

**Auswirkung der pharmakologischen oder
genetischen Inhibition der HMG-CoA-
Reduktase auf altersabhängige und Stress-
induzierbare Prozesse in *C. elegans***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andreas Jahn
aus Euskirchen

Düsseldorf, Juni 2020

aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Gerhard Fritz
2. Jun.-Prof. Dr. Mathias Beller

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Alter als Risikofaktor für Erkrankungen	1
1.2	Der Wirkmechanismus von Statinen – Cholesterol-abhängige und - unabhängige Effekte	2
1.3	Der Mevalonatweg und die Bedeutung von Mevalonat als Vorstufe für Cholesterol-unabhängige Prozesse	4
1.4	Der Modellorganismus <i>C. elegans</i>	7
1.5	<i>C. elegans</i> als Modellorganismus in der Altersforschung	12
1.6	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Geräte	19
2.2	Kits	20
2.3	Materialien, Chemikalien und Puffer	20
2.4	<i>C. elegans</i> Stämme	24
2.5	Verwendete Software	25
2.6	Kultivierung von <i>C. elegans</i>	25
2.7	Ansetzen einer OP50 ⁻¹ Bakterienkultur	25
2.8	Bleiche-Synchronisation	26
2.9	Ei-Ablage-Synchronisation	26
2.10	Bestimmung der Fertilität	27
2.11	RNA-Isolation	27
2.12	cDNA-Synthese	27
2.13	Real-Time-RT-PCR	28
2.14	RNA Interferenz über Fütterung („RNAi feeding“)	31
2.15	Quantifizierung der pharyngealen Pumpfrequenz	32
2.16	Chemotaxis-Assay	32
2.17	Analyse der Lebensspanne	33
2.18	Analyse der Akkumulation des Alterspigments	33
2.19	Bestimmung der Viabilität nach thermalem Stress	33
2.20	Quantifizierung des Prenylierungsreporter RAS-2::GFP::CAAX	34
2.21	Analyse der Reporterstämme	34
2.22	„Lifespan-Machine“: thermale Stress-Resistenz	35
2.22.1	Aufbau und Funktion Lifespan-Machine	35
2.22.2	Bestimmung der thermalen Stress Resistenz	35
2.23	Motilität („Body-Bends“)	36

2.24 Statistik	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Lovastatin vermittelt eine Mevalonat-abhängige Lebensverlängerung in <i>C. elegans</i>	37
3.2 Die Lebensverlängerung durch Lovastatin ist abhängig vom Transkriptionsfaktor DAF-16	43
3.3 Die Lebensverlängerung durch Lovastatin ist DAF-2 unabhängig	47
3.4 Die Lebensverlängerung durch Lovastatin ist JNK-1 abhängig	48
3.5 Die Protektion durch Lovastatin ist nur teilweise eine Phänokopie der genetischen Inhibition der HMG-CoA-Reduktase mittels RNAi	51
3.6 Simvastatin vermittelt eine Mevalonat – und DAF-16- abhängige Verzögerung der physiologischen Alterung	59
3.7 Simvastatin reduziert die altersabhängige PolyQ-Aggregation und erhöht die Überlebensrate bei thermalem Stress	65
4 Diskussion	71
4.1 Statine verlängern das Leben in <i>C. elegans</i>	71
4.2 Statine verzögern die physiologische Alterung in <i>C. elegans</i>	73
4.3 Simvastatin verzögert eine altersabhängige PolyQ-Aggregation in <i>C. elegans</i>	75
4.4 Die Statin-bedingte Lebensverlängerung in <i>C. elegans</i> beruht auf einer Mevalonat-Depletion	77
4.5 Zusammenhang zwischen den Mevalonat-abhängigen Prozessen und der Statin-bedingten Lebensverlängerung	81
4.6 Die Statin-bedingte Lebensverlängerung wird über JNK-1 und DAF-16 vermittelt	84
4.7 Arbeitsmodell der Verzögerung der Alterung durch Statine	87
4.8 Ausblick	88
5 Zusammenfassung	90
6 Summary	92
7 Literaturverzeichnis	94
8 Anhang	111
8.1 weitere Abbildungen	111
8.2 Publikationen	115
8.3 Danksagung	116
9 Eidesstattliche Erklärung	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Mevalonatweges und der darauf aufbauenden Prozesse.	6
Abbildung 2: Grundlegende Anatomie eines adulten Hermaphroditen.	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> bei 22°C.	10
Abbildung 4: Vergleich des Insulin/IGF-1 Signalweges zwischen <i>C. elegans</i> und Mensch.	13
Abbildung 5: Einfluss von Lovastatin auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i> .	37
Abbildung 6: Einfluss von Lovastatin auf die CYP-Expression, die Nahrungsaufnahme und die postreproduktive Lebensspanne.	39
Abbildung 7: Einfluss von Lovastatin und Mevalonat auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i> .	41
Abbildung 8: Einfluss von Lovastatin auf die altersabhängige Akkumulation des Alterspigments in <i>C. elegans</i> .	42
Abbildung 9: Einfluss von Lovastatin auf die Lokalisation und mRNA-Expression der beiden Transkriptionsfaktoren DAF-16 und SKN-1, sowie die mRNA-Expression von DAF-16 Zielgenen.	44
Abbildung 10: Einfluss von Lovastatin auf die Akkumulation des Alterspigments und die Lebensspanne in einer <i>daf-16</i> Mutante.	46
Abbildung 11: Einfluss von Lovastatin auf die Akkumulation des Alterspigments und die Lebensspanne in einer <i>daf-2</i> Mutante.	47
Abbildung 12: Einfluss von Lovastatin auf die mRNA Expression verschiedener DAF-16 Aktivatoren und auf die Lokalisation von DAF-16 in einer <i>jnk-1</i> Mutante.	49
Abbildung 13: Einfluss von Lovastatin auf die Akkumulation des Alterspigments und die Lebensspanne einer <i>jnk-1</i> Mutante.	50
Abbildung 14: Akkumulation des Alterspigments nach genetischer Inhibition der HMG-CoA-Reduktase mittels verschiedenen dsRNA Verdünnungen.	52
Abbildung 15: Akkumulation des Alterspigments nach genetischer Inhibition der HMG-CoA-Reduktase im Wildtyp einer <i>daf-16</i> , <i>daf-2</i> und <i>jnk-1</i> Mutante sowie die <i>Knockdown</i> Effizienz von <i>hmgr-1</i> im Wildtyp.	53
Abbildung 16: Akkumulation des Alterspigments nach genetischer Inhibition der HMG-CoA-Reduktase mittels verschiedenen dsRNA Verdünnungen in einer <i>daf-16</i> , <i>daf-2</i> und <i>jnk-1</i> Mutante.	54
Abbildung 17: Akkumulation des Alterspigments nach <i>Knockdown</i> von Enzymen, welche an Mevalonat-abhängigen Prozessen beteiligt sind.	57

Abbildung 18: Analyse der Lebensspanne nach genetischer Inhibition der HMG-CoA-Reduktase mittels verschiedener dsRNA Verdünnungen.	59
Abbildung 19: Einfluss von Lovastatin auf die altersabhängige Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung.	60
Abbildung 20: Einfluss von Fluva- und Simvastatin auf die Fertilität und die Lebensspanne.	62
Abbildung 21: Einfluss von Simvastatin und/oder der Mevalonat-abhängigen Prozesse auf die Fähigkeit zur Körperbewegung.	64
Abbildung 22: Einfluss von Simvastatin auf die Überlebensrate bei thermalem Stress.	66
Abbildung 23: Einfluss von Simvastatin auf die altersabhängige und altersunabhängige Aggregation von PolyQs.	67
Abbildung 24: Aggregation von Q35::YFP nach Behandlung mit 100 µM Simvastatin.	68
Abbildung 25: Aggregation von Q40::YFP nach Behandlung mit 100 µM Simvastatin.	69
Abbildung 26: Einfluss von Simvastatin auf die Expression von <i>hsp-4::GFP</i> und <i>hsp-60::GFP</i> .	70
Abbildung 27: vorgeschlagenes Modell der Verzögerung der Alterung durch Statine in <i>C. elegans</i> .	87
Abbildung 28: Akkumulation des Alterspigments nach Lovastatin-Behandlung und zusätzlicher Mevalonat Supplementation.	111
Abbildung 29: Akkumulation des Alterspigments nach Inkubation auf stark verdünnten <i>hmgr-1</i> dsRNA produzierenden Bakterien.	112
Abbildung 30: Akkumulation des Alterspigments nach <i>Knockdown</i> von <i>fnta-1</i> oder <i>gro-1</i> .	112
Abbildung 31: Akkumulation des Alterspigments nach <i>Knockdown</i> von B0024.13, <i>coq-2</i> , <i>fdps-1</i> , <i>fntb-1</i> oder Y48E1B.3.	113
Abbildung 32: Akkumulation des Alterspigments nach <i>Knockdown</i> von <i>coq-1</i> oder <i>ggtb-1</i> .	113
Abbildung 33: Akkumulation des Alterspigments nach Inkubation auf unverdünnten bzw. leicht verdünnten M57.2 dsRNA produzierenden Bakterien.	114
Abbildung 34: Akkumulation des Alterspigments nach Inkubation auf stark verdünnten M57.2 dsRNA produzierenden Bakterien.	114
Abbildung 35: <i>Knockdown</i> Effizienz der eingesetzten siRNAs.	115
Abbildung 36: RAS-2::GFP Isoprenylierung nach Behandlung mit Simva- oder Lovastatin.	115

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte.	19
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Kits.	20
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Materialien, Chemikalien und Puffer.	20
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten <i>C. elegans</i> Stämme.	24
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Software.	25
Tabelle 6: Sequenzen und Effizienzen der eingesetzten Primer für die RTqPCR.	28
Tabelle 7: PCR-Programm der Real-Time-RT-PCR.	30
Tabelle 8: Behandlungs- und Auswertungsmethode der Reporterstämme.	34
Tabelle 9: Auflistung von Enzymen von <i>C. elegans</i> die an Mevalonat-abhängigen Prozessen beteiligt sind und deren humanes Homolog.	55

