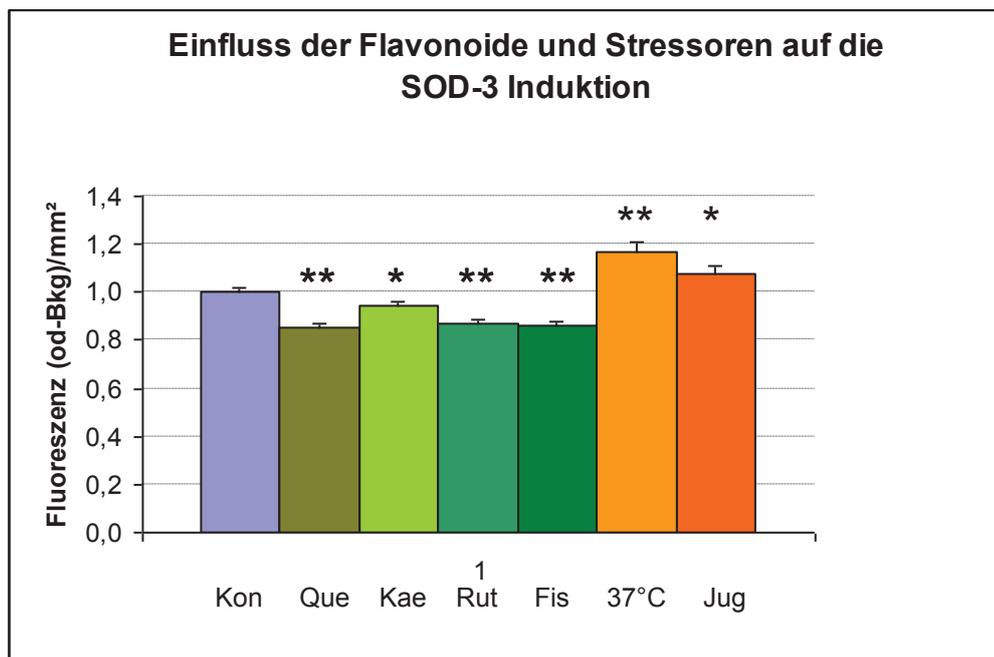


Abb. 12: Der Einfluß von Flavonoiden und Stressoren auf die SOD-3. Kon, Kontrolle; Que, Quercetin; Kae, Kaempferol; Rut, Rutin; Fis, Fisetin; Jug, Juglone, Fehlerindikatoren entsprechen den SEM (standard error of the mean); Fluoreszenz [(od-Bkg)/mm²]; od, Fluoreszenz des Nematoden; (Bkg), Hintergrundfluoreszenz; [mm²] Messfläche; *, statistische Signifikanz P<0,05, ** statistische Signifikanz P<0,001, jeweils im t-Test Versuchsgruppe gegen Kontrolle.

2.6 Übersicht der Ergebnisse:

Zur übersichtlichen Veranschaulichung der Wirkungen der Flavonoide wurden die Ergebnisse der einzelnen Experimente in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Interpretation der Ergebnisse folgt im Diskussionsteil.

TEAC-Assay: radikalfangende Kapazität	Fisetin > Quercetin >> (Trolox \geq) Rutin \geq Kaempferol
Stress-Resistenz gegen 150 $\mu\text{M/ml}$ Juglone:	Quercetin* \geq Rutin* $>$ Kaempferol* $>>$ Kontrolle \geq Fisetin
Stress-Resistenz gegen 20 mM/ml H_2O_2 :	Kein statistisch signifikanter Effekt (Rutin \geq Quercetin > Fisetin > Kaempferol = Kontrolle)
Lebensspanne:	Quercetin* $>>$ Rutin > Kaempferol \geq Kontrolle \geq Fisetin
DAF-16 Lokalisation: Translokation in den Kern	Quercetin* $>$ Fisetin* \geq Kaempferol* $>$ Rutin* $>$ Kontrolle
SOD-3 Konzentration: Hemmung der Expression	Quercetin* $>$ Fisetin* \geq Rutin* $>$ Kaempferol* $>$ Kontrolle

Tab. 10: Effektstärkenangaben: > Größer als, >> deutlich größer als, \geq größer bis nahezu gleich, = gleich;
*: Statistisch signifikante Veränderung im Vergleich Behandelungs- mit Kontrollgruppe

3 Diskussion und Schlussfolgerung:

3.1 Diskussion:

Flavonoide sind als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe fester Bestandteil unserer täglichen Ernährung (Manach *et al.*, 2004). Flavonoide waren bereits vor dem Beginn dieser Arbeit als Antioxidantien bekannt. Der menschliche Körper ist nicht in der Lage, sie selbst herzustellen, deshalb gelten sie als exogene Antioxidantien. Sie kommen in relevanten Mengen insbesondere in Nahrungsmitteln wie Tees, Früchten, Obst, Gemüse, Säften und Wein vor, die allgemein als gesundheitsförderlich bewertet werden (Hollman & Katan, 1999, Song & Chun, 2008). Pflanzliche Medikamente wie zum Beispiel Ginkobiloba Extrakte oder Rezepturen der traditionellen chinesischen Medizin sind ebenfalls reich an Flavonoiden, die als ihre zentrale Wirkkomponente diskutiert werden (Chen *et al.*; 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Flavonoide auf ihre Wirkung in einem komplexen Organismus und auf zellulärer Ebene untersucht. Aus der heterogenen Gruppe mit über 8000 bekannten Substanzen wurden die vier Substanzen Quercetin, Kaempferol, Fisetin und Rutin ausgewählt, die alle in Verbreitung und Konzentration ein relevanter Bestandteil der menschlichen Ernährung sind.

Quercetin ist hiervon das in der größten Menge vorkommende Flavonoid und befindet sich unter anderem in Zwiebeln, Äpfeln, Brokkoli und grünen Bohnen (Watzl & Rechkemmer, 2001). Quercetin ist eine besonderes umfangreich untersuchte Substanz und auch als Nahrungsergänzungsmittel käuflich zu erwerben.

Kaempferol ist in roten Weintrauben, folglich auch in Rotwein, sowie Ginko und Grapefruit enthalten (Watzl & Rechkemmer, 2001).

Fisetin findet sich unter anderem in Erdbeeren, Tomaten und im namensgebendem Fisetinholz, das jedoch nicht essbar ist (Fiorani & Accorsi, 2005).

Diese drei Substanzen sind Flavonole mit der gleichen Grundstruktur aber unterschiedlicher Anzahl und Positionen der Ethanolgruppen. Die Verwandtheit sollte im Verlauf der Untersuchungen helfen, eventuelle gruppentypische Effekte der Flavonole aufzudecken.

Rutin entspricht in der Struktur einem glykolisiertem Quercetin, wie es in Äpfeln, Kirschen, schwarzem Tee und Paprika vorkommt (Atanassova & Bagdassarian, 2009). Es ist bereits bewiesen worden, dass Menschen Flavonoide in freier Form und als Glykoside aufnehmen können (Hollman & Katan, 1999).

Die radikalfangende Eigenschaft ist bei den verschiedenen Flavonoiden unterschiedlich stark ausgeprägt (Yu *et al.*, 2005). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die antioxidative Kapazität der Testsubstanzen Quercetin, Kaempferol, Rutin und Fisetin zunächst bestimmt und verglichen. Dafür wurde der zellfreie TEAC-Assay verwendet. Als Referenz diente hierbei das Vitamin-E-Derivat Trolox. Im TEAC-Assay entsprach das antioxidative Potential von Kaempferol und Rutin nahezu dem des Trolox. Quercetin war signifikant stärker und wurde von Fisetin noch übertroffen.

Betrachtet man isoliert die antioxidativen Eigenschaften, sollten die Flavonoide dem Vitamin E vergleichbare oder stärkere intrazelluläre Effekte bewirken können. Auf diesem Weg könnten sie unter anderem zellprotektiv wirken, ebenso wie Tocopherol (Vitamin E), Ascorbinsäure (Vitamin C) und Carotinoide (Provitamin A), welche bekannte exogene nichtenzymatische Schutzmechanismen gegen reaktive

Sauerstoffspezies im Menschen darstellen (Fusco *et al.*, 2007).

Beobachtungen in Zellkulturen belegen, dass Quercetin, Kaempferol, Rutin und Fisetin dosisabhängig in der Lage sind, in verschiedene Zellreihen ROS-induzierte Schäden zu vermindern (Hanneken *et al.*, 2006; Noroozi *et al.*, 1998; Wätjen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Dadurch alleine rechtfertigt sich jedoch kein medizinischer Einsatz. Weitere Arbeiten zeigen nämlich, dass Antioxidantien, wie auch Quercetin, konzentrationsabhängig in Zellkulturen prooxidativ und toxisch wirksam werden können (Crespo *et al.*, 2007; Robaszkiwicz *et al.*, 2007; Wätjen *et al.*, 2005).

Um zu überprüfen, welchen Einfluss eine Ernährung mit den Testsubstanzen auf einen komplexeren Organismus hat, wurden Nematoden des *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus gewählt. Seine verschiedenen Gewebe und interagierenden Organsysteme, sein Genom, das zwischen 60 und 80 % Homologe in komplexeren Säugetieren besitzt, und die leichte Kultivierbarkeit bei kurzer Lebensspanne siedelt *C. elegans* zwischen Zellkulturen und größeren Versuchstieren an (Astin *et al.*, 2004; Brenner, 2009; Lai *et al.*, 2000; Kaletta & Hengartner, 2006).

Zunächst wurde der Einfluss der flavonoidreichen Ernährung auf die Resistenz gegen reaktive Sauerstoffspezies untersucht. Nematoden des *C. elegans* Stamms N2 wurden in flavonoidhaltigem Flüssigmedium aufgezogen und anschließend einem letalen oxidativen Stress ausgesetzt. Eine Vorbehandlung mit Quercetin, Kaempferol und Rutin erhöhte die Resistenz der Versuchstiere gegen einen intrazellulären oxidativen Stress, der durch eine Inkubation mit 150 µM Juglone gebildet wurde. Es kam zu einer sichtbaren Verlängerung der Lebensspanne mit nur geringen Unterschieden in der Potenz der drei Substanzen. Die Vorbehandlung mit Fisetin führte zu keiner Lebensverlängerung.

Bei einer Konzentration von 200 µM und 250 µM Juglone zeigte keine Behandlungsgruppe eine längere Lebensspanne als die Kontrollgruppe. Ein messbarer protektiver Effekt war folglich auch von der Dosis der Noxe abhängig.

Unter extrazellulären oxidativen Stress durch 20 mM H₂O₂ zeigten die Substanzen keine signifikant verlängerte Lebenszeit. Wohl zeichnete sich teils eine positive Tendenz ab. Der mangelnde Effekt könnte, wie bei den Versuchen mit höheren Juglonekonzentrationen, in der Dosis begründet zu sein. Es läßt sich zudem vermuten, jedoch Anhand der Daten nicht beweisen, dass auch die extrazelluläre Lokalisation der Noxe im Medium den Flavonoideinfluss verringerte.

Insgesamt konnte belegt werden, dass die Ernährung mit Quercetin, Kaempferol und Rutin einen relevanten positiven Einfluss auf die Stressresistenz der Versuchstiere gegen intrazellulären oxidativen Stress hat. Dies geht konform mit den Hypothesen und Ergebnissen zahlreicher Autoren, die Flavonoide als zellprotektiv bewerten (Hanneken *et al.*, 2006; Noroozi *et al.*, 1998; Wätjen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Der Versuch belegt darüber hinaus, dass die flavonoidreiche Ernährung ihren positiven Einfluss auch in komplexeren Organismen besitzt.

Auffällig ist, dass die Nematoden, deren Nährmedium Fisetin enthielt, signifikant schlechter abschnitten als die übrigen Behandlungsgruppen. Obwohl Fisetin im zellfreien TEAC-Assay das höchste antioxidative Potential besitzt, führte es zu keiner Lebensverlängerung unter Stressbedingungen. Ob dies Folge unterschiedlicher Substanzeffekte oder einer geringeren effektiven Bioverfügbarkeit ist, lässt sich Anhand der bereits aufgeführten Versuche noch nicht beurteilen, soll jedoch im Verlauf näher betrachtet werden.

Quercetin, Kaempferol und Rutin zeigten einen protektiven Effekt gegenüber freien Sauerstoffradikalen. In Anbetracht dieser Erkenntnis wurde der Einfluss der Flavonoide auf die Lebensspanne der Modellorganismen unter stressfreien Kulturbedingungen getestet. Die kontinuierliche Behandlung der *C. elegans* Würmer mit Quercetin bewirkte eine Verlängerung der mittleren Lebensspanne. Diese betrug im Vergleich zur Kontrollgruppe ca. 3 Tage (ca. 15 %). Kaempferol, Rutin und Fisetin zeigten keine Lebensverlängerung.

Zusammenhängend betrachtet besitzt Quercetin eine stärkere antioxidative Kapazität als Trolox, Kaempferol und Rutin, einen protektiven Effekt gegen intrazellulären oxidativen Stress und eine Lebensverlängerung im stressfreien Medium. Somit drängt sich die Vermutung auf, dass das im Verhältnis stärkere antioxidative Potential und die Protektion gegen intrazelluläre Sauerstoffradikale hier eine kausale Rolle spielt, ohne dass alternative Wirkmechanismen ausgeschlossen wären.

Dieser Erklärungsansatz stützt sich auf Denham Harman's „Free radical Theory of aging“ (Harman, 1956). Dieser formulierte die Hypothese, dass die Kumulation der durch Sauerstoffradikale verursachten Schäden eine wichtige Komponente des Alterungsprozesses darstellt. Nach heutigem Stand der Wissenschaft wurde diese Theorie erweitert und ergänzt. Zahlreiche Autoren postulieren einen direkten Zusammenhang zwischen ROS, Alterungsprozessen und degenerativen Erkrankungen sowie die Hypothese, dass diese durch antioxidative Substanzen reduzierbar seien (Ahmed *et al.*, 2002; Dajas *et al.*, 2003; Harman, 2006; Knekt *et al.*, 2002; Loeb *et al.*, 2005; Mandel & Youdim, 2004; Santaneglo *et al.*, 2007; Speakman *et al.*, 2002; Spencer, 2008;). In *C. elegans* scheinen diese Beziehungen ebenfalls zu bestehen und viele langlebige *C. elegans*-Mutanten besitzen eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Schaffitzel & Hertweck, 2006).