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μM	Mikromolar
<i>aak-2</i> /AAK-2	AMP-aktivierende Kinase (engl. <i>AMP-Activated Kinase</i>)
<i>act-1</i>	Aktin 1 (engl. <i>actin 1</i>)
AGE-1	Alterungsveränderung 1 (engl. <i>ageing alteration 1</i>)
AKT	AKT-Kinase-Familie (engl. <i>AKT kinase family</i>)
<i>ama-1</i>	Amanitin resistent 1 (engl. <i>amanitin resistant 1</i>)
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
<i>cdc-42</i>	Zellteilungszyklus bezogen 42 (engl. <i>cell division cycle related 42</i>)
<i>coq</i>	Coenzym Q (Ubichinon) Biosynthese (engl. <i>coenzyme Q (ubiquinone) biosynthesis</i>)
CR	Kalorische Restriktion (engl. <i>caloric restriction</i>)
CT	Schwellwert-Zyklus (engl. <i>cycle threshold</i>)
CuSO ₄	Kupfersulfat
<i>cyb-1</i>	Cyclin B 1
<i>cyp</i> /CYP	Cytochrome P450
<i>daf</i> /DAF	abnormale Dauer Formation (engl. <i>abnormal dauer formation</i>)
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)

dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eat-2/EAT-2</i>	Essen: abnormales Pharynxpumpen 2 (engl. <i>eating: abnormal pharyngeal pumping 2</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Proteindegradation
<i>fdps-1</i>	Farnesyldiphosphat-Synthetase 1 (engl. <i>farnesyl diphosphate synthetase 1</i>)
FeSO ₄	Eisen(II)-sulfat
Fluva	Fluvastatin
<i>fnta-1</i>	Farnesyltransferase, Alpha-Untereinheit 1 (engl. <i>farnesyltransferase, alpha subunit 1</i>)
<i>fntb-1</i>	Farnesyltransferase, Beta-Untereinheit 1 (engl. <i>farnesyltransferase, beta subunit 1</i>)
FOXO3	Gabelkopf-Box-Protein O3 (engl. <i>Forkhead-Box-Protein O3</i>)
FPP	Farnesylpyrophosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
<i>ggtb-1</i>	Homolog der Geranylgeranyltransferase -Beta-Untereinheit 1 (engl. <i>geranylgeranyl transferase beta subunit homolog 1</i>)
<i>glo-1</i>	Darmgranula Verlust (engl. <i>gut granule loss</i>)
<i>gro-1</i>	abnorme Wachstumsrate 1 (engl. <i>abnormal growth rate 1</i>)
<i>gst-4</i>	Glutathion-S-Transferase 4 (engl. <i>glutathione-S-transferase 4</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
H	Stunden
HGPS	Hutchinson-Gilford Progerie Syndrom
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A- Reduktase

<i>hmgr-1</i>	HMG-CoA-Reduktase 1
<i>hsp</i>	Hitzeschockprotein (engl. <i>heat shock protein</i>)
IDL	Lipoprotein mit mittlerer Dichte (engl. <i>intermediate density lipoprotein</i>)
IGF1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1 (engl. <i>insulin-like-growth-factor-1</i>)
IGF1R	IGF1 Rezeptor
INS	Insulin-ähnliche Peptide (engl. <i>insulin related</i>)
Insig	Insulin-induziertes Gen (engl. <i>insulin induced gene</i>)
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
<i>jkk-1/JKK-1</i>	JNK Kinase 1
<i>jnk-1/JNK-1</i>	Jun N-terminale Kinase 1 (engl. <i>Jun N-terminal Kinase 1</i>)
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KPO ₄	Kaliumphosphat
LDL	Lipoprotein mit niedriger Dichte (engl. <i>low density lipoprotein</i>)
Lova	Lovastatin
Mev	Mevalonat
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Min	Minuten
mM	Millimolar
MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOCl	Natriumhypochlorid
NaOH	Natronlauge
NF-κB	Kernfaktor 'Kappa-Leichtketten-Enhancer' von aktivierten B-Zellen (engl. <i>nuclear</i>

	<i>factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)</i>
NGM	Nematoden Wachstumsmedium (engl. <i>Nematode growth medium</i>)
nm	Nanometer
NRF2	Kernfaktor Erythroid 2 verwandter Faktor 2 (engl. <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)
<i>nuc-1</i>	abnormale Nuklease 1 (engl. <i>abnormal nuclease 1</i>)
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDK-1	PDK-Klasse Proteinkinase 1 (engl. <i>PDK-class protein kinase 1</i>)
PHA-4	defekte Pharynxentwicklung 4 (engl. <i>defective pharynx development 4</i>)
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
<i>pmp-3</i>	peroxisomales Membranprotein 3 (engl. <i>peroxisomal membrane protein related 3</i>)
<i>RT</i>	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNAI	RNA Interferenz
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RT-qPCR	quantitative Echtzeit PCR (engl. <i>real time</i>)
SCAP	spaltaktivierendes Protein (engl. <i>cleavage-activating protein</i>)
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)
sec-tRNAs	Selenocystein-tRNA
Sek	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (engl. <i>standard error mean</i>)

SGK-1	Serum- und Glucocorticoid-induzierbares Kinase-Homolog 1 (engl. <i>Serum- and Glucocorticoid- inducible Kinase homolog 1</i>)
Simva	Simvastatin
<i>sir-2.1</i>	Hefe SIR verwandt 2.1 (engl. <i>yeast SIR related 2.1</i>)
siRNA	kleine eingreifende RNA (engl. <i>small interfering RNA</i>)
skn-1/SKN-1	Hautkopf 1 (engl. <i>skinhead 1</i>)
<i>smk-1</i>	SMEK (Dictyostelium Suppressor von MEK null) Homolog 1 (engl. <i>SMEK (Dictyostelium Suppressor of MEK null) homolog 1</i>)
<i>sod-3/SOD-3</i>	Superoxiddismutase 3 (engl. <i>superoxide dismutase 3</i>)
SRE	regulatorisches Sterolelement (engl. <i>sterol regulatory element</i>)
SREBP	Bindungsprotein für das Sterolregulationselement (engl. <i>sterol regulatory element binding protein</i>)
TOR	Ziel von Rapamycin (engl. <i>target of rapamycin</i>)
tRNA	Transfer-RNA
<i>vit-5</i>	Vitellogenin-Strukturgene (Dotterprotein-Gene) 5 (engl. <i>vitellogenin structural genes (yolk protein genes) 5</i>)
VLDL	Lipoprotein mit sehr niedriger Dichte (engl. <i>very low density lipoprotein</i>)
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (engl. <i>yellow fluorescent protein</i>)
ZnSO ₄	Zinksulfat

1 Einleitung

1.1 Das Alter als Risikofaktor für Erkrankungen

Altern beschreibt die fortschreitende, degenerative Veränderung der Gewebeorganisation und -funktion (Collins *et al.*, 2008). Dadurch erhöht sich mit steigendem Alter das Risiko für Krankheiten und somit auch die Sterbewahrscheinlichkeit. Insbesondere das mit dem Alter erhöhte Risiko für schwerwiegende Pathologien wie Krebs, Diabetes und neurodegenerative – oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellt eine besondere Bedrohung für das Leben dar (Lopez-Otin *et al.*, 2013). Deshalb ist es von großer Bedeutung, die komplexen Ursachen des Alterungsprozesses zu erkennen und zu verstehen. Lopez-Otin *et al.* (2013) haben dazu folgende neun *Hallmarks* der Alterung definiert: Genomische Instabilität, Telomerverkürzung, epigenetische Veränderungen, Verlust der Proteostase, deregulierte Nährstoffwahrnehmung, mitochondriale Dysfunktion, zelluläre Seneszenz, Erschöpfung der Stammzellen und veränderte interzelluläre Kommunikation. Die Gesamtheit dieser Veränderungen führt schließlich zum Alterungsphänotyp. Ein zukünftiges Ziel der Alternsforschung ist es daher, mit Hilfe von pharmakologischen Interventionen die Progression dieser degenerativen Veränderungen zu verzögern, um die Gesundheitspanne während der Alterung zu verlängern und dadurch das Risiko für Erkrankungen zu minimieren (Lopez-Otin *et al.*, 2013). Gegenwärtig können allerdings nur die Folgen und nicht die molekularen Ursachen der Alterungsprozesse mit Hilfe von Medikamenten bekämpft werden. Eine dieser Folgen ist die Atherosklerose. Atherosklerose ist für die Mehrzahl an Herz-Kreislauf-Erkrankungen verantwortlich, welche weltweit die häufigste Todesursache darstellen (Felix-Redondo *et al.*, 2013). Die Entstehung und Progression von Atherosklerose ist noch nicht vollkommen verstanden. Bekannt ist allerdings, dass bei der Entstehung von Atherosklerose die Akkumulation von oxidiertem LDL- (engl. *low density lipoprotein*) Cholesterin in der Tunica Intima der Arterie zur Rekrutierung von Monozyten führt. Diese eingewanderten Monozyten differenzieren zu Makrophagen und nehmen das oxidierte LDL-Cholesterin auf, wodurch sie zu Schaumzellen werden können. Die Schaumzellen begünstigen wiederum die Aufnahme von LDL-Cholesterin in den subendothelialen Raum, den Abbau der extrazellulären Matrix und Inflammationsreaktionen. Bei der Progression der Atherosklerose gehen diese Schaumzellen in Apoptose und können anfänglich noch durch Phagozyten aufgenommen werden. Mit zunehmender Dauer lagern sich jedoch immer mehr apoptotischer Zelltrümmer an, welche nicht mehr phagozytiert werden können und deshalb, post-apoptotisch, nekrotisch werden. Dadurch bildet sich ein nekrotischer Kern, welcher Prozesse wie Inflammation, Nekrose und Thrombose

begünstigt (Chinetti-Gbaguidi *et al.*, 2015). Neben dem Alter sind die wichtigsten Risikofaktoren für Atherosklerose Hypercholesterinämie, Bluthochdruck, Rauchen, Fettleibigkeit und Diabetes (Rafieian-Kopaei *et al.*, 2014). Hypercholesterinämie wird seit 1987 mit Statinen behandelt (Manu & Rogozea, 2016). Die Behandlung mit Statinen kann nachweislich das Risiko für die kardiovaskuläre Sterblichkeit (35 %), schwerwiegende koronare Ereignisse (34 %) und Koronarinterventionen (37 %) senken (Toth & Banach, 2019).