Kaempferol und Rutin besitzen eine antioxidative Kapazität entsprechend des Trolox, einen protektiven Effekt gegen intrazellulären oxidativen Stress, führen jedoch nicht zu einer Lebensverlängerung. Ein positiver Effekt von Rutin und Kaempferol auf Alterungsprozesse erscheint dennoch nicht gänzlich ausgeschlossen. Erstens wurde im Rahmen des Versuchs isoliert die Lebensspanne als Summe aller möglichen Effekte betrachtet und nicht wie gesund diese erreicht wurde. Zweitens konnten Kampkötter *et al.* bereits zeigen, dass Quercetin, Kaempferol, und Rutin, nicht aber Fisetin, in *C. elegans* die Bildung von Lipofuszin vermindern (Kampkötter *et al.*, 2007 a; b). Lipofuszin gilt als Alterspigment (Sohal & Buchan, 1981) und seine Konzentration steht in Relation zur Menge der intrazellulären radikalvermittelten Schäden (Yin, 1996). Das Quercetin wirksamer war als die ebenfalls gegen ROS protektiven Substanzen Kaempferol und Rutin, zeigt Parallelen zu Zellkulturexperimenten, bei denen Quercetin ebenfalls stärkere Effekte aufwies als die Vergleichssubstanzen (Hanneken *et al.*, 2006; Noroozi *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006).

Fisetin zeigte eine Diskrepanz zwischen stärkstem antioxidativen Potential im zellfreien Medium und geringsten bzw. fehlenden positiven Effekten im Modellorganismus. In Anbetracht der bisherigen Ergebnisse eignen sich zwei logische Erklärungsansätze.

Erstens könnte Fisetin in *C. elegans* intrazellulär geringere Spiegel der effektiven Form erreichen.

Dies könnte an verschiedenen Stellen des Organismus als Folge einer geringeren Bioverfügbarkeit, einer rascheren Ausscheidung oder einer Verstoffwechslung mit Beeinträchtigung der Wirksamkeit geschehen. Dies würde auch den Unterschied zu *in vitro*-Studien erklären, welche positive Effekte des Fisetins gegen verschiedene Stressoren in Zellkulturen belegen (Hanneken *et al.*, 2006; Makena & Chung, 2007; Syed *et al.*, 2008).

Zweitens könnte das entgiften von Radikalen nicht die alleinige Ursache für die positiven Effekte der übrigen Substanzen sein. Dies erscheint aufgrund der unterschiedlichen Wirkungen der übrigen Substanzen auf die Lebensspanne bei vergleichbarem Effekt auf die Stressresistenz möglich. Denn die Lebenserwartung von *C. elegans* wird neben der Stressresistenz durch viele weitere Faktoren wie Immunkompetenz, Metabolismus und Reproduktion beeinflusst (Schaffitzel & Hertweck, 2006). Denkbar ist hier neben einer Reaktion mit dem Stressor eine Beeinflussung von zelleigenen Bestandteilen.

Wenn die beobachteten Effekte Folge einer Reaktion der Flavonoide mit intrazellulären Bestandteilen wären, könnte die direkte oder indirekte Interaktion mit Signalwegen ein zusätzlicher oder potentiell entscheidender Wirkmechanismus sein. Die Erhöhung von Lebensspanne und Stressresistenz durch Quercetin rückt dabei Wege in den Fokus, die mit diesen Eigenschaften direkt verknüpft sind. Dies trifft in besonderem Maße für die Insulin/IGF-Signalkaskade zu. Sie spielt in *C. elegans* eine zentrale Rolle für Dauerstadium, Entwicklung, Stoffwechsel, Reproduktion, Lebensspanne und Stressresistenz (Hertweck *et al.*, 2004). Die Signalkaskade ist auch für Säugetiere relevant, denn die einzelnen Faktoren und Zielgene sind stark konserviert und weisen große Homologien zwischen Nematoden und Säugern auf (Kenyon, 2005).

Ziel der Insulin/IGF-Signalkaskade ist der Transkriptionsfaktor DAF-16 (Hertweck *et al.*, 2004; Kenyon, 2005). Dieser wird unter Stressbedingungen mit verminderter Aktivität der Signalkaskade vermehrt aus dem Zytosol in den Nukleus transloziert, um verschiedene Zielgene zu aktivieren, wie in Abbildung 5 dargestellt (Modifiziert nach Hertweck *et al.*, 2004). Die Zielgene haben Einfluss auf die Entgiftung von Sauerstoffradikalen, die Immunabwehr und metabolische Veränderungen des Fettstoffwechsels. (Oh *et al.*, 2006; Kenyon, 2005). Somit besitzt die Lokalisation von DAF-16 direkten Einfluss auf Stressresistenz und Lebensspanne von *C. elegans*. Im folgenden Schritt der Arbeit wurde der Einfluss der Flavonoide auf die DAF-16-Lokalisation untersucht.

Mithilfe des mutierten Stamms TJ 356 besteht die Möglichkeit, die Lokalisation des Transkriptionsfaktors in Form eines DAF-16::GFP-Fusionsprotein am lebenden Nematoden UV-mikroskopisch zu bestimmen (Henderson & Johnson, 2001). Insbesondere postmortale Veränderungen sind so als Störgrößen sicher ausgeschlossen. Es wurde zunächst die Veränderung der Lokalisation unter Stressbedingungen untersucht.

Im stressfreien Medium befand sich DAF-16 überwiegend im Zytosol. Sowohl thermaler Stress von 37 °C als auch intrazellulärer oxidativer Stress durch 150 µM Juglone führten bei 100 % der untersuchten TJ 356-Versuchstiere zu einer nukleären Lokalisation der Transkriptionsfaktoren. Ein Vergleich mit der oben beschriebenen Signalkaskade belegt, dass sich die Lokalisation des DAF-16::GFP-Fusionsprotein unter Stressbedingungen verhielt, wie es die Kenntnisse der Urform erwarten ließen. Dies stellt eine notwendige Grundlage für die Aussagekraft und Interpretation des folgenden Experimentes dar.

Darauf aufbauend wurde untersucht, ob die Flavonoide unter stressfreien Bedingungen die Lokalisation von DAF-16 in TJ 356 beeinflussen können. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit allen vier Flavoniden zu einer signifikant vermehrten nukleären Lokalisation von DAF-16 führen.

Quercetin zeigte den größten, Kaempferol und Fisetin einen gleichwertigen und Rutin den geringsten Effekt. Der Anteil Würmer lag mit ca. 20 bis 38 % deutlich unter den 100 % der Stressversuche.

Die Antwort der Signalkaskade auf Flavonoide entsprach von der Tendenz wie die Stressbedingung einer Aktivierung. Hierbei stellt sich die Frage, ob dies die Folge eines prooxidativen Effekts der Flavonoide oder eines alternativen Aktivierungsmechanismus darstellt.

Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Beobachtung ist, dass die Flavonoide selbst einen milden Stressor für die Zellen darstellen. Es ist bekannt, dass Antioxidantien dosis- und umweltabhängig prooxidativ wirken und Zellschäden induzieren können. (Crespo *et al.*, 2007; Robaszekiewicz *et al.*, 2007; Wätjen *et al.*, 2005). In Anwesenheit stärkerer Oxidantien wirken die schwächer aktiven Substanzen jedoch, wie im TEAC-Assay und Stressversuch gezeigt, antioxidativ.

Die verlängerte Lebensspanne nach Quercetinbehandlung entspräche in diesem Fall einer Hormesis. Das heißt einer Reaktion auf einen stetigen milden Stressor, der zu einer Adaptation des Organismus mit erhöhter Resistenz führt. Ein direkter Zusammenhang zwischen Hormesis und DAF-16 in *C. elegans* ist bereits bekannt, ebenso, dass diese zu einer verlängerten Lebensspanne führen kann (Cypser *et al.*, 2006). Im Falle einer Hormesis wäre jedoch eine Höherregulation von zelleigenen Schutzmechanismen zu erwarten, was, wie im späteren Versuch zu sehen, nicht der Fall war.

Das Quercetin als einzige Testsubstanz zu einer Lebensverlängerung führt und die höchste Rate an nukleär lokalisiertem DAF-16::GFP-Fusionsprotein zeigt, legt einen direkten Zusammenhang zwischen der Translokation und der Lebensspanne nahe, ist jedoch nicht beweisend.

Dafür spricht die Beobachtung, dass *knock out*-Mutanten des Insulin/IGF-Signalwegs mit in der Folge erhöhter DAF-16-Aktivität bei Nematoden und Mäusen eine erhöhte Stressresistenz und Lebensverlängerung zeigen (Finkel & Hoolbrook, 2000; Gill, 2006; Kenyon, 2005; Pinkston *et al.*, 2006).

Das Fisetin zu einer Translokation führt zeigt, dass es tatsächlich intrazelluläre Wirkung entfalten kann und folglich in relevanten Mengen aufgenommen worden sein muss. Der fehlende Effekt gegen oxidativen Stress, trotz einer mit Kaempferol vergleichbaren Translokationsrate, macht einen alleinigen DAF-16-Effekt als Ursache der Stressresistenzsteigerung durch die übrigen Testsubstanzen unwahrscheinlich.

Dies wird gestützt durch den Umstand, dass Rutin trotz der geringsten Translokationsrate gegen ROS protektiver wirkt als Fisetin.

Der Versuch spricht für die Hypothese, dass die Beeinflussung oxidativer Stressoren nicht alleiniger Wirkmechanismus der Flavonoide ist. Eine direkte oder indirekte Interaktion mit DAF-16 oder vorgeschalteten Teilen seiner regulierenden Signalkaskaden ist eine logische Erklärung für die beobachtete Translokation.

Wenn Flavonide Einfluss auf DAF-16 haben, sollten sie auf diesem Wege die Zielgene des Transkriptionsfaktors beeinflussen können. Ob und in welchem Ausmaß dies geschieht, sollte am Beispiel des antioxidativen Enzyms Superoxiddismutase-3 untersucht werden. Die SOD katalysiert den ersten Schritt zur Entgiftung der Hyperoxid-Anionen und bildet einen zentralen Teil der enzymatischen Zellantwort auf reaktive Sauerstoffspezies (McCord *et al.*, 1971).

Sie wird durch ein bekanntes DAF-16-Zielgen codiert. Dies wird bei nukleärer Lokalisation von DAF-16 vermehrt induziert (Oh *et al.*, 2005 a).

Des Weiteren ist von Bakterien und Mehrzellern bekannt, dass Stress die Induktion von antioxidativen Enzymen im Allgemeinen und der SOD im Besonderen stimulieren kann (Dröge, 2002; Hasson & Fridovich, 1977). Beides gilt auch für die antioxidativen Enzyme Katalase und Gluthationtransferase. (Oh *et al.*, 2005 a; Kenyon, 2005).

Der *C. elegans* Stamm CF 1553 produziert ein SOD-3::GFP-Fusionsprotein (Libina *et al.*, 2003). Dies ermöglicht im UV-Mikroskop *in vivo* die Messung der SOD-3 Expression.

Parallel zu den Experimenten zur DAF-16-Lokalisation wurde die SOD-Produktion der Würmer des Stammes CF 1553 bei 37 °C und bei 150 µM Juglone getestet. In beiden Versuchsgruppen kam es zu einem signifikanten Fluoreszenzanstieg als Zeichen der Geninduktion. Sowohl thermaler als auch oxidativer Stress führen folglich zu einer vermehrten SOD-3 Produktion in CF 1553. Die vermehrte Induktion unter Stress entspricht nach den Versuchen zur DAF-16 Lokalisation und in Anbetracht der aktuellen Kenntnis der dazugehörigen Signalkaskade den Erwartungen (Crespo *et al.* 2002; Dröge, 2002; Libina *et al.*, 2003). Dies belegt, dass sich das mutierte Gen unter Stressbedingungen wie die Urform verhielt.

Im folgenden Schritt wurde der Einfluss der Flavonide unter stressfreien Bedingungen auf die SOD-3 Expression in CF 1553 untersucht. Alle Substanzen verursachen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine signifikant niedrigere Fluoreszenz, also eine verminderte Induktion des *sod-3::gfp*-Gens.

In Anbetracht des Ergebnisses stellen sich zwei Fragen: Erstens, wie führen die Substanzen zu einer verminderten SOD-3 Produktion? Zweitens, warum kommt es nicht zu einer vermehrten Induktion, wie sie aufgrund der vermehrten nukleären DAF-16 Lokalisation zu erwarten wäre?

In der Literatur finden sich sowohl Studien, die eine Erhöhung antioxidativer Enzyme durch Flavonoide beschreiben, als auch Studien, die eine Verminderung feststellen. Für Quercetin wurde die Erhöhung der SOD-Produktion in Zellkulturen beschrieben (Bando *et al.*, 2007; Mahakunakorn *et al.*, 2005). In anderen Studien bewirkte Quercetin in Zellkulturen eine Reduktion der SOD-3 (Röhrdanz *et al.*, 2003; Strayer *et al.*, 2003), ebenso wie in den vorliegenden Experimenten in *C. elegans*.

Mithilfe der BL-1 GFP-Reportermutante konnte ein mindernder Einfluss der Flavonoide auf das ebenfalls antioxidative Glutathionsystem von *C. elegans* gezeigt werden (Kampkötter *et al.*, 2006).

In allen Fällen ist ein möglicher Wirkmechanismus eine Beeinflussung der Redoxhomöostase. Es ist bekannt, dass Radikale als intrazelluläre Botenstoffe agieren (Mittal & Murad, 1977; Thannikal & Fanburg, 2000; Valko *et al.*, 2006;). Damit diese Regulation funktioniert, besteht unter Ruhebedingungen ein Gleichgewicht, die Redoxhomöostase (Dröge, 2002).

Die Konzentration der SOD ist, ebenso wie verschiedener anderer antioxidativer Enzyme, an diesem Gleichgewicht beteiligt und wird im Sinne einer Rückkopplung durch sie kontrolliert. Wasserstoffperoxid und das Superoxidradikal stellen dabei bewiesenermaßen Transmitterstoffe dar (Dröge, 2002; Harris, 1992).

Die Flavonoide als Radikalfänger könnten die Menge der Botenstoffe reduzieren und infolge der Rückkopplung die Konzentration der antioxidativen Enzyme vermindern.

Warum aber führt die DAF-16-Translokation nicht zu einer vermehrten SOD-3-Konzentration?

Wenn weitere Signalwege mit Einfluss auf die SOD-3 durch die Flavonoide direkt oder über die regulierende Redoxhomöostase beeinflusst werden und die mindernden Einflussgrößen in der Summe überwiegen, könnte dies einen DAF-16 vermittelten Effekt überdecken.

Eine alternative Möglichkeit besteht darin, dass die Translokation von DAF-16 stattfindet, aber das SOD-3-Gen nicht vermehrt transkribiert wird. Das Phänomen einer DAF-16-Translokation ohne SOD-3-Induktion wurde in *C. elegans* bereits beobachtet (Henderson *et al.*, 2006). Die alleinige Translokation eines Faktors ist nicht ausreichend, die Genexpression zu regulieren, da weitere Co-Faktoren erforderlich sind.

Für DAF-16 sind mehrere Co-Faktoren beschrieben. Einige sind eng mit der hier gemachten Beobachtungen verknüpft. Erstens der Co-Faktor 14-3-3, der notwendig ist für die Bindung des SIR 2.1-Transkriptionsfaktors an DAF-16 (Li *et al.*, 2006). *Knock out*- Experimente belegen, dass dies für die Stressresistenzhöhung über den Insulin/IGF-Weg notwendig ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Aktivität nicht zu einer Lebensverlängerung führt (Berdichevsky *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005).

Zweitens der Co-Faktor Dictyostelium suppressor of mek null Homolog (SMK-1). Er beeinflusst phosphoryliertes DAF-16 im Nukleus und erhöht spezifisch die Immunantwort und oxidative Verteidigung, unter anderem über die SOD-3 Expression, nicht aber Bereiche wie Hitzeresistenz und Lebensspanne (Wolff *et al.*, 2006).

Folglich ist es substanzabhängig möglich, dass Faktoren aktiv sind die z.Bsp. die Lebensspanne verlängern, ohne die SOD-3 zu erhöhen, bzw. die Stressresistenz erhöhen, ohne die Lebensspanne relevant zu beeinflussen.

Von DAF-16 ist zudem bekannt, dass, abhängig von der Zusammensetzung der aktivierenden Kinasen im Zytosol, unterschiedliche Effekte ausgelöst werden können. AKT-1, AKT-2 und SGK-1 sind in ihrer Struktur sehr ähnlich und können ihre Wirkung einzeln und gemeinsam als Multimer entfalten. Die Bedeutung von AKT-1 und AKT-2 als DAF-16-Aktivator überwiegt bei der Bildung der Dauerformen und die der SGK-1 eher bei Stresstoleranz und Langlebigkeit (Hertweck *et al.*, 2004).

Dies zeigt, dass bei durch verschiedene Substanzen verursachter, gleichsinniger Verschiebung eines Transkriptionsfaktors, abhängig von der Art der Aktivierung und der Co-Faktoren, unterschiedliche Effekte verursacht werden können.

Daraus läßt sich ableiten, dass sich eine DAF-16-Translokation und SOD-3-Verminderung nicht ausschließen, sofern DAF-16 die erforderlichen Faktoren zur SOD-3-Induktion fehlen oder die Verminderung über alternative Wege erfolgt und diese die Aktivierung überwiegen.

In diesem speziellen Zusammenhang sind Stressresistenz und Lebenserwartung nicht gleichzusetzen. Diese Erkenntnis lässt sich durch weitere Studien stützen. So wurde gezeigt, dass isoliert erhöhte SOD-Level keine Lebensverlängerung verursachen (Keaney *et al.*, 2004). Eine alleinige Verminderung der SOD-3 reduziert auch nicht die Lebenserwartung von *C. elegans*, weder von Wildtypen (Yang *et al.*, 2007) noch von Mutanten (Libina *et al.*, 2003). Ebensovwenig muss eine erhöhte Stressresistenz mit einer verlängerten Lebensspanne einhergehen (Lithgow *et al.*, 1995).

3.2 Schlußfolgerung:

Zusammengefasst ergeben sich folgende Schlussfolgerungen und Ansatzpunkte für zukünftige Forschungen.

Alle Testsubstanzen besitzen ein antioxidatives Potential, dass *in vitro* mindestens der Effektstärke bekannter zellulärer Schutzsystemen entspricht.

Quercetin, Kaempferol und Rutin, nicht jedoch Fisetin, besitzen unter moderaten Stressbedingungen einen signifikanten protektiven Effekt gegen intrazellulären oxidativen Stress.

Nur Quercetin führt zu einer Lebensverlängerung unter stressfreien Kulturbedingungen.

Alle Substanzen führen zu einer Translokation des Transkriptionsfaktors DAF-16 in den Kern. Dieser Effekt ist bei Quercetin am größten, bei Rutin am geringsten.

Trotz vermehrter Translokation von DAF-16 kommt es bei allen Substanzen zu einer Verminderung der SOD-3-Induktion.

Da alle Substanzen intrazelluläre Effekte besitzen, kann davon ausgegangen werden, dass sie für *C. elegans* in relevanter Menge bioverfügbar sind, wie es für Quercetin bereits belegt wurde (Kampkötter *et al.*, 2007 c). Die erreichten intrazellulären Konzentrationen sind offensichtlich effektrelevant.

Die erhöhte Stressresistenz beweist die protektive Wirkung der Flavonoide. Die Resistenzerhöhung in den Nematoden ist nicht proportional zum antioxidativen Potential der Testsubstanzen. Bei fehlender Wirkung des Fisetins stellt sie keinen gruppenspezifischen Effekt aller Flavonoide dar. Ein direkter oder indirekter Zusammenhang zwischen antioxidativem Effekt und ROS-Protektion ist jedoch naheliegend.

Im stressfreien Medium ließ sich beobachten, dass in der Summe SOD-3 reduzierende Effekte der Flavonoide überwiegen. Unabhängig von der Kenntnis des genauen Wirkmechanismus ist die SOD-3-Reduktion als Reaktion auf einen antioxidativen und nicht auf einen prooxidativen Effekt zu werten. Dies gilt, da trotz Reduktion dieses zellprotektiven Enzyms weder die Lebensspanne der Versuchstiere, noch die Stressresistenz reduziert wurde. Diese wurden im Gegenteil substanzabhängig teils erhöht.

Eine DAF-16-Translokation als Folge eines prooxidativen Effekts der Flavonoide erscheint folglich unwahrscheinlich. Gleiches gilt für eine Hormesis als Ursache der verlängerten Lebensspanne der mit Quercetin behandelten Würmer, da im Rahmen der Resistenzerhöhung eine Hochregulation der SOD-3 zu erwarten wäre.

Es bleibt Aufgabe zukünftiger Untersuchungen, die intrazellulären Konzentrationen dieser und weiterer Flavonoide zu bestimmen. Dies ließe Rückschlüsse auf Konzentrationseffekte bei der Wirkweise zu. Es empfiehlt sich, die durchgeführten Experimente mit verschiedenen Flavonoidkonzentrationen zu wiederholen, um hier einen Dosiserfluss und eventuell toxische Effekte zu untersuchen.

Quercetin bewirkt die höchste DAF-16-Translokationsrate und verlängert als einzige Substanz die Lebensspanne. Dies stützt die Hypothese, dass DAF-16 an der erhöhten Lebensspanne beteiligt ist. Zu belegen wäre dies durch eine Testung nach gleichem Versuchsaufbau mit DAF-16-*knock-out*-Mutanten.

Alle Substanzen zeigen verschieden ausgeprägt messbaren Einfluss auf die DAF-16-Lokalisation. Bei fehlender Korrelation zum antioxidativen Potential erscheint dies als ein strukturabhängiger Effekt. Hierbei besitzt die Glykolisierung, welche den einzigen Unterschied zwischen dem effektstärksten Quercetin zum effektschwächsten Rutin darstellt, offensichtlich einen mindernden Einfluss.

Der exakte Punkt der Interaktion zwischen Substanzen und Signalweg kann ohne Kenntnis der Aktivität der vorgeschalteten Schritte nicht genau benannt werden. So ist eine direkte Interaktion mit DAF-16 ebenso möglich wie eine Interaktion mit den frühen Kaskadeschritten oder Regulationsgrößen der Redoxhomöostase.

Dies ließe sich mittels Immunoblot, *knock-out*-Mutanten und RNAi-Experimenten zu vorgeschalteten Strukturen näher bestimmen.

Die verminderte SOD-3 Induktion nach Flavonoidbehandlung schließt positive Effekte der DAF-16-Translokation nicht aus.

Da verschiedene Effekte eines Transkriptionsfaktors bekanntermaßen andere Co-Faktoren benötigen können ist es in diesem Zusammenhang von Interesse, ob und welche andere DAF-16-Zielgene induziert werden. Dies könnte zum Beispiel mittels geeigneter DNA-*Microarray* (Gen-Chip-Methoden) oder weiterer Reportermutanten untersucht werden.

Für die verminderte Induktion des SOD-3::GFP-Gens durch Flavonoide bleiben verschiedene Erklärungsansätze bestehen. Am wahrscheinlichsten erscheint eine Beeinflussung von alternativen Signalkaskaden und bzw. oder ein Eingriff in die Redoxhomöostase.

Die verminderte SOD-3-Aktivität würde, als teil einer Rückkopplung, das Gleichgewicht wieder zugunsten der oxidativen Transmitterstoffe verschieben. Der Effekt wäre in diesem Fall insbesondere von Konzentration und antioxidativem Potential der Flavonoide abhängig. Hier würden eine exakte Konzentrationsbestimmung der aufgenommenen Flavonoide und eine Bestimmung intrazellulärer ROS-Konzentrationen weitere Hinweise liefern.

Weitere Signalkaskaden könnten mittels Immunoblot oder Reportermutanten von *C. elegans* auf Aktivitätsveränderungen unter Flavonoidbehandlung untersucht werden.

Sinnvoll erscheint es hier, bei bekannten Effekten der Flavonoide auf Stressresistenz, Lebensspanne und SOD-3-Induktion, Kaskaden zu betrachten, die mit diesen Zielgrößen verknüpft sind. Als Auswahl namentlich genannt seien hier der JNK-1-Weg (c-Jun N-terminale Kinase) (Kawasaki *et al.*, 1999), der SIR- 2.1 Weg (silent information regulator) (Berdichevsky *et al.*, 2006), der HSF-1 (heat shock transkriptionfactor-1) (Schaffitzel & Hertweck, 2006) und weiterhin der Insulin/IGF-Weg (Hertweck, 2004).

Abschließend sollen die im Rahmen der Einleitung formulierten Ziele der vorliegenden Arbeit konkret betrachtet werden:

Es konnte belegt werden, dass die Flavonoide positive Effekte auf Lebensspanne und Stressresistenz des Modellorganismus *C. elegans* haben. Diese Effekte zeigen eine große Variabilität, sodass positive Effekte einer Substanz nicht ungeprüft auf weitere Flavonoide übertragen werden können und auch schädliche Effekte nicht sicher auszuschließen sind.

Gezeigt wurde, dass die Flavonoide Einfluss auf intrazelluläre Transmission und Transkription haben. Insbesondere der unterschiedlich große Einfluss der Substanzen, die fehlende Korrelation zur antioxidativen Kapazität und der Effekt auch geringer Strukturunterschiede machen eine direkte Interaktion mit Signalwegen sehr wahrscheinlich.

Mithilfe der verwendeten Experimente gelang es eine Rangfolge der Effektstärken aufzustellen. Wobei positive Effekte bei Quercetin am deutlichsten hervortraten, Kaempferol und Rutin überwiegend vergleichbare Effekte zeigten und die antioxidativ stärkste Substanz Fisetin überraschenderweise insbesondere bei Stressresistenz und Lebensspanne am schlechtesten abschnitt. Dies belegt, dass eine alleinige Betrachtung des antioxidativen Potentials zur Nutzenabwägung der Substanzen nicht ausreicht.

Die durchgeführten Experimente stellen somit einen sinnvollen ergänzenden Schritt zur Vorauswahl potentieller Pharmaka aus dem riesigen Feld pflanzlicher Polyphenole dar.

Die vorliegende Arbeit leistet ihren Beitrag zur Grundlagenforschung. Die erprobten Methoden ermöglichen eine zeiteffiziente Vorauswahl von Testsubstanzen und die Ergebnisse eröffnen Ansatzpunkte für die weitere Aufklärung der Wirkmechanismen. Die Stärken des Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* kamen voll zum Tragen und er kann bei der Untersuchung der Flavonide weiterhin einen wertvollen Beitrag leisten.

Flavonoide sind als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe fester Bestandteil unserer Nahrung. Die vorliegenden Experimente stützen die Vermutung, dass sie Anteil haben an den vielfach belegten positiven Effekten einer ausgeglichenen und pflanzenreichen Ernährung. In Einzelfällen finden Flavonoide bereits medizinische Anwendung, jedoch birgt die Natur noch eine große Vielfalt weiterer Flavonoide und verwandter pflanzlicher Polyphenole, die teils bekannt sind, teils auf ihre Entdeckung warten. Das diese in Zukunft eine zunehmende Bedeutung in der humanmedizinischen Pharmakotherapie haben ist höchstwahrscheinlich.

4 Materialien und Lösungen:

***C. elegans* Stämme und Nahrungsbakterien:**

Alle verwendeten Stämme stammen vom Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota). Weiterführende Informationen finden sich im Methodenteil und auf wormbase.org.