1.2 Der Wirkmechanismus von Statinen – Cholesterol-abhängige und -unabhängige Effekte

Das Potential dieser Schimmelpilz-Metabolite bezüglich ihrer hypocholesterinämischen Aktivität wurde zuerst von Endo und Kollegen beschrieben (Endo *et al.*, 1976). Heute gehören Statine weltweit zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten (Ekhart *et al.*, 2016). So wurden beispielsweise im Jahr 2018 2250 Millionen definierte Tagesdosen von Statinen in Deutschland verordnet, was einen Ordnungsanteil von ca. 92 % der eingesetzten Lipidsenker ausmacht (Schwabe *et al.*, 2018). Lovastatin war das erste auf dem Markt erhältliche Statin, welches seit 1987 als Medikament gegen Hypercholesterinämie eingesetzt wird (Hajar, 2011). Mittlerweile werden in Deutschland neben Lovastatin vermehrt andere Statine, wie Simvastatin, Atorvastatin, Pravastatin, Fluvastatin und Rosuvastatin eingesetzt (Schwabe *et al.*, 2018). Bis auf Prava- und Rosuvastatin gelten alle Statine als lipophil. Die Bioverfügbarkeit unterscheidet sich sehr stark von 5 % für Lova- und Simvastatin bis zu 20 % für Rosuvastatin (Schachter, 2005). Die beiden erstgenannten Statine sind *Prodrugs*, d. h. sie müssen erst noch in der Leber über CYP3A4 (Cytochrom P450 3A4) bioaktiviert werden (Beaird, 2000). Herkömmlicherweise werden Statine oral in Tablettenform verabreicht (Korani *et al.*, 2019). Bei Einhaltung des richtigen Behandlungsschemas werden sie als gut verträglich erachtet, seltene Nebenwirkungen sind Muskelschwäche (Myopathie), Muskelfaserzerfall (Rhabdomyolyse) oder Lebertoxizität (Golomb & Evans, 2008).

Statine wirken als HMG-CoA (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A) Reduktase-Inhibitoren. Die HMG-CoA-Reduktase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Mevalonatweges, das HMG-CoA in Mevalonat umwandelt (Goldstein & Brown, 1990). Mevalonat ist beim Menschen eine Vorstufe von Cholesterol und seine Depletion führt in der Zelle zu einem intrinsischen Cholesterolmangel (Zhou & Liao, 2010). Cholesterol ist ein wichtiger Baustein und wird unter anderem für die Synthese von Steroidhormonen und für den Aufbau der Zellmembran benötigt (Grundy, 1978). Da ca. 80 % der *de-novo* Synthese von Cholesterol in den Hepatozyten stattfindet, sind vor allem diese Zellen von der Hemmung der HMG-CoA Reduktase durch Statine betroffen (Malhotra *et al.*, 2016).

Um den Mangel an Cholesterol zu kompensieren, bilden die Zellen verstärkt LDL-Rezeptoren an der Zelloberfläche aus. Dadurch wird über LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose vor allem zirkulierendes LDL aber auch dessen Vorstufen IDL (engl. *intermediate density lipoprotein*) und VLDL (engl. *very low density lipoprotein*) aus dem Blut aufgenommen (Stancu & Sima, 2001, Zhou & Liao, 2010). Da der Hauptlipidanteil von LDL mit ca. 48 % aus Cholesterol besteht, wird der LDL-Cholesterolspiegel im Blut gesenkt und so der Entstehung von atherosklerotischen Plaques vorgebeugt (Masana *et al.*, 2018). Aufgrund dessen wird die kardioprotektive Wirkung von Statinen vor allem dem gesenkten LDL-Cholesterolspiegel zugeschrieben. Einige Studien weisen jedoch darauf hin, dass solch eine Protektion nicht zwangsläufig Cholesterol-abhängig sein muss (Oesterle *et al.*, 2017). Insbesondere die anti-inflammatorischen und thrombozytenaggregationshemmenden Eigenschaften von Statinen wirken sich zusätzlich zur Senkung des LDL-Cholesterols positiv auf die Vulnerabilität von atherosklerotischen Plaques aus. So senken Statine die Plasmakonzentration von pro-inflammatorischen Zytokinen in hypercholesterinämischen Patienten und reduzieren die Expression dieser Zytokine in isolierten Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen (Rezaie-Majd *et al.*, 2002). Weiterhin hemmen sie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (engl. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), die T-Zell-Aktivierung, das Makrophagenwachstum und die Leukozyten-Endothelzelladhäsion (Dichtl *et al.*, 2003, Chandrasekar *et al.*, 2006, Kagami *et al.*, 2009, Jougasaki *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2010, Andreux *et al.*, 2014, Tousoulis *et al.*, 2014). In Hinblick auf die Thrombozyten konnte gezeigt werden, dass Statine die Expression des aggregationsfördenden Prostaglandins Thromboxan A₂, und die Aggregation der Thrombozyten in Patienten mit Hypercholesterinämie hemmen (Haramaki *et al.*, 2007, Ali *et al.*, 2009, Pignatelli *et al.*, 2012). Dieser anti-thrombotische Effekt von Statinen wirkt sich nicht nur positiv auf atherosklerotische Plaques aus, sondern beugt auch venöser Thromboembolie vor (Glynn *et al.*, 2009). Darüber hinaus können Statine wahrscheinlich auch kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz vorbeugen (Liao, 2004). Auch bei Schlaganfällen wird eine Cholesterol-unabhängige Protektion durch Statine diskutiert (Oesterle & Liao, 2019). Neben diesen Herz-Kreislauf-abhängigen Protektionen gibt es noch eine Reihe von Cholesterol-unabhängigen Erkrankungen, auf welche Statine einen positiven Einfluss haben können. Im Zusammenhang mit Erkrankungen wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose oder auch Lungenentzündungen konnte eine günstige Statin-Wirkung schon gezeigt werden (Oesterle *et al.*, 2017). Neuroprotektive Wirkungen von Statinen bei Morbus Alzheimer, Parkinson oder Chorea Huntington werden hauptsächlich der Cholesterol-Senkung zugeschrieben, allerdings werden auch Cholesterol-unabhängige

Effekte, insbesondere durch die Hemmung der Isoprenylierung von Proteinen, in Betracht gezogen (Roy & Pahan, 2011, Chu *et al.*, 2018, Schultz *et al.*, 2019). Mit Blick auf die generelle Alterung konnten Jacobs *et al.* (2013) zeigen, dass die Behandlung mit Statinen bei Patienten zwischen 70 und 90 Jahren die Mortalität unabhängig vom Cholesterolspiegel senkt.

Alle hier aufgeführten Cholesterol-unabhängigen Effekte werden wie die Cholesterolsenkende Wirkung durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase ausgelöst. Bei den meisten Effekten weiß oder vermutet man zudem, dass diese von der Hemmung der Isoprenylierung von kleinen GTPasen durch Statine abhängen (Oesterle *et al.*, 2017). Inwieweit sich die Gesamtheit dieser protektiven Wirkungen, welche man auch als pleiotrope Wirkungen von Statinen bezeichnet, auch positiv auf die Gesamtmortalität in älteren Menschen auswirken kann, ist jedoch noch unbekannt. Bekannt ist nur, dass dieser Protektion Mevalonat-abhängige Prozesse, aber unabhängig von der Cholesterolsynthese, zu Grunde liegen.

1.3 Der Mevalonatweg und die Bedeutung von Mevalonat als Vorstufe für Cholesterol-unabhängige Prozesse

Der Mevalonatweg ist ein essentieller Stoffwechselweg, welcher in Eukaryoten, Archaeen und einigen Bakterien vorkommt (Miziorko, 2011). Er bildet Vorstufen, welche unter anderem für die Synthese von Sterol-Isoprenoiden (Cholesterol) und Nicht-Sterol-Isoprenoiden (z. B. Ubichinon) in Säugetieren benötigt werden (Buhaescu & Izzedine, 2007). Ausgehend von Acetyl-CoA wird über sechs enzymatische Reaktionen das Endprodukt des Mevalonatweges Isopentenylpyrophosphat (IPP) synthetisiert (Abb. 1) (Miziorko, 2011). Hierbei wird Acetyl-CoA durch mehrmaliges acetylieren zu HMG-CoA, welches durch die HMG-CoA Reduktase zu Mevalonat reduziert wird (Abb. 1). Diese Reduktion stellt den geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt des Mevalonatweges dar (Goldstein & Brown, 1990). Die HMG-CoA Reduktase ist ein membrangebundenes 97 KD großes Glykoprotein des endoplasmatischen Retikulums (ER). Sie besteht aus zwei Domänen, einer N-terminalen hydrophoben Domäne und einer C-terminalen hydrophilen Domäne. Die C-terminale Domäne ist die katalytische Domäne des Enzyms, welche ins Zytoplasma ausgerichtet ist. Diese katalytische Domäne ist über die Arten hinweg hochkonserviert (Liscum *et al.*, 1983, Roitelman *et al.*, 1992). Die N-terminale Domäne besteht aus acht transmembranen Segmenten und spielt eine wichtige Rolle bei der Sterol-vermittelten und ER-assoziierten Proteindegradation (ERAD) der HMG-CoA-Reduktase (Jo & Debose-Boyd, 2010). Dieser Mechanismus wird durch die intrinsische Akkumulation von Sterolen initiiert, welche die Bindung der N-terminalen-Domäne der HMG-CoA Reduktase an die ER-Membranproteine INSIG1 (engl. *insulin induced*

gene) und INSIG2 bewirken. Daraufhin ubiquitinieren INSIG-assoziierte Ubiquitin-Ligasen zytosolisch liegende Lysinreste der HMG-CoA-Reduktase, wodurch diese für die Extraktion aus der ER-Membran markiert wird. Nach der Extraktion wird die Reduktase zum Proteasom transportiert und degradiert (Schumacher *et al.*, 2015). Auch die Transkription der HMG-CoA Reduktase wird Sterol-vermittelt reguliert. Hierbei spielt das SREBP (engl. *sterol regulatory element binding protein*) eine wichtige Rolle. In seiner inaktiven Form, d. h. in Anwesenheit von Sterolen ist SREBP an SCAP (engl. *SREBP cleavage-activating protein*) gebunden, welches wiederum an INSIG in der Membran des ERs gebunden ist. Bei einer niedrigen intrinsischen Sterol-Konzentration löst sich SCAP von INSIG und transportiert SREBP zum Golgi-Apparat, wo dieses gespalten wird. Die aus dieser Spaltung hervorgehende aktive Form (nSREBP) migriert in den Nukleus und bindet an das SRE (engl. *sterol regulatory element*) und aktiviert so unter anderem die Transkription der HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors (Espenshade & Hughes, 2007). Zusätzlich kann die HMG-CoA-Reduktase auch über Phosphorylierung durch die AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) inhibiert werden (Burg & Espenshade, 2011). Insgesamt wird die HMG-CoA-Reduktase so transkriptionell, translational und post-translational reguliert, wodurch sie zu einem der am stärksten regulierten Enzyme gehört. Durch diese starke Regulation kann die Proteinmenge der HMG-CoA-Reduktase um mehr als das 200-fache verändert werden (Friesen & Rodwell, 2004).

In Säugetieren wird der größte Anteil von Mevalonat in mehreren Schritten zu Cholesterol umgewandelt. Der Rest des Mevalonats wird zum Aufbau anderer wichtiger Moleküle benötigt. Darunter fallen isopentenyliertes Adenosin, Dolichole, Ubichinone und prenylierte Proteine (Hinson *et al.*, 1997). Das Endprodukt des Mevalonatweges, Isopentenylpyrophosphat (IPP), wird für die Isopentenylierung von Adenosin benötigt (Abb. 1). Die Isopentenylierung von Adenosin ist eine wichtige post-transkriptionelle Modifikation von *sec*-tRNAs (Selenocystein-tRNA), welche für die Synthese von Selenoproteinen benötigt werden (Moosmann & Behl, 2004). Im Menschen wirkt die Mehrheit der 25 Selenoproteine vor allem antioxidativ. Doch auch bei anderen Prozessen wie Schilddrüsenhormonstoffwechsel, Selenocystein-Synthese, Transport und Speicherung von Selen oder an der Proteinfaltung sind Selenoproteine beteiligt (Papp *et al.*, 2007). Farnesylpyrophosphat (FPP), welches über zwei Schritte aus dem Endprodukt des Mevalonateweges IPP entsteht, dient als Vorstufe für die Biosynthese von Dolichol (Abb. 1). Dolicholpyrophosphat spielt eine wichtige Rolle bei der N-Glykosylierung von Proteinen. An der Membran des ER wird das Oligosaccharid zusammengesetzt, wobei Dolicholpyrophosphat als Träger dient. Anschließend wird die

Glykosylgruppe vom Lipidanker Dolicholpyrophosphat auf die Seitenkette der Aminosäure Asparagin eines Proteins übertragen (Burda & Aebi, 1999). Glykoproteine haben viele wichtige Funktionen in der Zelle. Hauptsächlich fungieren sie als Strukturproteine oder Rezeptoren (z. B. Hormonrezeptoren) in der Zellmembran (Saraswathy & Ramalingam, 2011).

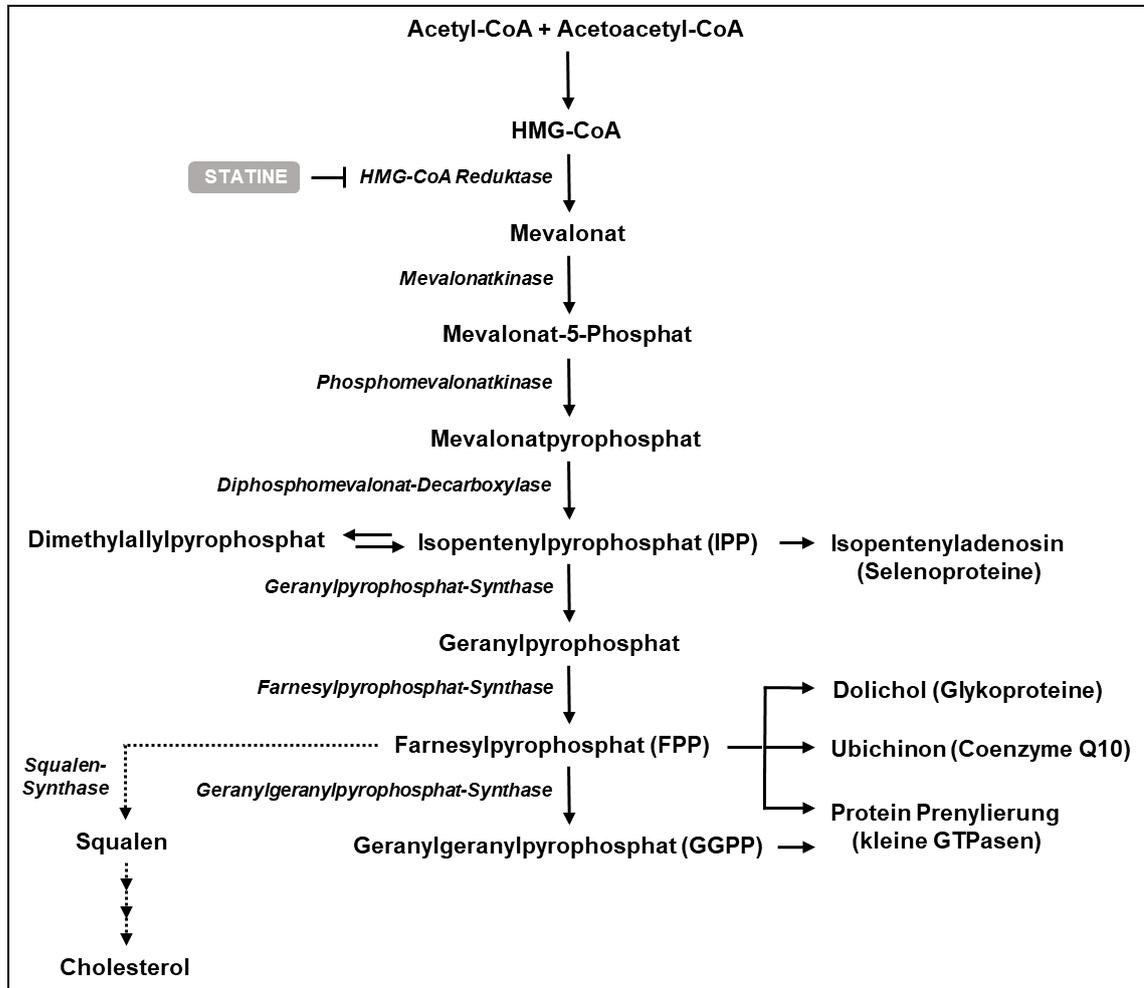


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Mevalonatweges und der darauf aufbauenden Prozesse.

Dargestellt ist die über mehrere Schritte ablaufende Synthese von Isopentenylpyrophosphat (IPP), dem Endprodukt des Mevalonatweges, welches unter anderem für die Isopentenylierung von Adenosin benötigt wird. Isopentenyliertes Adenosin wird für die Synthese von Selenoproteinen benötigt. Weiterhin wird IPP über Geranylpyrophosphat (GPP) zu Farnesylpyrophosphat (FPP) umgesetzt, welches eine Vorstufe für die Cholesterin-Biosynthese ist. Neben der Cholesterin-Biosynthese wird FPP auch für die Synthese von Ubichinon, Dolichol und für die Protein Prenylierung benötigt. Statine inhibieren die HMG-CoA Reduktase und hemmen dadurch die Bildung von Mevalonat. Dolichol spielt eine wichtige Rolle bei der Glykosylierung von Proteinen. Ubichinone, vor allem Coenzym Q10, sind wichtige Elektronenakzeptoren in der Elektronentransportkette. Durch das Fehlen der Squalen-Synthase ist *C. elegans* Cholesterin auxotroph und verfügt somit nicht über den Cholesterin-Biosyntheseweg (gepunktete Linien). Abbildung modifiziert nach Buhaescu & Izzedine (2007), Bogsrud *et al.* (2013), Gilbert *et al.* (2017).

Auch für die Synthese von Ubichinonen ist FPP die Vorstufe (Abb. 1). Ubichinone dienen als Elektronen- und Protonen-Überträger innerhalb der Elektronentransportkette in den

Mitochondrien. In Menschen und Tieren ist hauptsächlich Ubichinon-10 (auch Coenzym Q10) als Elektronenakzeptor der mitochondrialen Komplexe I und II aktiv (Crane *et al.*, 1957). Zusätzlich können Ubichinone auch als Antioxidantien, aber auch prooxidativ durch die Beteiligung an der Entstehung von Superoxid wirken. Als Antioxidantien wirken sie insbesondere der Entstehung und Progression von Lipidperoxidationen entgegen (James *et al.*, 2004). Für die Prenylierung von Proteinen wird sowohl FPP direkt als auch das aus FPP synthetisierte Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) verwendet (Abb. 1). Farnesylierung und Geranylgeranylierung sind wichtige post-translationale Proteinmodifikationen. Sie dienen als Lipid-Anker zur Befestigung von Proteinen in der inneren Zellmembran. GTP-bindende Proteine, wie zum Beispiel die kleinen GTPasen, sind erst durch die Prenylierung bzw. Verankerung in der Zellmembran voll funktionstüchtig und agieren als „molekulare Schalter“ bei der Signalweiterleitung bei vielen wichtigen Signalwegen (Buhaescu & Izzedine, 2007). Die bekanntesten kleinen GTPasen gehören zur Familie der Ras (engl. *rat sarcoma*) GTPasen, welche auch Ras Superfamilie genannt wird. Die Ras Superfamilie wird wiederum in fünf Subfamilien (Ras, Rho, Rab, Arf, und Ran) unterteilt. Prozesse, die von Proteinen dieser Subfamilien kontrolliert werden, sind Inflammation, Entwicklung, Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellüberleben, Aufbau des Zytoskeletts, Zellpolarität, Zellzyklus Progression, Gen Expression und Vesikeltransport. Damit beeinflussen kleine GTPasen fast alle zellulären Prozesse (Song *et al.*, 2019). Insgesamt bedeutet dies, dass die Synthese von Mevalonat vor allem über die Prenylierung von kleinen GTPasen indirekt Einfluss auf eine Vielzahl von Cholesterol-unabhängigen Prozessen hat.