N 2: var. Bristol–Wildtyp (Brenner, 1974)

TJ 356: Transgen zls 356 [*daf-16::gfp; ro -6*] (Henderson & Johnson, 2001)

CF 1553: Transgen muls 84 [*sod-3::gfp*] (Libina *et al.*, 2003)

E. coli – OP-50

E. coli – OP-50-1 (Streptomycin resistente Stamm)

Substanzen:

Alle verwendeten Substanzen sind von analytischer Reinheit und soweit nicht anders angegeben, Produkte der Firmen *Merck* (Darmstadt, Germany), *Carl Roth* (Karlsruhe, Germany) und *Sigma-Aldrich* (Deisenhofen, Germany). Ausgewählte Substanzen sind zusätzlich mit Strukturformel aufgeführt.

Name	Firma
Quercetin dihydrate (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone dihydrate)	<i>Sigma-Aldrich Co.</i> (Deisenhofen, Germany)
Kaempferol (3,4',5,7-Tetrahydroxyflavone)	<i>MP Biomedicals</i> (Eschwege, Germany)
Rutinhydrate 95% (Quercetin-3-rutinoside hydrate)	<i>Sigma-Aldrich Co.</i> (Deisenhofen, Germany)
Fisetin (3,3',4',7-Tetrahydroxyflavone)	<i>Sigma-Aldrich Co.</i> (Deisenhofen, Germany)
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid)	<i>Calbiochem</i> (Bad Soden, Germany)
Juglone (5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone)	<i>Fluka Chemica AG</i> (Buchs, Schweiz)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	<i>Sigma-Aldrich Co.</i> (Deisenhofen, Germany).
SYTOX Green [5 mM]	<i>Molecular Probes Inc.</i> (Leiden, Netherlands)

Materialien:

Material	Firma
Plastikcuvetten	<i>Sarstedt 67742</i>
Petrischalen (35 × 10 mm)	<i>Greiner 627161</i>
Petrischalen (100 × 15 mm)	<i>Falcon 351029</i>
384- well µ Clear- Platte, SV, schwarz	<i>Greiner 788096</i>
Abdeckfolie	<i>Greiner 676001 EasySeal</i>
Deckgläser (18 × 18 mm)	<i>Engelbrecht Medizin- und Labortechnik</i>
Objektträger (76 × 26 mm)	<i>Engelbrecht Medizin- und Labortechnik</i>

Geräte:

Gerät	Produktname [Firma]
Fluoreszenzmikroskop	Axiolab [<i>Zeiss</i>]
Fluoreszenzspektro-photometer	Wallac Victor ² 1420 Multilabel Counter [<i>Perkin Elmer</i>]
Kamera	Cool Snap CF Digital Monochrome Camera [<i>Intas</i>]
Photometer	Lambda 25 UV/VIS Spectrometer [<i>Perkin Elmer</i>]
Stereomikroskop	Stemi 2000-C [<i>Zeiss</i>]
Zentrifugen	Minifuge 2 [<i>Heraeus-Christ</i>], Microfuge R [<i>Beckman</i>]
Inkubator	OV 2 [<i>Biometra</i>]

Computerprogramme:

Programmname	Firma
Image Pro Plus Version 4.5	<i>Media Cybernetics</i>
MS Office	<i>Microsoft</i>
TINA 2.0	<i>Raytest Isotopenmessgeräte GmbH</i>
UV Winlab Version 2.85.04	<i>Perkin Elmer</i>
Wallac 1420 Workstation	<i>Perkin Elmer</i>
SPSS 12.0 und 15.0	<i>SPSS Inc.</i>

Kulturmedien und Lösungen:

Name:

Flavonoid Stock (100 mM)

Zusammensetzung:

10^{-4} mol Flavonoid je 1 ml DMSO

Quercetin dihydrate (0,0338 g je 1 ml DMSO)

Kaempferol (0,0286 g je 1 ml DMSO)

Rutinhydrate 95 % (0,0610 g je 1 ml DMSO)

Fisetin (0,0286 g je 1 ml DMSO)

NGM- Medium:

3 g NaCl

2,5 g Soja-Pepton

ad 1 L mit dH₂O

Autoklavieren

nach dem Abkühlen Zugabe von

1 ml Lsg. A

0,5 ml Lsg. B

1 ml Lsg. C

25 ml Lsg. D

NGM- Agar:

3 g NaCl

2,5 g Soja-Pepton

20 g Bacto-Agar

ad 1 L mit dH₂O

autoklavieren

nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C Zugabe von

1 ml Lsg. A

0,5 ml Lsg. B

1 ml Lsg. C

25 ml Lsg. D

Lsg. A

0,5 g Cholesterin

100 ml 96 % EtOH

Lsg. B

27,8 g CaCl₂ bzw. 36,8 g CaCl₂ × 2 H₂O

ad 250 ml mit dH₂O

autoklavieren

Lsg. C

30,1 g MgSO₄ oder 61,6 g MgSO₄ × 7 H₂O

ad 250 ml mit dH₂O

autoklavieren

Lsg. D

27,08 g KH₂PO₄

8,90 g K₂HPO₄ oder 9,1 g K₂HPO₄ × 3 H₂O

ad 250 ml mit dH₂O

Autoklavieren

OP 50 Minimalmedium:	195,6 ml M 9-Puffer 2 ml 2 M NH ₄ Cl 2 ml 20 % D-Glukose 0,4 ml 2 mg/ml Uracil
OP 50- 1 Minimalmedium:	195,5 ml M 9-Puffer 2 ml 2 M NH ₄ Cl 2 ml 20 % D-Glukose 0,4 ml 2 mg/ml Uracil 0,1 ml 100 mg/ml Streptomycin
M 9- Puffer	6 g Na ₂ HPO ₄ 3 g KH ₂ PO ₄ 5 g NaCl 0,25 g MgSO ₄ × 7 H ₂ O ad 1 L mit dH ₂ O Autoklavieren und bei 4 °C lagern
20 % D- Glucose	20 g D(+)- Glucose ad 100 ml mit dH ₂ O Sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern
Semisynchronisation:	
Bleiche-Lösung	250 µl 5 M NaOH 250 µl 100 % Natriumhypochlorit (13 % Cl) frisch ansetzen
UV-Mikroskopie am lebenden Wurm:	
5 % Agarose	2,5 g Agarose ad 50 ml dH ₂ O
20 mM Natriumazid	0,065 g NaN ₃ ad 50 ml dH ₂ O
TEAC-Assay:	
ABTS Lsg.	0,0192 g ABTS [2,2'-azino(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 0,0028 g Amoniumperoxidisulfat ad 5 ml dH ₂ O
Trolox Stock (10mM)	0,005 g ad 2 ml 96 % EtOH

Oxidativer Stress:

Juglone Stock [10mM]	10 mM Juglone in 96 % EtOH
SYTOX Green Stammlösung [50 µM]	5 µL SYTOX Green [5 mM] in 495 µL DMSO
10 × PBS	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1 L mit dH ₂ O, pH 7,4
PBST (0,1 % Tween 20)	1 ml 10 % Tween 20 10 ml 10 × PBS ad 100 ml mit dH ₂ O
10 % Tween 20	10 ml Tween 20 ad 100 ml mit dH ₂ O

5 Methoden:

5.1 Kultivierung und grundlegende Untersuchungsmethoden:

5.1.1 NGM- Agarplatten und Flüssigmedium:

Die Nematoden *C. elegans*, im vorliegenden Fall die Stämme N 2 (*variation Bristol/Wildtyp*) CF 1553 und TJ 356, lassen sich sowohl in flüssigem als auch auf festem Medium kultivieren. Beide Verfahren haben ihre Vorteile.

In flüssigem Nematode Growth Medium (NGM) lassen sich die Würmer hervorragend mit löslichen Substanzen behandeln, die sie je nach Substanz, sowohl über die Cuticula als auch das Intestinum aufnehmen können.

Die Festkultur auf speziellen NGM-Agarplatten wurde im Rahmen dieser Arbeit im Besonderen für die Stammhaltung verwendet. Die Platten sind lang haltbar, relativ unsensibel für Kontaminationen und unkompliziert zu handhaben.

Es besteht die Möglichkeit, Dauerlarven in Kryobehältern mit flüssigem Stickstoff aufzubewahren und die Kulturen ohne Mehraufwand über lange Zeiträume zu erhalten. Es ist für Forschung über längere Zeiträume, beim Versenden von Stämmen oder als Reserve im Falle von Kulturkontaminationen von erheblichem Wert. Dies war im Rahmen der Experimente nicht erforderlich und wird daher nicht weiter beschrieben.

Grundlage für die Kultivierung ist das Nematode NGM, welches nach dem Rezept im Materialteil in sterilen 1000 ml Glasflaschen angesetzt wird. Die Stoffe werden mit einem Rührfisch vermengt, bis sich das Sojabohnen-Pepton gelöst hat und anschließend autoklaviert.

Direkt vor der Nutzung werden dem NGM-Medium die Lösungen A, B, C und D hinzugesetzt. Der NGM-Agar muss bei der Zugabe der Lösungen A, B, C und D noch flüssig sein. Anschließend wird er in Petrischalen gegossen und bis zum Erstarren bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lagerung der NGM-Agarplatten erfolgt bei 4 °C.

Zur Ernährung der Nematoden werden die erstarrten Platten üblicherweise mit einem Bakterienrasen bewachsen. Bei einer Petrischale (100 × 15 mm) werden 30 bis 50 µl einer OP-50-Lösung auf die Platte getropft. Die Flüssigkeit wird mit einem sterilen Glasspatel rechteckig über der Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die bewachsenen Platten werden ebenfalls bei 4 °C gelagert.

Für einzelne Versuche wurde 50 ml NGM-Flüssigmedium verwendet, das vor Gebrauch mit den Lösungen A, B, C und D vervollständigt wurde. Die Rezeptur lautet entsprechend umgerechnet:

50 µl Lsg. A + 25 µl Lsg. B + 50 µl Lsg. C + 1250 µl Lsg. D + 48,625 ml NGM

Als Nahrung wird 1 µl OP-50-Lsg. je ml Medium hinzugegeben.

5.1.2 Kultivieren von OP- 50 Bakterien:

Die Nematoden vom Stamm *C. elegans* ernähren sich von Bakterien, die den flüssigen Medien zugesetzt werden oder als Bakterienrasen auf den NGM-Agarplatten angezüchtet werden. Grundlage für beide Vorgänge ist eine Bakterienlösung des *E. Coli* Stamms OP-50.

Für die Anzucht der Bakterien werden 0,5 ml einer OP-50-Bakterienlösung und 200 ml OP-50-Minimalmedium in einen Erlenmeyerkolben gegeben und über Nacht, unter ständigem Schütteln, bei 37 °C im Inkubator (OV 2), inkubiert.

Anschließend wird die Lösung auf Gefäße mit 50 ml verteilt und 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird größtenteils verworfen und die Bakterienpellets mit 7,5 ml bis 10 ml OP-50-Minimalmedium zusammengeführt.

Die Lösung wird mehrfach resuspendiert und auf 2 ml Eppendorfgefäße verteilt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C. Es empfiehlt sich, eines der Gefäße gesondert zu lagern, um es als Grundlage für die nächste Kultivierung zu verwenden.

Die Kulivierung der OP-50-1-Bakterien erfolgt auf die gleiche Weise, jedoch wird das streptomycinhaltige OP-50-1-Minimalmedium verwendet.

5.1.3 Stammhaltung von *C. elegans*:

Die Stammhaltung erfolgt in Petrischalen (100 × 15 mm) auf NGM-Agar mit OP-50-Rasen. Für die Kulturerhaltung werden zweimal in der Woche, im vorliegenden Fall dienstags und freitags, 25 adulte Würmer der Stamme N 2 bzw. CF 1553 in eine frische Petrischale überführt. Der Stamm TJ 356 vermehrt sich langsamer, daher werden 40 adulte Tiere überführt, deren Rollerphänotyp lichtmikroskopisch gesichert sein muss.

Zum Umsetzen wurde der „Wurmpicker“ benutzt. Dabei handelt es sich um einen Platindraht mit flacher Spitze, der an einem Griff befestigt wurde. Der Draht wird vor jeder Benutzung über dem Bunsenbrenner hitzesterilisiert und kühlt dann kurz ab. Unter dem Lichtmikroskop werden die Würmer vorsichtig aufgenommen und umgesetzt.

Bei der Planung eines Versuches gilt es zu berücksichtigen, dass eine frische Platte mit 25 bis 40 adulten Würmern nach 3 Tage ausreichend Eier trägt, um nach Semisynchronisation zahlreiche Versuchstiere zu erhalten.

Alle Würmer der beschriebenen Versuche wurden, sofern nicht anders angegeben, permanent bei konstanten 20 °C aufgezogen.

5.1.4 Semisynchronisation von *C. elegans*:

Auf den NGM-Agarplatten zur Kulturerhaltung leben die Würmer unterschiedlicher Altersstadien und Generationen. Das Alter ist eine bedeutende Störgröße, die bei Versuchen um Stressverhalten und Lebenserwartung besonders ins Gewicht fällt.

Die Nematoden der Gattung *C. elegans* lassen sich mit Hilfe einer „Bleichen“ genannten Methode alterssynchronisieren. Hierbei macht man sich die Resistenz der Wurmeier gegenüber chemischen Noxen zunutze, welche die Widerstandskraft der geschlüpften Tiere deutlich übersteigt.

Beim Bleichen werden alle Würmer auf einer gut bewachsenen NGM-Agarplatte getötet und die Eier auf eine frische Platte überführt. Die neu wachsende Generation besteht nun aus Individuen, die alle gleichzeitig Eier waren. Dies bezeichnet man als semisynchron, weil die Zeitdifferenzen zwischen dem Schlüpfen nicht ausgeglichen werden.

Für das Bleichen benötigt man eine voll bewachsene Platte mit *C. elegans*, auf der ausreichend Eier vorhanden sind. Auf die Platte werden 2 ml flüssiges NGM-Medium gegeben. Nach mehrmaligem Schwenken wird die Schale kurz stehen gelassen. Trockener Agar saugt das Flüssigmedium auf, daher muss gegebenenfalls 1 ml NGM-Flüssigmedium nachgegeben werden.

Mithilfe einer Pipette werden die Eier zusammen mit den Würmern von der Platte gespült. Die Platte wird hierzu schräg gehalten und die Flüssigkeit mehrfach mit der Pipette über die Oberfläche laufen gelassen.