Der Mevalonatweg ist über die Arten hinweg hochkonserviert (Shi & Ruvkun, 2012). Dies gilt auch für den Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Neben dem Hauptstrang des Mevalonatweges sind in *C. elegans* auch die darauf aufbauenden Prozesse konserviert. Lediglich die Verzweigung für die Cholesterol-Biosynthese fehlt, da *C. elegans* keine Squalen-Synthase besitzt und dadurch Cholesterol-auxotroph ist (Abb. 1). Dadurch ist der Nematode *C. elegans* ein hervorragender Modellorganismus, um die Cholesterol-unabhängigen Prozesse, welche auf dem Mevalonatweg aufbauen bzw. die Cholesterol-unabhängigen Effekte von Statinen zu untersuchen (Rauthan & Pilon, 2011).

1.4 Der Modellorganismus *C. elegans*

Der Nematode *C. elegans* besitzt eine durchschnittliche Körperlänge von ca. 1 mm und wurde 1974 von Sydney Brenner als Modellorganismus für Entwicklungsbiologie und Neurobiologie eingeführt. In freier Wildbahn lebt *C. elegans* im Kompost, in faulenden Früchten oder im Boden und ernährt sich von verschiedenen Bakterien. Im Labor wird

C. elegans auf Agarplatten oder in Flüssigmedium gehalten. Als Nahrungsquelle dient ein *E. Coli* Stamm, welcher Uracil-auxotroph ist (OP50), wodurch das Überwachsen der Bakterien verhindert wird (Brenner, 1974, Troemel *et al.*, 2008). Die gewöhnliche Kultivierungstemperatur von *C. elegans* liegt zwischen 15-25 °C, wobei 15, 20 und 25°C am häufigsten verwendet werden (Zhang *et al.*, 2015). *C. elegans* hat zwei Geschlechter, die protandrischen Hermaphroditen, bei welchen zuerst Spermien und dann Oozyten gebildet werden, und Männchen (Klass *et al.*, 1982). Männchen sind sehr selten und treten bei Nachkommen aus einer Selbstbefruchtung mit einer Inzidenz von ca. 0,1 – 0,2 % auf (Hodgkin & Doniach, 1997). Bei natürlicher Verpaarung oder Kreuzung liegt das Verhältnis von Hermaphroditen zu Männchen dagegen ungefähr bei 1:1 (Anderson *et al.*, 2010). Die Anzahl der Nachkommen aus einer Selbstbefruchtung ist limitiert durch die Anzahl der Spermien. Ein Hermaphrodit produziert ca. 300 Spermien bzw. Nachkommen, wohingegen bei der danach ablaufenden Oogenese über 1000 Oozyten entstehen. Dadurch kann die Anzahl an Nachkommen bei einer Kreuzung auf ca. 1400 ansteigen, wobei die Spermien der Männchen bevorzugt werden (Kimble & Ward, 1988). Für die Forschung werden hauptsächlich Hermaphroditen verwendet. Männchen kommen meistens nur bei Kreuzungsversuchen zum Einsatz.

Während der Entwicklung eines Hermaphroditen gehen von den 1090 somatischen Zellen 131 an definierten Zeitpunkten in Apoptose (Driscoll, 1995). Dadurch besteht ein adulter Hermaphrodit immer aus genau 959 somatischen Zellen, was als Eutelie (Zellkonstanz) bezeichnet wird (White, 1988). Das komplette Genom eines Hermaphroditen ist ca. 80000 kb groß und auf fünf Autosomen und ein X-Chromosom verteilt (Sulston & Brenner, 1974, Hodgkin, 2005). Die simple Anatomie eines adulten Hermaphroditen setzt sich aus Pharynx, Darm und zwei Gonaden zusammen (Abb. 2). Nach außen wird der Nematode durch eine collagenreiche Cuticula geschützt (Johnstone, 1994). Daneben besitzt er 95 Körperwand-Muskelzellen zur Fortbewegung und ein Nervensystem, bestehend aus 302 Nervenzellen (White *et al.*, 1986).

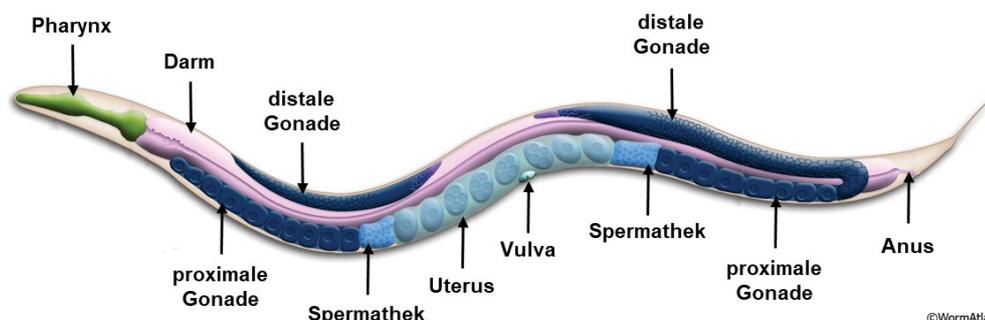


Abbildung 2: Grundlegende Anatomie eines adulten Hermaphroditen.

Dargestellt ist die grundlegende Anatomie eines adulten Hermaphroditen bestehend aus Pharynx, Darm, zwei Gonaden und dem Uterus. Der Pharynx befindet sich am anterioren Ende

des Nematoden und dient zur Aufnahme und Zerkleinerung der Nahrung (Bakterien). Der Darm schließt an den Pharynx an und zieht sich durch den ganzen Körper und endet am posterioren Ende des Hermaphroditen mit dem Anus. Im Darmlumen werden die Nährstoffe aus den durch den Pharynx zerkleinerten Zelltrümmern aufgenommen. Die paarig angelegten U-förmigen Gonaden bestehen jeweils aus einem Ovar und einer Spermathek und teilen sich einen gemeinsamen Uterus. Das Ovar besteht aus einer distalen Gonade, in welcher Mitose und Meiose bis zum Diplotän der Prophase I der Keimzellen stattfinden und einer proximalen Gonade, in welcher die Oozyten die Diakinese durchlaufen. Im Uterus reifen die befruchteten Oozyten heran und werden dann im 30-Zell Stadium (Gastrula) über die Vulva abgelegt. Abbildung modifiziert nach Altun & Hall (2009).

Der Darm stellt das zentrale Organ des Verdauungstraktes dar und zieht sich durch den gesamten Körper des Nematoden (Abb. 2) (Avery & Thomas, 1997). Er besteht aus 20 Epithelzellen, wobei zu Beginn des Darms vier Zellen in ihrer Mitte ein Lumen bilden und darauffolgend das Lumen von bilateral angeordneten Zellen gebildet wird (Altun & Hall, 2009). Die Zellen sind polarisiert und besitzen auf ihrer apikalen Seite Mikrovilli, welche einen Bürstensaum bilden und sich in das Darmlumen erstrecken (Leung *et al.*, 1999). Während der post-embryonalen Entwicklung werden aus den Darmzellen binukleäre und polyploide Zellen, sodass der Darm eines Adulten aus 20 Zellen, 30-34 Nuklei und 32 Chromosomen pro Nukleus besteht (Hedgecock & White, 1985). An das anteriore Ende des Darms schließt sich der Pharynx an, welcher aus 62 Zellen besteht (Abb. 2) (Pilon, 2014). Der Pharynx ist eine neuromuskuläre Pumpe, welche über den Mund aufgenommene Bakterien in den Darm befördert. Er wird von anterior nach posterior in drei funktionelle Einheiten unterteilt: den *corpus*, den *isthmus* und den *terminal bulb* (Albertson & Thomson, 1976). Zur Nahrungsaufnahme werden im Pharynx zwei Bewegungen ausgeführt: Pumpen und Peristaltik. Ein *Pump* besteht aus einer Kontraktion, wodurch sich das Lumen des Pharynx öffnet und Flüssigkeit und Bakterien über den Mund hineinströmen können, unmittelbar gefolgt von einer Relaxation, welche zur Folge hat, dass die Flüssigkeit wieder herausströmt, aber die Bakterien im posterioren Teil des *corpus* verbleiben. Von dort werden die Bakterien über die *isthmus* Peristaltik zum *terminal bulb* transportiert, wo die Bakterien zerkleinert und die Zelltrümmer an den Darm weitergegeben werden (Avery & Horvitz, 1987, Avery & You, 2012). Das Reproduktionssystem von *C. elegans* besteht aus einem rechten und einem linken U-förmigen Gonadenarm, welche beide aus einem Ovar und einer Spermathek bestehen und in einem gemeinsamen Uterus münden (Abb. 2). Das Ovar wird in eine distale und eine proximale Gonade in Relation zur Vulva unterteilt (Hirsh *et al.*, 1976). Die distale Gonade ist ein Synzytium, d. h. die „Keimzellen“ teilen sich über einen zentralen Kanal, die Rachis, ein Zytoplasma. Am distalen Ende der distalen Gonade befinden sich mitotische Zellen, auf welche in proximaler Richtung meiotische Zellen folgen. Diese sind wiederum mit zunehmender proximaler Richtung weiter in der Prophase I der Meiose fortgeschritten (Lints & Hall, 2009). Innerhalb der

Übergangsregion von distaler zu proximaler Gonade (*loop region*) befinden sich die Zellen im Diplotän und gehen mit dem Beginn der proximalen Gonade in die Diakinese über und reifen zu Oozyten heran (Hillers *et al.*, 2017). Die Spermatogenese innerhalb der Spermathek findet vor der Oogenese, während des letzten Larvenstadiums (L4), statt (L'Hernault, 2006). Die befruchteten Oozyten entwickeln sich im Uterus und werden im 30-Zell Stadium (Gastrula) über die Vulva abgelegt. Die *ex utero* Entwicklung des Embryos dauert ca. 9 h bei 22°C und endet mit dem Schlüpfen der L1-Larve (Abb. 3) (Altun & Hall, 2009).

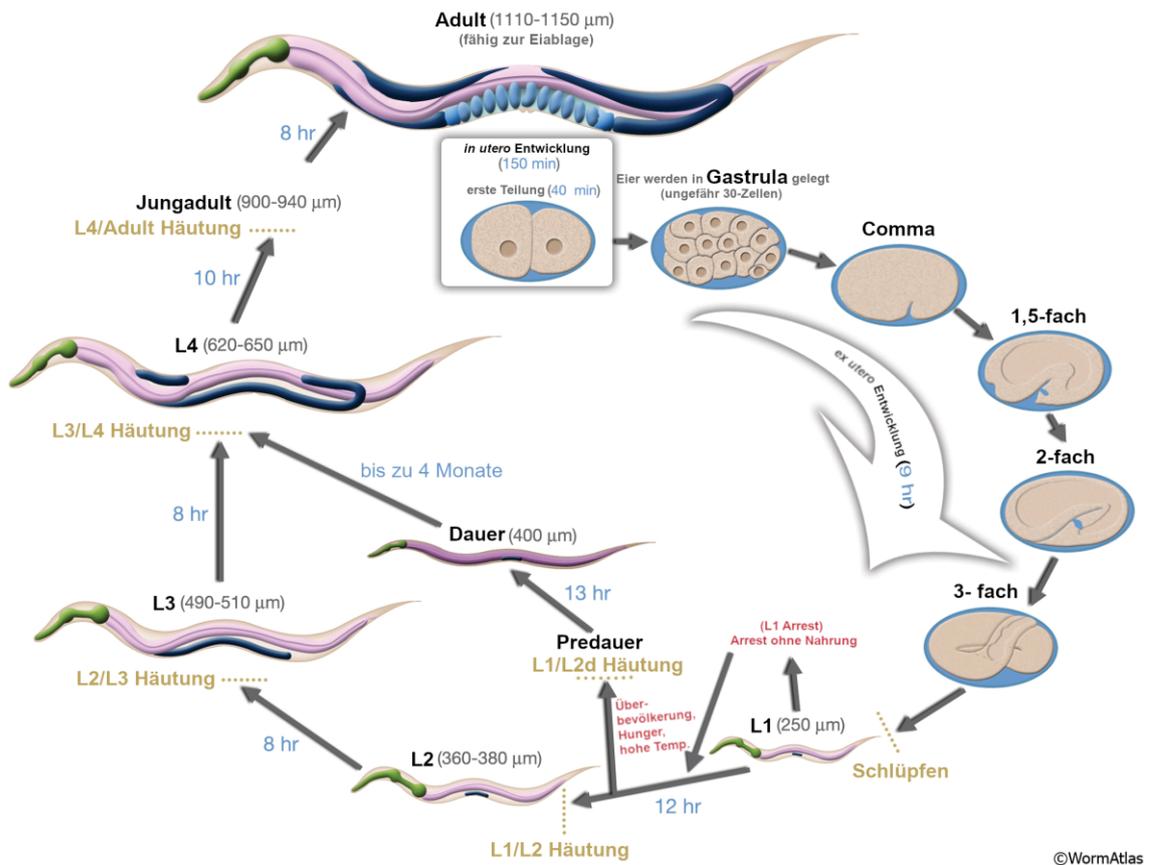


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *C. elegans* bei 22°C. Dargestellt ist die Entwicklung des adulten Hermaphroditen bei 22°C: Das abgelegte Ei durchläuft eine ca. 9-stündige *ex utero* Entwicklung, bevor das erste Larvenstadium, die L1 Larve, schlüpft. Bei optimalen Bedingungen entwickelt sich die L1 Larve innerhalb von ca. 46 Stunden zum adulten Hermaphroditen. Dabei durchläuft sie drei Larvenstadien (L2, L3 und L4), welche jeweils durch eine Häutung getrennt sind. Ohne Nahrung arretiert die L1 Larve, was als L1 Arrest bezeichnet wird. Bei anderen suboptimalen Umweltbedingungen wie Überbevölkerung, Hunger oder höheren Temperaturen entwickelt sich die L1 Larve kurz vor dem Eintritt in das L2-Larvenstadium zur Dauerlarve. Die Dauerlarve kann bis zu 4 Monate überleben und entwickelt sich bei Besserung der Bedingungen direkt zur L4 Larve und dann zum Adulten. Abbildung modifiziert nach Altun & Hall (2009).

Die frisch geschlüpfte L1 Larve besteht aus 558 Zellen, von denen 51 Zellen im Hermaphroditen Blasten sind, welche sich weiter teilen. In Anwesenheit von Nahrung beginnt die post-embryonale Entwicklung ca. 3 Stunden nach dem Schlüpfen. Ohne Nahrung arretiert die L1 Larve (L1 Arrest) und kann bis zu 10 Tage in diesem Stadium

überleben. Wird ihr in dieser Zeitspanne Nahrung präsentiert, tritt sie wieder in den gewöhnlichen Lebenszyklus ein und entwickelt sich weiter (Abb. 3) (Altun & Hall, 2009). Der Darm der L1 Larve besteht bereits aus 20 Zellen, welche aber noch mononukleär und diploid sind (Hedgecock & White, 1985). Zusätzlich besitzt die Larve schon einen funktionsfähigen Pharynx, welcher bereits vor dem Schlüpfen anfängt zu pumpen (Pilon, 2014). Während des L1 Stadiums beginnt zudem die Entwicklung des post-embryonalen Nervensystems und des Reproduktionssystems. Bei widrigen Umweltbedingungen wie zum Beispiel Nahrungsmangel, Überbevölkerung oder erhöhten Temperaturen entwickelt sich die L1 Larve zur Dauerlarve (Altun & Hall, 2009). Die Dauerlarve unterscheidet sich morphologisch von den anderen Larven. Sie hat eine spezielle Cuticula und der Pharynx ist durch einen internen Pfropfen blockiert und verengt. Dadurch ist sie besonders gut gegen widrige Umwelteinflüsse geschützt. Sie kann bis zu vier Monate überleben und entwickelt sich bei Besserung der Umweltbedingungen direkt zur L4 Larve (Abb. 3) (Hu, 2007). Bei günstigen Umweltbedingungen entwickelt sich die L1 Larve zur L2 Larve. Dieser Entwicklungsschritt dauert bei 22°C ca. 12 Stunden und ist durch die L1/L2 Häutung getrennt (Abb.3). Im L2 Stadium wird die Entwicklung des Nervensystems abgeschlossen (Altun & Hall, 2011). Die Entwicklung des Reproduktionssystems schreitet weiter voran, wobei die Elongation der Gonade beginnt. Nach ca. 8 Stunden bei 22°C entwickelt sich die L2 Larve zur L3 Larve. Dieser Entwicklungsschritt ist durch die L2/L3 Häutung getrennt (Abb. 3). Im L3 Stadium wird die allgemeine Struktur und Organisation der Gonade festgelegt. Auch die Elongation der Gonade schreitet weiter voran. Nach 8 Stunden entwickelt sich die L3 Larve durch die L3/L4 Häutung zur L4 Larve (Abb. 3). Während des L4 Stadiums wird die Gonadogenese abgeschlossen und die Keimzellen differenzieren in reife Spermien. Mit der L4/Adult Häutung ist (nach ca. 10 Stunden bei 22°) die Spermienproduktion abgeschlossen und es werden nur noch Oozyten produziert. Die gesamte *ex utero* Entwicklung bis zum fertilen Hermaphroditen dauert bei 22°C ca. 55 Stunden (Abb. 3) (Altun & Hall, 2009). Dieser kurze reproduktive Lebenszyklus ist einer der Vorteile von *C. elegans* als Modellorganismus. Weitere Vorteile, welche die Arbeiten mit *C. elegans* erleichtern, sind die einfache Kultivierbarkeit, die kurze Lebensspanne, seine Transparenz, das kleine und komplett sequenzierte Genome und die Verfügbarkeit von zahlreichen Reporterstämmen und Mutanten sowie RNA Interferenz (RNAi) - Bibliotheken (Sin et al., 2014). Insbesondere für die Alternsforschung sind die einfache Kultivierbarkeit, die kurze Generationszeit (3 Tage) und die kurze durchschnittliche Lebensspanne (bei 25°C ca. 14 Tage) von großem Vorteil (Johnson, 2003).

1.5 *C. elegans* als Modellorganismus in der Altersforschung

C. elegans ist ein beliebter Modellorganismus im Bereich der Altersforschung. Neben *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, Mäusen und Affen ist er einer der am häufigsten eingesetzten Modellorganismen in diesem Feld (Taormina *et al.*, 2019). So konnten mit *C. elegans* viele extrinsische und intrinsische Faktoren gefunden werden, welche die Lebensspanne beeinflussen. Darunter fallen zum Beispiel der IGF-1 (engl. *insulin/insulin-like growth factor 1*) Signalweg, TOR (engl. *target of rapamycin*), die mitochondriale Funktion und die kalorische Restriktion (CR, engl. *caloric restriction*) (Son *et al.*, 2019).