Die Lösung wird anschließend in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Sollten viele Eier auf der Platte verbleiben, kann der gesamte Vorgang wiederholt und die Eier nach dem Zentrifugieren zusammengeführt werden.

Das Eppendorfgefäß wird 1 Minuten bei 5000 rcf zentrifugiert. Als Reinigungsschritt wird der Überstand abpipettiert und durch frisches, flüssiges NGM ersetzt. Das Pellet wird anschließend durch Schütteln gelöst und erneut 1 Minute bei 5000 rcf zentrifugiert.

Der Überstand wird nun bis auf 500 µl verworfen. In diesen 500 µl Medium verbleibt das Pellet mit Eiern und Würmern.

Es werden 500 µl Bleichelösung hinzugegeben. Die Bleichelösung wird zuvor frisch angesetzt. Die festen Bestandteile werden durch Schütteln gründlich mit der Bleichelösung vermengt und 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es folgt 1 Minute bei 5000 rcf in der Zentrifuge.

Um die Bleichelösung zu entfernen wird der Überstand abpipettiert und durch 2 ml flüssiges NGM ersetzt. Das Pellet durch Schütteln gelöst, dann wird das Gefäß wieder 1 Minute bei 5000 rcf zentrifugiert. Dieser Reinigungsschritt wird dreimal wiederholt.

Abschließend kann das Bleichprodukt nun wahlweise auf eine NGM-Agarplatte oder in flüssiges Medium überführt werden. Bis zum Folgetag sind die meisten Nematoden aus ihren Eiern geschlüpft.

5.1.5 UV- Mikroskopie von lebenden *C. elegans*:

Ein großer Vorteil der verschiedenen *C. elegans*-Stämme ist ihre Transparenz. Diese gestattet es, dass lebende Würmer im UV-Mikroskop betrachtet werden und die Fluoreszenz gemessen wird.

Beim Handling sind zwei Probleme zu beachten. Erstens ist das Gewicht eines Deckglases ausreichend um einen Wurm zu verletzen.

Zweitens sind lebende Würmer beweglich, was das Fokussieren und die Intensitätsmessungen erschwert. Bei der Untersuchung der fluoreszierenden Stämme CF 1553 und TJ 356 wurde daher folgendes Verfahren angewandt.

Die Objektträger werden zunächst mit einer Schicht aus 5 % Agarose überzogen. Dafür löst man 2,5 g Agarose in 50 ml dH₂O.

Diese Lösung kann durch Erhitzen in der Mikrowelle oder per Heizplatte wiederholt verflüssigt werden. Drei Deckgläser (18 × 18 mm) werden parallel zueinander angeordnet. Über die Objektträger am Rand wird ein Streifen Autoklavierband der Länge nach befestigt. Sie dienen als Abstandhalter, welche die Dicke der Agarose-Pads bestimmen.

Mit der Pipette überträgt man einen Tropfen flüssige Agarose auf den mittleren Objektträger und legt zügig einen vierten Objektträger derart auf den Tropfen, dass er die ersten drei im rechten Winkel kreuzt. Die Agarose wird dadurch zu einem Pad geformt. Die Objektträger werden voneinander getrennt und derjenige auf dem die Agarose haftet weiterverwendet.

Das weiche Agarose-Pad verhindert, dass die Würmer beim Mikroskopieren verletzt werden und schränkt die Beweglichkeit der Würmer deutlich ein.

Sollen die Würmer gänzlich regungslos sein, zum Beispiel um scharfe Fotos anzufertigen, kann man sie betäuben. Dafür werden 10 µl einer 20 % Natriumazidlösung auf das Pad pipettiert. Diese betäubt die Würmer.

Die Nematoden können nun mit der Pipette oder dem Wurmpieker in den Tropfen übertragen werden. Dann wird überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und ein Deckglas aufgebracht, bevor die Arbeit am Mikroskop beginnt.

5.2 Messung des antioxidativen Potentials mittels TEAC- Assay:

Um die antioxidative Eigenschaft zu quantifizieren, wird der Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity-Assay verwendet. Dabei handelt es sich um einen zellfreien photometrischen Test, der das antioxidative Potential der Testsubstanz im Verhältnis zum synthetischen Vitamin-E-Derivat TROLOX (6-hydroxy-2,3,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic-acid) quantifiziert. Dabei macht man sich das Absorptionsverhalten des stabilen Radikals ABTS [2,2'-azino(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] zunutze. Dieses entfärbt sich bei Zugabe einer antioxidativen Substanz proportional zu dessen Menge und antioxidativer Kapazität.

Mindestens 24 Stunden vor dem Versuch muss die ABTS Lösung angesetzt werden. Die Substanz ist, lichtdicht verschlossen und bei Raumtemperatur gelagert, ca. 5 Tage haltbar.

Die Flavonoide und das TROLOX werden in Ethanol gelöst und anschließend bis zu den gewünschten Konzentrationen (2,5; 5; 10; 25 µM) verdünnt.

Bei der Herstellung der Lösungen ist zu beachten, dass diese während des Versuchs mit der ABTS Lösung im Verhältnis 1:1 vermischt werden. Das bedeutet, dass die tatsächliche Konzentration in der Reaktion halbiert wird und bei der Vorbereitung das Doppelte der Zielkonzentration betragen muss.

Für die Eichung des Photometers (Lambda 25 UV/VIS Spectrometer) misst man eine Plastikcuvette (Sarstedt Ref. 67742) mit 1 ml Ethanol als Leerwert.

Zu Beginn der Messung wird die ABTS-Lösung mit Ethanol solange verdünnt, bis sie im Photometer einen Messwert von 1,4 angibt (üblicherweise 1 ml ABTS 14 mM und 30 bis 40 ml Ethanol). Die tatsächliche Absorption der Lösung wird aufgrund der Tendenz zum spontanen Zerfall alle 5 Messungen gemessen und aufgezeichnet.

Die TROLOX-Eichreihe und die Probenreihen werden nun in Plastikcuvetten gegeben, jeweils 500 µl. Der zu messenden Probe werden unmittelbar vor der jeweiligen Messung 500 µl ABTS-Lösung hinzugefügt. Die Lösungen werden kurz gemischt und möglichst rasch die Messung im Photometer gestartet.

Die Messung läuft 3 Minuten bei 734 nm. Der nach drei Minuten erreichte Wert gilt im vorliegenden Fall als Ergebnis der Messung. Für den Versuch wurden die folgenden Mengen und Konzentrationen verwendet:

Verdünnungsreihe TROLOX (50 µM): 2µl Stock (10 mM) + 1 ml Ethanol:

0 µM	=0 µl Trolox (50 µM)	+500 µl Ethanol	+500 µl ABTS Lsg.
2,5 µM	=50 µl Trolox (50 µM)	+450 µl Ethanol	+500 µl ABTS Lsg.
5 µM	=100 µl Trolox (50 µM)	+400 µl Ethanol	+500 µl ABTS Lsg.
10 µM	=200 µl Trolox (50 µM)	+300 µl Ethanol	+500 µl ABTS Lsg.
15 µM	=300 µl Trolox (50 µM)	+200 µl Ethanol	+500 µl ABTS Lsg.
25 µM	=500 µl Trolox (50 µM)	+0 µl Ethanol	+500 µl ABTS Lsg.

Verdünnungsreihe Flavonoid (200 µM): 2µl Stock (100 mM) + 1ml Ethanol:

0 µM	=0µl Flavonoid (200 µM)	+500 µl Ethanol	+500 µl ABTS Lsg.
2,5 µM	=12,5µl Flavonoid (200µM)	+487,5 µl Ethanol	+500 µl ABTS Lsg.
5 µM	=25 µl Flavonoid (200 µM)	+475 µl Ethanol	+500 µl ABTS Lsg.
10 µM	=50 µl Flavonoid (200 µM)	+450 µl Ethanol	+500 µl ABTS Lsg.
15 µM	=75 µl Flavonoid (200 µM)	+425 µl Ethanol	+500 µl ABTS Lsg.
25 µM	=125 µl Flavonoid (200 µM)	+375 µl Ethanol	+500 µl ABTS Lsg.

5.3 Methode für die Untersuchung der Stressresistenz von N 2:

5.3.1 Oxidativer Stress durch H₂O₂:

Mithilfe der Substanz Sytox Green besteht die Möglichkeit Gewebsschäden in *C. elegans* sichtbar zu machen (Gill *et al.*, 2003).

Sytox Green ist ein Farbstoff, der im Kontakt mit DNA fluoresziert, jedoch nicht membrangängig ist. Folglich beginnen Würmer in einer Lösung mit dieser Substanz zu fluoreszieren, wenn ihre Membranintegrität zerstört wird, wobei das Ausmaß der Fluoreszenz mit der Anzahl der geschädigten Zellen zunimmt (Produktinformation von Molecular Probes Inc. URL: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07020.pdf> [Stand: 25.11.2010]).

Auf dieser Grundlage basiert der Sytox-Assay, der den Einfluss der Flavonoide Quercetin, Kaempferol, Rutin und Fisetin auf *C. elegans* unter letalem oxidativen Stress messen soll. Als Noxe dient hierbei H₂O₂, das im Unterschied zu Juglone durch die Reaktion mit Wassermolekülen auch im Medium freie Radikale erzeugen kann.

Zu Beginn wird eine gut bewachsene NGM-Agarplatte mit *C. elegans* Würmern vom Stamm N 2 semisynchronisiert und das Bleichprodukt abermals auf eine NGM-Platte übertragen. Die Platte wird 3 Tage bei 20 °C gelagert.

Die 3 Tage alten Würmer werden in Petrischalen (35 × 10 mm) mit Flüssigmedium überführt. Diese enthalten jeweils 100 µM Flavonoid, 50 µM Streptomycin gegen bakterielle Kontamination und Streptomycin resistente OP-50-1 Bakterien als Nahrung. Darin werden sie für 24 Stunden bei 20 °C inkubiert.

Die 4 Tage alten Würmer werden für 60 Min in NGM-Medium übertragen, um sie von Bakterien und Flavonoidresten zu reinigen. Hiermit soll eine Beeinflussung der Fluoreszenzmessung durch Reste des Mediums und der Testsubstanzen verhindert werden. In eine 384-Well-Platte (Greiner 788096) werden in alle zu untersuchenden Wells 10 µl PBST und Sytox Green (2 µM) blasenfrei pipettiert. Danach werden die behandelten und gereinigten adulten Würmer mit dem Wurmpieker in die Wells übertragen.

Anschließend wird in jedes Well 10 µl PBST mit H₂O₂ (40 mM) hinzugegeben. Es gilt zu beachten, dass sich die Konzentrationen von Sytox Green und H₂O₂ an diesem Punkt durch Verdünnung jeweils halbieren. Die Endkonzentrationen betragen 1µM Sytox Green und 20 mM H₂O₂. In vier Wells je Behandlungsgruppe werden 10 µl PBST ohne H₂O₂ gegeben. Diese bilden eine Kontrollgruppe.

Die Platte wird nun mit einer lichtundurchlässigen, schwarzen Abdeckfolie (EasySeal 676001) luftdicht verschlossen.

Die Messung der Fluoreszenzentwicklung erfolgt automatisiert mit den in Tabelle 5.4.2 aufgeführten Parameter im Fluoreszenzspektrophotometer (Wallac Victor² 1420 Multible Counter). Bei konstanter Raumtemperatur erfolgt ein Messdurchgang alle 15 Min, über insgesamt 705 Min und eine abschließende Messung nach 18 Stunden.

Nach 18 Stunden wird die Abdeckfolie entfernt und der Zustand der Würmer von Hand im Fluoreszenzmikroskop (Axiolab) kontrolliert. Dabei werden alle Wells auf eventuelle Störfaktoren untersucht, um die Gültigkeit der Messung zu beurteilen. Wells mit Fremdkörpern, deutlicher Blasenbildung oder fehlendem Wurm werden von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

Ein Wurm wird als tot gewertet, sobald die Fluoreszenz einen *cut-off*-Wert erreicht. Dieser entspricht dem Mittelwert der drei ersten Messungen eines Wells, multipliziert mit dem Faktor 1,5. Dabei handelt es sich um einen fiktiven Todeszeitpunkt.

Vortest und Vergleiche zwischen manuellen und automatischen Testverfahren sowie die Kontrolle von Hand nach 18 Stunden zeigen, dass diese fiktiven Zeitpunkte in guter Relation zu den tatsächlichen Todeszeitpunkten liegen.

Jedes Well enthält je 10µl der folgenden Lösungen:

- 960 µl PBST + 40 µl Sytox Green (50 µM)
- 996 µl PBST + 4 µl H₂O₂ (10 M)

Name of the plate type 384-well Greiner #788096	Name of the labelSYTOX Green
Number of wells in the plate 16 X 24	Label technologyPrompt fluorometry
Height of the plate 7,5 mm	CW-lamp filter name F485
Offset of the wells 9.150 mm, 12.037 mm	CW-lamp filter slot A5
Distance between wells 4.493 mm, 4.498 mm	Emission filter name F535
Number of repeats 47	Emission filter slot A5
Delay between repeats 900 s	Measurement time 0.2 s
Measurement height 4.00 mm	Emission aperture Normal
Protocol notes	CW-lamp energy 40000
	Second measurement CW-lamp energy . 0
	Emission side Below
	CW-Lamp Control Stabilized Energy
	Excitation Aperture N/A

Abb. 13: Dargestellt ist das Messprotokoll für das Fluoreszenzspektr-photometer Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter [Perkin Elmer]. Die Angaben sind auf die 384-Well-Platte (Greiner 788096) angepasst. Es erfolgen 47 Messungen, ein Durchgang alle 15 Minuten, mit einer Messzeit von 0,2 Sekunden.

5.3.2 Oxidativer Stress durch Juglone:

Mithilfe der Substanz Juglone (5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone), die in Walnüssen vorkommt, können freie Sauerstoffradikale erzeugt werden, indem die Substanz mit zelleigenen Systemen reagiert. Es handelt sich um intrazellulären Stress (de Castro *et al.*, 2004). Um den Einfluss der Flavonoide auf intrazellulären oxidativen Stress zu untersuchen, lässt sich dieser Umstand nutzen.