Der Einfluss des Insulin/IGF-1 Signalwegs auf die Lebensspanne ist evolutionär konserviert. Neben *C. elegans* hat der Insulin/IGF-1 Signalweg auch in *Drosophila melanogaster*, Mäusen, Hunden und im Menschen einen Einfluss auf die Lebensspanne (Kenyon, 2010). Auch die einzelnen Komponenten des Insulin/IGF-1 Signalwegs sind zwischen *C. elegans* und dem Menschen hochkonserviert (Abb. 4) (Christensen *et al.*, 2006). In *C. elegans* wird der Insulin/IGF-1 Signalweg über bestimmte Insulin-ähnliche Peptide (INS, engl. *INSulin related*) aktiviert, welche bei Kontakt mit Nahrung oder durch die chemosensorische Wahrnehmung von Nahrung ausgeschüttet werden (van Heemst, 2010). Diese Peptide sind Liganden der Rezeptor-Tyrosinkinase DAF-2 (engl. *abnormal DAuer Formation 2*, IGF1 Rezeptor im Menschen) (Abb. 4). In *C. elegans* gibt es 40 verschiedene INS Peptide, wobei 16 eine agonistische, 8 eine antagonistische, 5 eine neutrale und 11 eine Entwicklungsstadium- und Umwelt-abhängige Wirkung haben (Zheng *et al.*, 2018). Wird DAF-2 über ein agonistisch wirkendes INS aktiviert, führt dies zu einer Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-kinase AGE-1 (engl. *AGEing alteration 1*) (Abb. 4). AGE-1 phosphoryliert Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂), wodurch es zu Inositoltriphosphat (IP₃) wird (Abb. 4). IP₃ ist ein wichtiger membrangebundener *Second Messenger*, der die Kinase PDK-1 (engl. *PDK-class protein kinase 1*) bindet, welche daraufhin die Kinasen AKT-1, AKT-2 und SGK-1 (engl. *AKT kinase family 1/2* bzw. *Serum- and Glucocorticoid- inducible Kinase homolog 1*) phosphoryliert (Abb. 4). Der dadurch aktivierte AKT-1/AKT-2/SGK-1 Komplex phosphoryliert den Transkriptionsfaktor DAF-16, welcher durch diese Phosphorylierung inaktiviert wird und im Zytosol verbleibt (Abb. 4). Bindet dagegen ein antagonistisch wirkendes INS an DAF-2, zum Beispiel bei Stress, so wird DAF-16 nicht phosphoryliert und transloziert somit in den Nukleus, wo es die Transkription von Genen der Stressantwort bzw. von Langlebigkeit-assoziierten Genen aktiviert (Ewbank, 2006). DAF-16 ist der wichtigste *downstream* Effektor des Insulin/IGF-1 Signalwegs bzw. von DAF-2 (Ogg *et al.*, 1997). Daneben reguliert der AKT-1/AKT-2/SGK-1 Komplex allerdings auch die Aktivität des

Transkriptionsfaktors SKN-1 (engl. *skinhead 1*, NRF2 im Menschen), wobei wie bei DAF-16 die Inaktivierung über Phosphorylierung erfolgt. SKN-1 reguliert insbesondere Gene, welche bei oxidativem oder xenobiotischem Stress aktiviert werden (z. B. *gst-4*, engl. *Glutathione S-Transferase 4*) und kann so auch zur Lebensverlängerung beitragen (Ewbank, 2006).

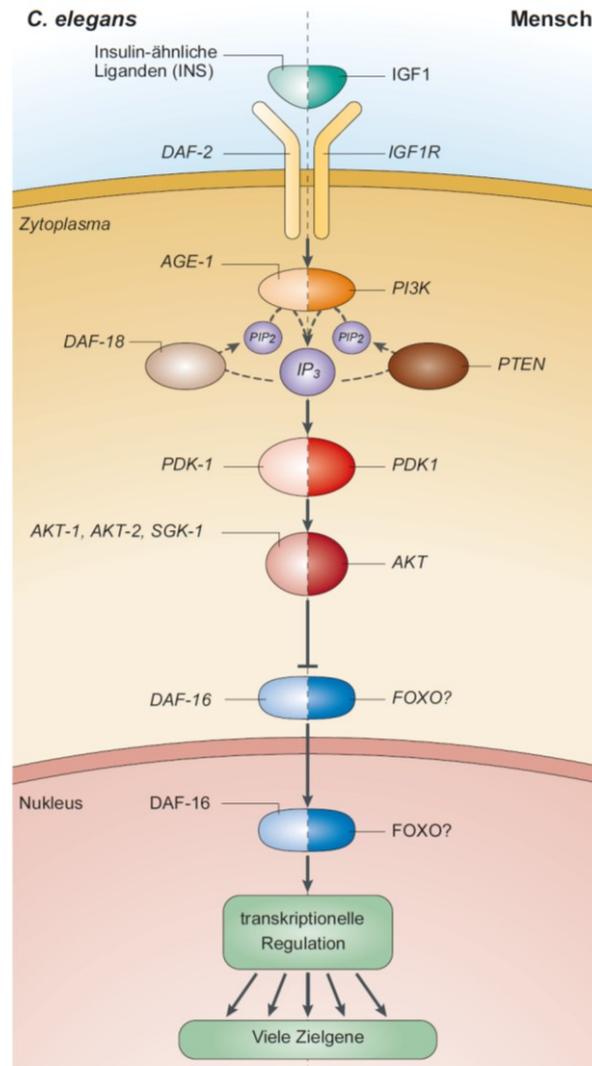


Abbildung 4: Vergleich des Insulin/IGF-1 Signalweges zwischen *C. elegans* und Mensch. Schematische Darstellung des Insulin/IGF-1 Signalweges in *C. elegans* und im Menschen. Ein agonistisch wirkender Insulin-ähnlicher Ligand (INS) in *C. elegans* bzw. IGF1 im Menschen bindet an DAF-2 bzw. den IGF1 Rezeptor (IGF1R). Daraufhin wird die Phosphatidylinositol 3-kinase AGE-1/PI3K aktiviert, welche Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) in Inositoltriphosphat (IP_3) umwandelt. Diese Umwandlung kann über die Phosphatase DAF-18/PTEN rückgängig gemacht werden, wodurch die Signalweiterleitung im Insulin/IGF-1 Signalweg gehemmt wird. IP_3 , ein membranengebundener *Second Messenger* (hier zur Vereinfachung im Zytosol abgebildet), bindet die Kinase PDK-1/PDK1, welche dadurch AKT-1, AKT-2 und SGK-1 bzw. AKT phosphoryliert. Der AKT-1/AKT-2/SGK-1 Komplex bzw. AKT phosphoryliert DAF-16/FOXO, wodurch dieses inaktiviert wird und im Zytosol verbleibt. Aktives DAF-16/FOXO dagegen transloziert in den Nucleus und reguliert die Expression von Zielgenen, wodurch hauptsächlich Stressresistenz und Langlebigkeit vermittelt werden. Abbildung modifiziert nach Christensen *et al.* (2006).

DAF-16 aktiviert vor allem Gene, welche an der thermalen Stressantwort (Hitzeschockproteine), der xenobiotischen Detoxifikation (Glutathion-S-Transferasen) oder der mikrobiellen Abwehr (bakterielle Lysozyme) beteiligt sind. Bis jetzt wurden 3396 Gene gefunden, welche durch DAF-16 reguliert werden, wobei 1733 inhibiert werden und 1663 aktiviert werden (Tullet, 2015). Prozesse, welche durch den Insulin/IGF-1 Signalweg bzw. DAF-16 reguliert werden, sind die Reproduktion, die Entwicklung (insbesondere die Entwicklung zur Dauerlarve), die Stressresistenz und der Fettstoffwechsel (Murphy & Hu, 2013). Eine Mutation von DAF-2, welche einen teilweisen Funktionsverlust des Rezeptors zur Folge hat, führt zu einer dauerhaft erhöhten Translokation von DAF-16 und kann dadurch die Lebensspanne von *C. elegans* bis zu verdoppeln (Kenyon *et al.*, 1993). Bei einem kompletten Funktionsverlust von DAF-2 entwickelt sich *C. elegans* grundsätzlich zur Dauerlarve (Torgovnick *et al.*, 2013). Auch im Menschen spielt das Homolog von DAF-16, FOXO3 (engl. *forkhead box O3*) eine wichtige Rolle bei der Langlebigkeit. So ist zum Beispiel das G Allel des FOXO3 Einzelnukleotid-Polymorphismus rs2802292 mit einer erhöhten FOXO3 Aktivität und einer daraus resultierenden Langlebigkeit assoziiert (Willcox *et al.*, 2016, Flachsbar *et al.*, 2017).

Neben der Regulation über DAF-2 gibt es in *C. elegans* noch eine Reihe weiterer Aktivatoren von DAF-16, welche unabhängig vom Insulin/IGF-1 Signalweg agieren und direkt auf DAF-16 einwirken. Einer davon ist die JNK-1 (engl. *Jun N-terminal Kinase 1*), welche DAF-16 durch Phosphorylierung aktivieren kann (Murphy & Hu, 2013). Die MAPK (engl. *Mitogen-activated protein kinase*) JNK-1 wird in *C. elegans* vor allem bei thermalem, aber auch bei oxidativem Stress aktiviert (Oh *et al.*, 2005, Wolf *et al.*, 2008). Dadurch führt eine durch JNK-1-vermittelte Aktivierung von DAF-16 zu einer erhöhten thermalen Stressresistenz und einer Lebensverlängerung in *C. elegans* (Oh *et al.*, 2005). Eine weitere Kinase, welche DAF-16 aktivieren kann, ist AAK-2 (engl. *AMP-activated kinase 2*, AMPK im Menschen). AMPK bzw. AAK-2 fungiert als Energie-Anzeiger der Zelle und wird bei steigendem AMP:ATP Verhältnis aktiviert (Apfeld *et al.*, 2004). In *C. elegans* spielt AAK-2 bei einer DAF-16 vermittelten Lebensverlängerung durch kalorische Restriktion (CR) eine wichtige Rolle (Greer *et al.*, 2007).

Kalorische Restriktion bzw. reduzierte Kalorienzufuhr, welche nicht zur Unterernährung führt, ist eine Intervention, welche bei vielen verschiedenen Spezies und wahrscheinlich sogar im Menschen die Lebensspanne verlängern kann (Lakowski & Hekimi, 1998). So konnte schon im Rhesusaffen gezeigt werden, dass reduzierte Kalorienzufuhr den Alterungsprozess verzögern und die Lebensspanne verlängern kann (Colman *et al.*,

2009). In *C. elegans* gibt es mehr als 20 verschiedene Wege, um kalorische Restriktion zu induzieren. Dies kann über Verdünnung der als Nahrung verwendeten Bakterien erfolgen, durch Behandlung mit Substanzen (sogenannte CR-Mimetika) oder durch Mutationen (z. B. *eat-2*, engl. *eating: abnormal pharyngeal pumping 2*). Mit Hilfe dieser Interventionen kann die Lebensspanne von *C. elegans* um bis zu 268 % verlängert werden. Häufig verwendet werden zum Beispiel *eat-2* Mutanten, bei welchen die Funktionalität des Pharynx eingeschränkt ist, wodurch die Nematoden grundsätzlich weniger Nahrung aufnehmen (Zhang & Mair, 2017). Für eine Langlebigkeit durch solch eine chronisch induzierte CR werden die Transkriptionsfaktoren SKN-1 und PHA-4 (engl. *defective Pharynx development 4*) benötigt, wohingegen DAF-16 für Langlebigkeit induziert durch kalorische Restriktion in mittelalten Nematoden oder durch Intervallfasten benötigt wird. Die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren vermittelt daraufhin eine erhöhte Stressresistenz (Uno & Nishida, 2016). Im Allgemeinen wird Langlebigkeit durch CR daher zum einen durch eine Aktivierung einer Stressantwort und einer daraus resultierenden erhöhten Stressresistenz und zum anderen durch eine reduzierte Produktion von endogenen Stressoren durch die verminderte Nahrungsaufnahme induziert. CR, welche nicht zur Unterernährung führt, wirkt demnach unter anderem als moderater Stressor und provoziert eine adaptive und vorteilhafte Stressantwort, wohingegen eine starke Einschränkung der Nahrungsaufnahme schädlich bis tödlich sein kann (Masoro, 2006).