Für die Resistenztestung unter intrazellulären oxidativen Stress wird eine gut bewachsene NGM-Agarplatte mit *C. elegans* Würmern vom Stamm N 2 semisynchronisiert.

Das Bleichprodukt wird direkt in Flüssigkultur mit 100 µM der jeweiligen Flavonoide übertragen. Die folgenden 3 Tage wachsen die Nematoden in den Petrischalen (35 × 10 mm), unter ständiger Inkubation mit den Flavonoiden, heran.

Das Medium der Kontrollgruppe enthält nur das Lösemittel DMSO in gleicher Konzentration wie die Behandlungsgruppen.

Nach 3 Tagen werden die Würmer der verschiedenen Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe in flüssiges NGM mit verschiedenen Konzentrationen der Substanz Juglone (50; 150; 200 µM) übertragen.

Für jede Flavonoidbehandlung und die DMSO-Kontrollgruppe wird eine Kontrollgruppe ohne Juglone mitgeführt. Diese dient nicht der statistischen Auswertung, sondern soll auf eventuelle Störgrößen aufmerksam machen. Es ist zu erwarten, dass in dieser Störgrößenkontrolle 100 % der Modellorganismen die Versuchszeit überleben.

Die Überlebenskontrolle der Würmer erfolgt mittels *touch-provoked-movement*-Test. Das heißt, regungslose Tiere gelten als tot, wenn sie trotz mehrmaliger Berührung mit dem Wurmpieker keine Eigenbewegung zeigen. Tote Würmer werden aus dem Medium entnommen, um den Arbeitsaufwand in folgenden Kontrollen zu reduzieren. Die Kontrolle erfolgt nach 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 24 Stunden.

Das Flüssigmedium wird wie folgt zusammengestellt:

1,995 ml NGM + 2 µl OP-50-Lsg.

Zusätzlich je nach Behandlungsgruppe:

- + 2 µl Quercetin (100 mM) in DMSO
- + 2 µl Kaempferol (100 mM) in DMSO
- + 2 µl Rutin (100 mM) in DMSO
- + 2 µl Fisetin (100 mM) in DMSO
- + 2 µl DMSO Lösungsmittelkontrolle

Das Behandlungsmedium wird wie folgt zusammengestellt:

2 ml NGM-komplett + 2 µl OP-50-Lsg.

Zusätzlich je Behandlungsgruppe Quercetin, Kaempferol, Rutin, Fisetin und der DMSO Kontrolle eine Petrischale mit jeder Juglone Konzentration:

- + 10 µl Juglone Stock (10 mM), entspricht 50 mM
- + 20 µl Juglone Stock (10 mM), entspricht 100 mM
- + 30 µl Juglone Stock (10 mM), entspricht 150 mM
- + 40 µl Juglone Stock (10 mM), entspricht 200 mM
- + 0 µl Juglone Stock (10 mM), als Kontrollgruppe

5.4 Untersuchung der Lebensspanne von N 2:

Die Lebenserwartung eines *C. elegans* ist mit durchschnittlich 21 Tagen relativ kurz. Daher lässt sich im experimentellen Rahmen die gesamte Zeitspanne vom Schlüpfen bis zum Sterben verfolgen. Der Einfluss der Flavonoide Quercetin, Kaempferol, Rutin und Fisetin auf die Lebensspanne wird in Flüssigkultur bestimmt.

Zu Beginn wird eine bewachsene NGM-Agarplatte mit *C. elegans* Würmern vom Stamm N 2 semisynchronisiert und das Bleichprodukt abermals auf eine NGM-Platte übertragen.

Nach 3 Tagen sind die Würmer über die Larvenstadien hinaus gewachsen. Nun können sie nicht mehr in das Dauerstadium wechseln, da dies ein alternatives L 2-Larvenstadium ist.

Die 3 Tage alten Würmer werden nun in eine Petrischale mit Flüssigmedium überführt. Diese enthält jeweils 100 μ M Flavonoid, 50 μ M Streptomycin gegen bakterielle Kontamination und Streptomycin Resistente OP-50-1-Bakterien als Nahrung.

Der Zustand der Nematoden wird täglich überprüft. Dazu werden alle Tiere einer Behandlungsgruppe in eine Petrischale mit reinem NGM-Medium gegeben. Im Stereomikroskop (Stemi 2000-C) erfolgt die Kontrolle mittels *touch-provoked-movement*-Test (Gill et al., 2003). Das heißt, regungslose Tiere gelten als tot, wenn sie trotz mehrmaliger Berührung mit dem Wurmpieker keine Eigenbewegung zeigen.

Zudem wird jeder Wurm auf Larven untersucht, die bereits im Muttertier geschlüpft sind, bevor das Ei abgelegt wurde, sogenannte *Bagged-worms*. *Bagged-worms* führen unweigerlich zum Tod des Muttertiers und eventuell zur Vermischung der Generationen. Daher werden diese Tiere vorzeitig als tot gewertet und nicht mehr in das flavonoidhaltige Medium umgesetzt.

Alle lebenden Tiere ohne *Bagged-worms* werden in ein frisches NGM-Medium mit OP-50-Bakterien und dem jeweiligen Flavonoid überführt. Würmer, die nicht mehr auffindbar sind oder durch aktives Verschulden des Versuchers versterben, gelten als *lost*. Dieser Vorgang wiederholt sich täglich bis auch der letzte Wurm verstirbt.

Das Flüssigmedium wird wie folgt zusammengestellt:

1,995 ml NGM-Medium + 2 μ l OP-50-1 Lsg. + 1 μ l Steptomycin (100 mM)

Zusätzlich je nach Behandlungsgruppe:

- + 2 μ l Quercetin (100 mM) in DMSO
- + 2 μ l Kaempferol (100 mM) in DMSO
- + 2 μ l Rutin (100 mM) in DMSO
- + 2 μ l Fisetin (100 mM) in DMSO
- + 2 μ l DMSO Lösungsmittelkontrolle

5.5 Untersuchung der DAF-16 Lokalisation in TJ 356:

Der genmanipulierte *C. elegans* Stamm TJ 356 exprimiert ein DAF-16::GFP-Fusionsprotein (Henderson & Johnson, 2001). Die gentragenden Exemplare sind „Roller“. Der Einbau des Fusionsprotein-Gens erzeugt eine Entwicklungsstörung in der Muskulatur. Durch diese Störung sind die Tiere nur noch zu kreisförmigen Bewegungen fähig, an denen sie leicht zu erkennen sind. Das GFP leuchtet im Fluoreszenzmikroskop in den Zellen der Nematoden (Chalfie *et al.*, 1994; Chalfie, 2009).

Das Fluoreszenzmuster verändert sich je nach Lokalisation des Transkriptionsfaktors. Untersucht wurde der Einfluss von Stressoren und der Flavonoide Quercetin, Kaempferol, Rutin und Fisetin auf die Lokalisation von DAF-16.

Zur Vorbereitung der Versuche wird eine gut bewachsene NGM-Agarplatte mit *C. elegans* Würmern vom Stamm TJ 356 semisynchronisiert und das Bleichprodukt direkt in Flüssigkultur mit 100 μ M der jeweiligen Flavonoide übertragen.

Die folgenden 3 Tage wachsen die Nematoden in den Petrischalen unter ständigem Kontakt mit den Flavonoiden.

Das Flüssigmedium wird wie folgt zusammengestellt:

1,996 ml flüssiges NGM + 2 µl OP-50-Lsg.

Zusätzlich je nach Behandlungsgruppe:

- + 2 µl Quercetin (100 mM) in DMSO
- + 2 µl Kaempferol (100 mM) in DMSO
- + 2 µl Rutin (100 mM) in DMSO
- + 2 µl Fisetin (100 mM) in DMSO
- + 2 µl DMSO Lösungsmittelkontrolle

Bei der Untersuchung der DAF-16 Lokalisation nach oxidativem und thermalem Stress werden die Nematoden nach oben genanntem Prozedere angezchtet. Alle Versuchstiere entstammen der Lösemittelkontrolle und wurden folglich mit DMSO behandelt

Unmittelbar vor der Beurteilung wurden die Tiere wie folgt behandelt:

- 1) Die Petrischale der Behandlungsgruppe thermaler Stress wird vor dem Mikroskopieren für 2 Stunden in den Brutschrank bei 37 °C gestellt.
- 2) Die Behandlungsgruppe oxidativer Stress wird für 1 Stunde einer Konzentration von 150 µM Juglone ausgesetzt. Dafür werden dem Medium 60 µl Juglone Stock (10 mM) hinzugegeben.
- 3) Die Kontrollgruppe wird nicht weiter behandelt.
- 4) Die Gruppen nach Flavonoidbehandlung werden nicht weiter behandelt.

Zur Beurteilung im Fluoreszenzmikroskop (Axiolab) werden die Würmer auf Objektträger mit Pads aus 5 % Agarose übertragen und mit 20 % Natriumazid betäubt (siehe 5.1.5).

Die Objektträger können mit jeweils 50 Wümmern bestückt werden, da die anschließende Beurteilung relativ rasch geht. Die Versuchsdurchführung sollte zügig durchgeführt und die Objektträger etappenweise bestückt werden, damit der Einfluss von äußeren Faktoren wie Dauer von Narkose und aufliegendem Deckglas, das Verdunsten der Flüssigkeit und ähnliche Störgrößen einen möglichst geringen Einfluss haben. Die Würmer werden bei 100-facher Vergrößerung betrachtet und in drei Kategorien unterteilt. Abhängig davon, wo sich die Fluoreszenz konzentriert. Beispielhaft sind diese in Abbildung 14 a bis c dargestellt.

- 1) Nukleär: Die Kerne der Tiere sind deutlich erkennbar, die Fluoreszenz ist deutlich stärker im Nukleus als im umgebenden Zytosol. In der Extremform wirkt das Zytosol klar und dunkel. (Der größte Teil der DAF-16::GFP-Fusionsproteine ist nukleär lokalisiert.).
- 2) Intermediär: Die Kerne heben sich nur schwach vom umgebenden, stark fluoreszierenden Zytosol ab oder die Kerne heben sich in maximal einem Drittel des Nematoden deutlich vom Zytosol ab. (Die DAF-16::GFP-Fusionsproteine

befinden sich teils zytosolisch, teils nukleär lokalisiert, ohne ein deutliches Übergewicht zu einer Seite zu erreichen.)

- 3) Zytosolisch: Der gesamte Wurm fluoresziert homogen. Kerne sind darin nicht auszumachen. (Der größte Teil der DAF-16::GFP-Fusionsproteine ist zytosolisch lokalisiert.)



Abb. 14 a: TJ 356 mit DAF-16 in zytosolischer Lokalisation.

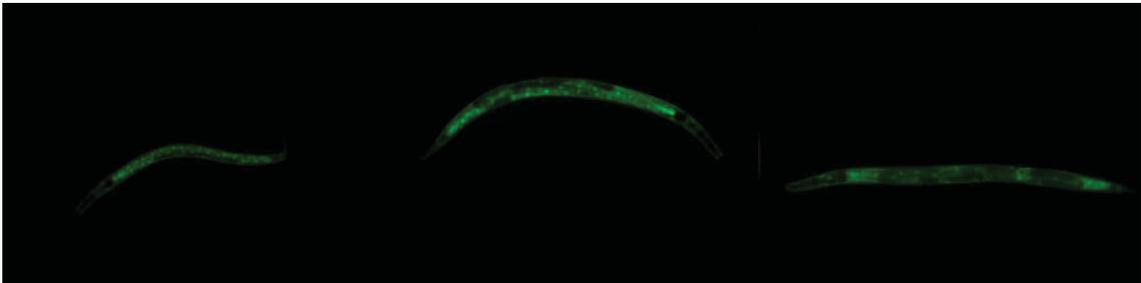


Abb. 14 b: TJ 356 mit DAF-16 in intermediärer Lokalisation.



Abb. 14 c: TJ 356 mit DAF-16 in intermediärer Lokalisation.

5.6 Untersuchung der SOD-3 Induktion in CF 1553:

Der genmanipulierte *C. elegans* Stamm CF 1553 produziert ein SOD-3::GFP-Fusionsprotein (Libina *et al.*, 2003). Das verleiht dem Protein eine Fluoreszenz im UV-Mikroskop (Chalfie *et al.*, 1994). Durch die quantitative Auswertung dieser Fluoreszenz lässt sich das Ausmaß der SOD-Produktion direkt messen. Ziel ist es, die Beeinflussung der SOD-3::GFP-Expression durch die Flavonoide Quercetin, Kaempferol, Rutin und Fisetin, falls vorhanden, nachzuweisen.

Im ersten Schritt wird eine mit CF 1553 Würmern bewachsene NGM-Agarplatte semisynchronisiert. Das Bleichprodukt wird in Flüssigkulturen überführt.

Das flüssige Medium wird wie folgt zusammengestellt:

3,992 ml NGM + 4 µl OP-50-Lsg.

Zusätzlich je nach Behandlungsgruppe:

- + 4 µl Quercetin (100 mM) in DMSO
- + 4 µl Kaempferol (100 mM) in DMSO
- + 4 µl Rutin (100 mM) in DMSO
- + 4 µl Fisetin (100 mM) in DMSO
- + 4 µl DMSO Lösungsmittelkontrolle

In den folgenden 3 Tagen wachsen die Würmer bei einer konstanten Temperatur von 20 °C heran.

Bei der Messung der Induktion durch oxidativen und thermalen Stress entstammen alle Tiere der Lösemittelkontrolle und werden folglich mit DMSO behandelt. Unmittelbar vor der Messung werden die Tiere wie folgt weiterbehandelt:

- 1) Die Petrischale der Behandlungsgruppe thermaler Stress wird vor dem Mikroskopieren für 2 Stunden in den Brutschrank bei 37 °C gestellt.
- 2) Die Behandlungsgruppe oxidativer Stress wird für 1 Stunde einer Konzentration von 150 µM Juglone ausgesetzt. Dafür werden dem Medium 60 µl Juglone Stock (10 mM) hinzugegeben.
- 3) Die Kontrollgruppe wird nicht weiterbehandelt.

Zur Fluoreszenzbestimmung werden alle Würmer gleich weiterbehandelt. Die 3 Tage alten Nematoden werden für die Fluoreszenzmikroskopie (Axiolab) auf Objektträger mit Pads aus 5 % Agarose übertragen und mit 20 % Natriumazid betäubt (siehe Abschnitt 5.1.5).

Es empfiehlt sich, nicht mehr als 25 Würmer unter jedes Deckglas zu legen, weil die Fluoreszenzen der dicht beieinander liegenden Würmer einander überschneiden und diese dann nicht auswertbar sind.

Die Würmer werden mithilfe einer Kamera (Cool Snap CF Digital Monochrome Camera) und des Computerprogramms Image Pro Plus Version 4.5 einzeln auf 100-facher Vergrößerung und einer Belichtung von 2 Sekunden im Bildzentrum scharf gestellt und fotografiert. Entscheidend ist hier das Computerbild, das gering vom Blick durch die Okulare abweichen kann.

Die Bilder werden gespeichert und ins Graustufen TIFF-Format konvertiert.

Die konvertierten Bilder eignen sich für eine densitometrische Auswertung mit dem Programm TINA 2.0. Hierbei wird die Fluoreszenz des gesamten Wurms gemessen, wobei die Fluoreszenz pro Fläche verwendet wird. Für die Backgroundbestimmung wird am linken Bildschirmrand jeder Aufnahme eine leere rechteckige Fläche markiert, deren Intensität pro Fläche vom eigentlichen Messwert subtrahiert wird. Der Background wird für jedes Bild einzeln neu bestimmt.

6 Quellenverzeichnis:

Aalinkeel R, Bindukumar B, Reynolds JL, Sykes DE, Mahajan SD, Chadha KC, Schwartz SA. **The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90.** *Prostate*. 2008 Dec 1;68(16):1773-89.

Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM. **Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 beta-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes.** *Free Radic Biol Med*. 2002 Oct 15;33(8):1097-105.

Agullo G, Gamet L, Besson C, Demigné C, Rémésy C. **Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and Caco-2 cells.** *Cancer Lett*. 1994 Nov 25;87(1):55-63.

Arts IC. **A review of the epidemiological evidence on tea, flavonoids, and lung cancer.** *J Nutr*. 2008 Aug;138(8):1561S-1566S.

Arts IC, Hollman PC. **Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies.** *Am J Clin Nutr*. 2005 Jan;81(1 Suppl):317S-325S.

Ashrafi K. **Obesity and the regulation of fat metabolism.** *WormBook*. 2007 Mar 9:1-20.

Astin J, Merry A, Rajan J, Kuwabara PE. **Caenorhabditis elegans functional genomics: omic resonance.** *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2004 Apr;3(1):26-34.

Atanassova M, Bagdassarian V. **Rutin content in plant products.** *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, May 2009, 44,2,: 201-203.

Badía E, Sacanella E, Fernández-Solá J, Nicolás JM, Antúnez E, Rotilio D, de Gaetano G, Urbano-Márquez A, Estruch R. **Decreased tumor necrosis factor-induced adhesion of human monocytes to endothelial cells after moderate alcohol consumption.** *Am J Clin Nutr*. 2004 Jul;80(1):225-30.

Bando N, Wakamatsu S, Terao J. **Effect of an excessive intake of quercetin on the vitamin E level and antioxidative enzyme activities of mouse liver under paraquat-induced oxidative stress.** *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007 Oct;71(10):2569-72. Epub 2007 Oct 7.

Beckman KB, Ames BN. **The free radical theory of aging matures.** *Physiol Rev*. 1998 Apr;78(2):547-81.

Berdichevsky A, Viswanathan M, Horvitz HR, Guarente L. **C. elegans SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span.** *Cell*. 2006 Jun 16;125(6):1165-77.

Bobe G, Sansbury LB, Albert PS, Cross AJ, Kahle L, Ashby J, Slattery ML, Caan B, Paskett E, Iber F, Kikendall JW, Lance P, Daston C, Marshall JR, Schatzkin A, Lanza E. **Dietary flavonoids and colorectal adenoma recurrence in the Polyp Prevention Trial.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Jun;17(6):1344-53.

Brenner S. **In the beginning was the worm ...** *Genetics*. 2009 Jun;182(2):413-5.

Brenner S. **The genetics of Caenorhabditis elegans.** *Genetics*. 1974 May;77(1):71-94.

C. elegans Sequencing Consortium. **Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology.** *Science*. 1998 Dec 11;282(5396):2012-8.

- Chalfie M. **GFP: lighting up life (Nobel Lecture).** *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(31):5603-11.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** *Science.* 1994 Feb 11;263(5148):802-5.
- Chase DL, Koelle MR. **Biogenic amine neurotransmitters in C. elegans.** *WormBook.* 2007 Feb 20:1-15.
- Chen X, Zhou H, Liu YB, Wang JF, Li H, Ung CY, Han LY, Cao ZW, Chen YZ. **Database of traditional Chinese medicine and its application to studies of mechanism and to prescription validation.** *Br J Pharmacol.* 2006 Dec;149(8):1092-103. Epub 2006 Nov 6.
- Chisolm GM, Steinberg D. **The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview.** *Free Radic Biol Med.* 2000 Jun 15;28(12):1815-26.
- Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. **Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas.** *Pharmacol Res.* 2005 Feb;51(2):117-23.
- Crespo I, García-Mediavilla MV, Almar M, González P, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, González-Gallego J. **Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in Chang Liver cells.** *Food Chem Toxicol.* 2008 May;46(5):1555-69. Epub 2007 Dec 23.
- Cypser JR, Tedesco P, Johnson TE. **Hormesis and aging in Caenorhabditis elegans.** *Exp Gerontol.* 2006 Oct;41(10):935-9. Epub 2006 Oct 24.
- Dajas F, Rivera-Megret F, Blasina F, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Costa G, Echeverry C, Lafon L, Heizen H, Ferreira M, Morquío A. **Neuroprotection by flavonoids.** *Braz J Med Biol Res.* 2003 Dec;36(12):1613-20. Epub 2003 Nov 17.
- de Castro E, Hegi de Castro S, Johnson TE. **Isolation of long-lived mutants in Caenorhabditis elegans using selection for resistance to juglone.** *Free Radic Biol Med.* 2004 Jul 15;37(2):139-45.
- De Stefano D, Maiuri MC, Simeon V, Grassia G, Soscia A, Cinelli MP, Carnuccio R. **Lycopene, quercetin and tyrosol prevent macrophage activation induced by gliadin and IFN-gamma.** *Eur J Pharmacol.* 2007 Jul 2;566(1-3):192-9. Epub 2007 Apr 6.
- Dröge W. **Free radicals in the physiological control of cell function.** *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95.
- Erdman JW Jr, Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, Harnly J, Hollman P, Keen CL, Mazza G, Messina M, Scalbert A, Vita J, Williamson G, Burrowes J. **Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC.** *J Nutr.* 2007 Mar;137(3 Suppl 1):718S-737S.
- Erlund I, Koli R, Alfthan G, Marniemi J, Puukka P, Mustonen P, Mattila P, Jula A. **Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol.** *Am J Clin Nutr.* 2008 Feb;87(2):323-31.
- Farombi EO. **Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: protective role of free radical scavengers.** *Cell Biol Toxicol.* 2006 May;22(3):159-67.

- Fernandez ML, Volek JS. **Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation.** *Nutr Metab (Lond)*. 2006 Mar 27;3:17.
- Finkel T, Holbrook NJ. **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.** *Nature*. 2000 Nov 9;408(6809):239-47.
- Fiorani M, Accorsi A. **Dietary flavonoids as intracellular substrates for an erythrocyte trans-plasma membrane oxidoreductase activity.** *The British journal of nutrition*. 2005 94 (3): 338-345.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
- Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MP. **New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols.** *Med Res Rev*. 2006 Nov;26(6):747-66.
- Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M. **Effects of antioxidant supplementation on the aging process.** *Clin Interv Aging*. 2007;2(3):377-87.
- García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, González-Gallego J. **The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells.** *Eur J Pharmacol*. 2007 Feb 28;557(2-3):221-9. Epub 2006 Nov 15.
- Gill MS. **Endocrine targets for pharmacological intervention in aging in *Caenorhabditis elegans*.** *Aging Cell*. 2006 Feb;5(1):23-30.
- Gill MS, Olsen A, Sampayo JN, Lithgow GJ. **An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*.** *Free Radic Biol Med*. 2003 Sep 15;35(6):558-65.
- Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. **Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2).** *J Nutr*. 2006 Nov;136(11):2715-21.
- Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. **Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages.** *Mediators Inflamm*. 2007;2007:45673.
- Hamer M, Steptoe A. **Influence of specific nutrients on progression of atherosclerosis, vascular function, haemostasis and inflammation in coronary heart disease patients: a systematic review.** *Br J Nutr*. 2006 May;95(5):849-59.
- Hanneken A, Lin FF, Johnson J, Maher P. **Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death.** *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Jul;47(7):3164-77.
- Hara M, Han M. **Ras farnesyltransferase inhibitors suppress the phenotype resulting from an activated ras mutation in *Caenorhabditis elegans*.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 11;92(8):3333-7.

- Harman D. **Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.** *J Gerontol.* 1956 Jul;11(3):298-300.
- Harman D. **Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span.** *Ann N Y Acad Sci.* 2006 May;1067:10-21.
- Harris ED. **Regulation of antioxidant enzymes.** *FASEB J.* 1992 Jun;6(9):2675-83.
- Hassan HM, Fridovich I. **Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in Escherichia coli. Induction by methyl viologen.** *J Biol Chem.* 1977 Nov 10;252(21):7667-72.
- Henderson ST, Bonafè M, Johnson TE. **daf-16 protects the nematode Caenorhabditis elegans during food deprivation.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2006 May;61(5):444-60.
- Henderson ST, Johnson TE. **daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode Caenorhabditis elegans.** *Curr Biol.* 2001 Dec 11;11(24):1975-80.
- 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 Apr;6(4):577-88.
- Higa S, Hirano T, Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, Suemura M, Kawase I, Tanaka T. **Fisetin, a flavonol, inhibits TH2-type cytokine production by activated human basophils.** *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jun;111(6):1299-306.
- Hollman PC, Katan MB. **Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability.** *Food Chem Toxicol.* 1999 Sep-Oct;37(9-10):937-42.
- Hu PJ. **Dauer.** *WormBook.* 2007 Aug 8:1-19.
- Imamura Y, Noda S, Hashizume K, Shinoda K, Yamaguchi M, Uchiyama S, Shimizu T, Mizushima Y, Shirasawa T, Tsubota K. **Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 25;103(30):11282-7. Epub 2006 Jul 14.
- Kaiserová H, Simůnek T, van der Vijgh WJ, Bast A, Kvasnicková E. **Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase.** *Biochim Biophys Acta.* 2007 Sep;1772(9):1065-74. Epub 2007 May 21.
- Kaletta T, Hengartner MO. **Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism.** *Nat Rev Drug Discov.* 2006 May;5(5):387-98.
- Kampkötter A, Gombitang Nkwonkam C, Zurawski RF, Timpel C, Chovolou Y, Wätjen W, Kahl R. **Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism Caenorhabditis elegans.** *Arch Toxicol.* 2007 Dec;81(12):849-58. Epub 2007 Jun 6. (a)
- 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 May 5;234(1-2):113-23. Epub 2007 Feb 21. (b)

- Kampkötter A, Pielarski T, Rohrig R, Timpel C, Chovolou Y, Wätjen W, Kahl R. **The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in Caenorhabditis elegans.** *Pharmacol Res.* 2007 Feb;55(2):139-47. Epub 2006 Nov 26.
- 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 Feb;149(2):314-23. Epub 2007 Oct 16. (c)
- 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 Jul 1;18(13):3604-15.
- Keaney M, Matthijssens F, Sharpe M, Vanfleteren J, Gems D. **Superoxid dismutase mimetics elevate superoxid dismutase activity in vivo but do not retard aging in the nematode Caenorhabditis elegans.** *Free Radic Biol Med.* 2004 Jul 15;37(2):239-50.
- Kenyon C. **The plasticity of aging: insights from long-lived mutants.** *Cell.* 2005 Feb 25;120(4):449-60.
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. **Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms.** *J Pharmacol Sci.* 2004 Nov;96(3):229-45. Epub 2004 Nov 12.
- 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 Sep;76(3):560-8.
- Kong CS, Kim YA, Kim MM, Park JS, Kim JA, Kim SK, Lee BJ, Nam TJ, Seo Y. **Flavonoid glycosides isolated from Salicornia herbacea inhibit matrix metalloproteinase in HT1080 cells.** *Toxicol In Vitro.* 2008 Oct;22(7):1742-8. Epub 2008 Jul 31.
- Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T. **Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages.** *Pharmacol Rep.* 2005 May-Jun;57(3):390-4.
- Lai CH, Chou CY, Ch'ang LY, Liu CS, Lin W. **Identification of novel human genes evolutionarily conserved in Caenorhabditis elegans by comparative proteomics.** *Genome Res.* 2000 May;10(5):703-13.
- Lambert JD, Sang S, Yang CS. **N-Acetylcysteine enhances the lung cancer inhibitory effect of epigallocatechin-3-gallate and forms a new adduct.** *Free Radic Biol Med.* 2008 Mar 15;44(6):1069-74. Epub 2007 Dec 23.
- Le Bars PL, Kieser M, Itil KZ. **A 26-week analysis of a double-blind, placebo-controlled trial of the ginkgo biloba extract EGb 761 in dementia.** *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2000 Jul-Aug;11(4):230-7.
- Li J, Tewari M, Vidal M, Lee SS. **The 14-3-3 protein FTT-2 regulates DAF-16 in Caenorhabditis elegans.** *Dev Biol.* 2007 Jan 1;301(1):82-91. Epub 2006 Oct 14.
- Lian Z, Di Cristofano A. **Class reunion: PTEN joins the nuclear crew.** *Oncogene.* 2005 Nov 14;24(50):7394-400.
- Libina N, Berman JR, Kenyon C. **Tissue-specific activities of C. elegans DAF-16 in the regulation of lifespan.** *Cell.* 2003 Nov 14;115(4):489-502.

- Lithgow GJ, White TM, Melov S, Johnson TE. **Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 1;92(16):7540-4.
- Loeb LA, Wallace DC, Martin GM. **The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 27;102(52):18769-70. Epub 2005 Dec 19.
- López-López G, Moreno L, Cogolludo A, Galisteo M, Ibarra M, Duarte J, Lodi F, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. **Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle.** *Mol Pharmacol*. 2004 Apr;65(4):851-9.
- López-Sánchez C, Martín-Romero FJ, Sun F, Luis L, Samhan-Arias AK, García-Martínez V, Gutiérrez-Merino C. **Blood micromolar concentrations of kaempferol afford protection against ischemia/reperfusion-induced damage in rat brain.** *Brain Res*. 2007 Nov 28;1182:123-37. Epub 2007 Sep 21.
- Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, Burdick A, Curry KJ, Buford JP, Khan I, Netzer WJ, Xu H, Butko P. **Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep 17;99(19):12197-202. Epub 2002 Sep 4.
- Mahakunakorn P, Tohda M, Murakami Y, Watanabe H, Matsumoto K. **Effects of Choto-san and its related constituents on endogenous antioxidant systems.** *Biol Pharm Bull*. 2005 Jan;28(1):53-7.
- Makena PS, Chung KT. **Effects of various plant polyphenols on bladder carcinogen benzidine-induced mutagenicity.** *Food Chem Toxicol*. 2007 Oct;45(10):1899-909. Epub 2007 Apr 21.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** *Am J Clin Nutr*. 2004 May;79(5):727-47.
- Mandel S, Youdim MB. **Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases.** *Free Radic Biol Med*. 2004 Aug 1;37(3):304-17.
- Mandel SA, Avramovich-Tirosh Y, Reznichenko L, Zheng H, Weinreb O, Amit T, Youdim MB. **Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway.** *Neurosignals*. 2005;14(1-2):46-60.
- McCord JM, Keele BB Jr, Fridovich I. **An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 May;68(5):1024-7.
- Milde J, Elstner EF, Grassmann J. **Synergistic effects of phenolics and carotenoids on human low-density lipoprotein oxidation.** *Mol Nutr Food Res*. 2007 Aug;51(8):956-61.
- Miles EA, Zoubouli P, Calder PC. **Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures.** *Nutrition*. 2005 Mar;21(3):389-94.
- Miles EA, Zoubouli P, Calder PC. **Effects of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production.** *Clin Nutr*. 2005 Oct;24(5):780-4.

- Min YD, Choi CH, Bark H, Son HY, Park HH, Lee S, Park JW, Park EK, Shin HI, Kim SH. **Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line.** *Inflamm Res.* 2007 May;56(5):210-5.
- Mittal CK, Murad F. **Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Oct;74(10):4360-4.
- Moskaug JØ, Carlsen H, Myhrstad MC, Blomhoff R. **Polyphenols and glutathione synthesis regulation.** *Am J Clin Nutr.* 2005 Jan;81(1 Suppl):277S-283S.
- Mouria M, Gukovskaya AS, Jung Y, Buechler P, Hines OJ, Reber HA, Pandol SJ. **Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis.** *Int J Cancer.* 2002 Apr 10;98(5):761-9.
- Müller WE, Chatterjee SS. **Cognitive and other behavioral effects of EGb 761 in animal models.** *Pharmacopsychiatry.* 2003 Jun;36 Suppl 1:S24-31.
- Nair HK, Rao KV, Aalinkeel R, Mahajan S, Chawda R, Schwartz SA. **Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes.** *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004 Jan;11(1):63-9.
- Noroozi M, Angerson WJ, Lean ME. **Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes.** *Am J Clin Nutr.* 1998 Jun;67(6):1210-8.
- Oh SW, Mukhopadhyay A, Dixit BL, Raha T, Green MR, Tissenbaum HA. **Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation.** *Nat Genet.* 2006 Feb;38(2):251-7. Epub 2005 Dec 25. (a)
- 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 U S A.* 2005 Mar 22;102(12):4494-9. Epub 2005 Mar 14. (b)
- Oken BS, Storzbach DM, Kaye JA. **The efficacy of Ginkgo biloba on cognitive function in Alzheimer disease.** *Arch Neurol.* 1998 Nov;55(11):1409-15.
- Pearson DA, Holt RR, Rein D, Paglieroni T, Schmitz HH, Keen CL. **Flavanols and platelet reactivity.** *Clin Dev Immunol.* 2005 Mar;12(1):1-9.
- Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. **Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols.** *Free Radic Res.* 2006 Oct;40(10):1054-65.
- Pierce SB, Costa M, Wisotzkey R, Devadhar S, Homburger SA, Buchman AR, Ferguson KC, Heller J, Platt DM, Pasquinelli AA, Liu LX, Doberstein SK, Ruvkun G. **Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family.** *Genes Dev.* 2001 Mar 15;15(6):672-86.
- Pinkston JM, Garigan D, Hansen M, Kenyon C. **Mutations that increase the life span of *C. elegans* inhibit tumor growth.** *Science.* 2006 Aug 18;313(5789):971-5.
- Ramos S. **Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention.** *J Nutr Biochem.* 2007 Jul;18(7):427-42. Epub 2007 Feb 23.

- Renaud S, de Lorgeril M. **Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease.** *Lancet.* 1992 Jun 20;339(8808):1523-6.
- Rendig SV, Symons JD, Longhurst JC, Amsterdam EA. **Effects of red wine, alcohol, and quercetin on coronary resistance and conductance arteries.** *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001 Aug;38(2):219-27.
- Robaszkiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G. **Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells.** *Cell Biol Int.* 2007 Oct;31(10):1245-50. Epub 2007 May 10.
- Rogério AP, Kanashiro A, Fontanari C, da Silva EV, Lucisano-Valim YM, Soares EG, Faccioli LH. **Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma.** *Inflamm Res.* 2007 Oct;56(10):402-8.
- Röhrdanz E, Bittner A, Tran-Thi QH, Kahl R. **The effect of quercetin on the mRNA expression of different antioxidant enzymes in hepatoma cells.** *Arch Toxicol.* 2003 Sep;77(9):506-10. Epub 2003 May 20.
- Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. **Polyphenols, intracellular signalling and inflammation.** *Ann Ist Super Sanita.* 2007;43(4):394-405.
- Sato M, Maulik N, Das DK. **Cardioprotection with alcohol: role of both alcohol and polyphenolic antioxidants.** *Ann N Y Acad Sci.* 2002 May;957:122-35.
- Schaffitzel E, Hertweck M. **Recent aging research in *Caenorhabditis elegans*.** *Exp Gerontol.* 2006 Jun;41(6):557-63. Epub 2006 Apr 3.
- Sharma H, Sen S, Singh N. **Molecular pathways in the chemosensitization of cisplatin by quercetin in human head and neck cancer.** *Cancer Biol Ther.* 2005 Sep;4(9):949-55. Epub 2005 Sep 9.
- Sohal RS, Buchan PB. **Relationship between fluorescent age pigment, physiological age and physical activity in the housefly, *Musca domestica*.** *Mech Ageing Dev.* 1981 Mar;15(3):243-9.
- Song WO, Chun OK. **Tea is the major source of flavan-3-ol and flavonol in the U.S. diet.** *J Nutr.* 2008 Aug;138(8):1543S-1547S.
- Speakman JR, Selman C, McLaren JS, Harper EJ. **Living fast, dying when? The link between aging and energetics.** *J Nutr.* 2002 Jun;132(6 Suppl 2):1583S-97S.
- Spencer JP. **Flavonoids: modulators of brain function?** *Br J Nutr.* 2008 May;99 E Suppl 1:ES60-77.
- Strayer A, Wu Z, Christen Y, Link CD, Luo Y. **Expression of the small heat-shock protein Hsp16-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761.** *FASEB J.* 2003 Dec;17(15):2305-7. Epub 2003 Oct 2.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. **The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*.** *Dev Biol.* 1983 Nov;100(1):64-119.
- Syed DN, Suh Y, Afaq F, Mukhtar H. **Dietary agents for chemoprevention of prostate cancer.** *Cancer Lett.* 2008 Jul 8;265(2):167-76. Epub 2008 Apr 18.

- Tanigawa S, Fujii M, Hou DX. **Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells.** *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008 Mar;72(3):797-804. Epub 2008 Mar 7.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. **Reactive oxygen species in cell signaling.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Dec;279(6):L1005-28.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. **Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence.** *Mol Cell Biochem.* 2004 Nov;266(1-2):37-56.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84. Epub 2006 Aug 4.
- Vidavalur R, Otani H, Singal PK, Maulik N. **Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited.** *Exp Clin Cardiol.* 2006 Fall;11(3):217-25.
- Viswanathan M, Kim SK, Berdichevsky A, Guarente L. **A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining C. elegans life span.** *Dev Cell.* 2005 Nov;9(5):605-15.
- Watzl B, Rechkemmer G. **Basiswissen aktualisiert Flavonoide.** *Ernährungsumschau* 48 (2001) Heft 12: 498-502
- Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. **Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells.** *Eur J Cancer.* 1999 Oct;35(10):1517-25.
- Wang MC, Bohmann D, Jasper H. **JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling.** *Cell.* 2005 Apr 8;121(1):115-25.
- Watanabe CM, Wolfram S, Ader P, Rimbach G, Packer L, Maguire JJ, Schultz PG, Gohil K. **The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 5;98(12):6577-80. Epub 2001 May 29.
- Wätjen W, Michels G, Steffan B, Niering P, Chovolou Y, Kampkötter A, Tran-Thi QH, Proksch P, Kahl R. **Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis.** *J Nutr.* 2005 Mar;135(3):525-31.
- Winterbourn CC. **Superoxide as an intracellular radical sink.** *Free Radic Biol Med.* 1993 Jan;14(1):85-90.
- Wolff S, Ma H, Burch D, Maciel GA, Hunter T, Dillin A. **SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity.** *Cell.* 2006 Mar 10;124(5):1039-53.
- Woodman OL, Meeker WF, Boujaoude M. **Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones: structure-activity relationships.** *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005 Sep;46(3):302-9.
- Wu AH, Koh WP, Wang R, Lee HP, Yu MC. **Soy intake and breast cancer risk in Singapore Chinese Health Study.** *Br J Cancer.* 2008 Jul 8;99(1):196-200.
- Wu AH, Yu MC. **Tea, hormone-related cancers and endogenous hormone levels.** *Mol Nutr Food Res.* 2006 Feb;50(2):160-9.

Yang W, Li J, Hekimi S. **A Measurable increase in oxidative damage due to reduction in superoxide detoxification fails to shorten the life span of long-lived mitochondrial mutants of *Caenorhabditis elegans*.** *Genetics*. 2007 Dec;177(4):2063-74.

Yin D. **Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores.** *Free Radic Biol Med*. 1996;21(6):871-88.

Yu ES, Min HJ, An SY, Won HY, Hong JH, Hwang ES. **Regulatory mechanisms of IL-2 and IFN γ suppression by quercetin in T helper cells.** *Biochem Pharmacol*. 2008 Jul 1;76(1):70-8. Epub 2008 Apr 6.

Yu J, Wang L, Walzem RL, Miller EG, Pike LM, Patil BS. **Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins.** *J Agric Food Chem*. 2005 Mar 23;53(6):2009-14.

Zanatta L, Rosso A, Folador P, Figueiredo MS, Pizzolatti MG, Leite LD, Silva FR. **Insulinomimetic effect of kaempferol 3-neohesperidoside on the rat soleus muscle.** *J Nat Prod*. 2008 Apr;71(4):532-5. Epub 2008 Feb 28.

Zhang J, Stanley RA, Adaim A, Melton LD, Skinner MA. **Free radical scavenging and cytoprotective activities of phenolic antioxidants.** *Mol Nutr Food Res*. 2006 Nov;50(11):996-1005.

Internetquellen:

Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.

URL: [http://www.dge.de/wissenschaft/weitere Publikationen/fachinformationen/sekundäre-pflanzenstoffe-und-ihre.wirkung](http://www.dge.de/wissenschaft/weitere_Publikationen/fachinformationen/sekundäre-pflanzenstoffe-und-ihre.wirkung) [Stand: 10.07.2015]

Molecular Probes Inc.

URL: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07020.pdf> [Stand: 25.11.2010]

National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine

URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> [Stand: 23.11.2010]

The Official Web Site of the Nobel Prize

URL: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2002/ [Stand 01.07.2010]

Wormatlas.org

URL: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>

[Stand: 23.11.2010]

Wormbook.org

URL: <http://www.wormbook.org/> [Stand: 23.11.2010]

Danksagung:

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Privatdozent Dr. rer. nat. Andreas Kampkötter danken, der mich während der experimentellen Phase meiner Arbeit zu jeder Zeit nach Kräften unterstützt hat. Er war immer ansprechbar und hat mich vom ersten Schritt an in die Tiefen der wissenschaftlichen Forschung geführt und bis zum Ende begleitet.

Für die Ermöglichung dieser Dissertation danke ich der emeritierten Institutsleitung der Toxikologie Frau Prof. Dr. med. Kahl und dem aktuellen Leiter Herrn Prof. Dr. rer. nat. Fritz.

Ich danke dem gesamten Team der Toxikologie der Heinrich-Heine-Universität für eine herzliche Aufnahme, eine wunderbare Zeit und die vielen großen und kleinen Hilfen im Laboralltag.

Den Mitarbeitern der Medical Research School danke ich für Ihre Unterstützung im Dschungel der Formalitäten und den Dozenten für ihren konstruktiven Einfluss bei der Verschriftlichung.

Sascha Neugebauer danke ich für seine Führung im Sumpf der Statistik.

Für konstruktive Kritik danke ich

Tanja Meinert, Silke Trey, Bernhard Zurawski, Carmen Zurawski und Miriam Zurawski.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die seelische Unterstützung, Zuspruch, Hilfe, Ablenkung und Geduld wenn ich mal wieder abwesend war.

Carmen und Tabea, ich liebe euch.

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.

Ruben Felix Zurawski

Datum und Unterschrift