Diese biphasische Dosis-Wirkungs-Beziehung einer Substanz oder eines Umweltfaktors, welche/welcher in geringen Dosen einen adaptiven und vorteilhaften Effekt und in höheren Dosen eine schädigende Wirkung auf eine Zelle oder einen Organismus hat, nennt man Hormesis (Mattson, 2008). Hormetische Effekte können in vielen Organismen bis hin zum Menschen beobachtet werden (Calabrese *et al.*, 2007). Neben CR kann auch durch die Umgebungstemperatur Hormesis in *C. elegans* ausgelöst werden. So führt eine sub-letale Hitzebehandlung in *C. elegans* zu einer erhöhten thermalen Stressresistenz und induziert Langlebigkeit (Cypser *et al.*, 2006). Daneben gibt es auch Substanzen, zum Beispiel Phytochemikalien (z. B. Wurzelextrakt von *Dioscorea alata*), welche Hormesis in *C. elegans* induzieren können (Govindan *et al.*, 2018). Zusätzlich können auch genetische Interventionen einen hormetischen Effekt verursachen. Insbesondere Interventionen, welche die mitochondriale Funktion beeinflussen, wodurch vermehrt moderate Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) produziert werden, welche in diesen geringen Konzentrationen eine adaptive Stressantwort auslösen. Eine verminderte mitochondriale Funktion, welche einen vorteilhaften Effekt auf eine Zelle oder einen Organismus hat,

nennt man Mitohormesis (Ristow & Schmeisser, 2014). So bewirkt zum Beispiel ein moderater *Knockdown* des mitochondrialen Proteins FRH-1 (engl. *FRataxin (involved in human Friedrich's ataxia) Homolog*) mittels RNAi eine Lebensverlängerung in *C. elegans*, wohingegen ein kompletter Ausfall des Proteins zu einem Entwicklungsarrest und einer verkürzten Lebensspanne führt (Schiavi *et al.*, 2013).

Zur Untersuchung des Einflusses von solchen genetischen, pharmakologischen oder umweltbezogenen Interventionen auf die Alterung ist die Analyse der Lebensspanne in *C. elegans* die populärste und am häufigsten eingesetzte Methode. Allerdings muss ein Individuum, welches älter als ein anderes wird, nicht zwangsläufig bei gleichem chronologischem Alter physiologisch jünger sein. Das bedeutet, dass ein längeres Leben nicht immer mit einer gesünderen Alterung einhergehen muss. Für die Untersuchung der physiologischen Alterung wird daher die Analyse von sogenannten Biomarkern der Alterung herangezogen. Mit Hilfe dieser Biomarker wird das physiologische Alter von chronologisch gleichaltrigen Populationen an bestimmten Zeitpunkten überprüft und verglichen. Ein wichtiges Kriterium solcher Biomarker ist, dass sie während des Alterns eine graduelle Veränderung durchlaufen. In *C. elegans* sind häufig eingesetzte Biomarker die Akkumulation des Alterspigments, die Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung oder die Abnahme der Pumpfrequenz des Pharynx (Son *et al.*, 2019). Die Akkumulation des Alterspigments wird indirekt über die Autofluoreszenz des Nematoden gemessen. Der Anstieg der blauen Fluoreszenz mit dem Alter wird in *C. elegans* schon seit geraumer Zeit als Biomarker für die physiologische Alterung verwendet (Klass, 1977, Davis *et al.*, 1982, Hosokawa *et al.*, 1994, Braeckman *et al.*, 2002, Gerstbrein *et al.*, 2005, Buchter *et al.*, 2013). Hauptverantwortlich für diesen Anstieg sind die autofluoreszenten Pigmente, welche in den Darm Granula von *C. elegans* akkumulieren (Collins *et al.*, 2008). Dabei emittieren diese Pigmente blaue Fluoreszenz bei 420-470 nm, wenn sie mit Wellenlängen im Bereich von 340-370 nm angeregt werden (Braeckman *et al.*, 2002). Hierbei können entweder wässrige Homogenate von Nematoden gemessen werden, oder die Fluoreszenz direkt *in vivo* im Darm bestimmt werden (Collins *et al.*, 2008). Aus welchen Bestandteilen die Alterspigmente in *C. elegans* bestehen, wird in der Forschungsgemeinschaft kontrovers diskutiert (Coburn & Gems, 2013). Eine Vermutung ist, dass die Quelle der Fluoreszenz Lipofuszin ist (Masse *et al.*, 2008, Minniti *et al.*, 2009). Lipofuszin akkumuliert in Lysosomen verschiedener Säugetierzellen und ist ein quervernetztes Aggregat, welches aus nicht-abbaubaren oxidierten Proteinen und Lipidclustern besteht (Jung *et al.*, 2007). Neben Lipofuszin werden auch AGEs (engl. *Advanced glycation end-products*) für die Zunahme der Fluoreszenzintensität verantwortlich gemacht (Gerstbrein *et al.*, 2005).

AGEs akkumulieren wie Lipofuszin altersabhängig und entstehen durch spontane Reaktionen, bei welchen ein Zucker an eine freie Aminogruppe eines Proteins bindet, gefolgt von Oxidation und Quervernetzung (Ulrich & Cerami, 2001). Darüber hinaus gibt es auch die Vermutung, dass es sich um ein Produkt des Kynurenin-Wegs handelt, Anthranilsäure (AA)-Glucosylester, welches in den Darm Granula von *C. elegans* akkumuliert und fluoresziert (Coburn *et al.*, 2013). Trotz der allgemeinen Unklarheit über den Ursprung der Fluoreszenz wird die Akkumulation des Alterspigments weiterhin von der Forschungsgemeinschaft als Biomarker für altersabhängige Veränderungen empfohlen (Collins *et al.*, 2008, Son *et al.*, 2019). Auch die Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung ist ein häufig verwendeter Biomarker für das physiologische Alter in *C. elegans* (Bolanowski *et al.*, 1981, Herndon *et al.*, 2002, Huang *et al.*, 2004). Dabei kann entweder die Anzahl der Ausschläge des Nematoden gezählt werden oder die provozierten Bewegungen werden einem zuvor definierten Bewertungsschema zugeordnet (Collins *et al.*, 2008).

Neben diesen physiologischen Biomarkern der Alterung gibt es transgene Marker, um das physiologische Alter in einem pathologischen Kontext zu betrachten. Insbesondere für neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Huntington gibt es bei *C. elegans* verschiedene Reporterstämme, welche die jeweiligen dazugehörenden aggregierenden Proteine (Amyloid beta für Alzheimer, α -Synuclein für Parkinson oder Polyglutamin (PolyQ) für Huntington) exprimieren. Bei vielen dieser Reporterstämme bilden sich altersabhängig unlösliche Aggregate dieser Proteine, wodurch sie als Marker für die physiologische Alterung verwendet werden können. Insgesamt bieten Biomarker der Alterung die Möglichkeit, Alterungsprozesse besser zu verstehen und potentielle Angriffspunkte für *Anti-Aging* Therapien (Son *et al.*, 2019).

Hinsichtlich *C. elegans*, Statinen und Alterungsprozessen wurde bisher nur in einer einzigen Studie gezeigt, dass niedrig dosiertes Fluvastatin die Lebensspanne in *C. elegans* verlängern kann. In dieser Studie wurden mitochondriale Modulatoren untersucht, wobei unter anderem auch Statine getestet wurden. Die molekularen Ursachen für die Lebensverlängerung wurde in dieser Studie jedoch nicht genauer untersucht. Allerdings wird diskutiert, dass diese Lebensverlängerung durch Statine im Cholesterol-auxotrophen Modellorganismus *C. elegans* vermuten lässt, dass auch die Protektion im Menschen teilweise Cholesterol-unabhängig sein könnte (Andreux *et al.*, 2014). Ansonsten wurde in *C. elegans* nur hochdosiertes Statin (vor allem Fluvastatin) eingesetzt, um adverse Statin-Effekte auszulösen und diese näher zu untersuchen. Hierbei wurde besonders der Einfluss von Statinen auf die Entwicklung, die Fertilität, den

Körperfettanteil, die Mitochondrien und die ungefaltete Protein-Antwort (UPR, engl. *unfolded protein response*) analysiert (Mörck *et al.*, 2009, Rauthan *et al.*, 2013, Ranji *et al.*, 2014).

1.6 Zielsetzung

Hypercholesterinämie ist einer der Risikofaktoren für Atherosklerose. Statine werden seit 1987 zur Therapie von Hypercholesterinämie eingesetzt und sind die am häufigsten verordneten Lipidsenker. Die Wirkung von Statinen beruht auf der kompetitiven Inhibition der HMG-CoA Reduktase, wodurch neben der Cholesterol-Biosynthese auch Cholesterol-unabhängige Prozesse gehemmt werden. Die Hemmung solcher Prozesse kann mitunter weitere protektive Statin-Effekte auslösen. Mit Bezug auf die Altersforschung zeigt sich zum Beispiel, dass eine Statin-Behandlung die Wahrscheinlichkeit des Todes innerhalb einer Gruppe von 70- bis 90- jährigen Cholesterol-unabhängig verringert, wobei die zugrunde liegenden molekularen Ursachen hierfür noch unbekannt sind (Jacobs *et al.*, 2013).

Vor diesem Hintergrund ist das Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen von niedrig dosierten Statinen auf den Alterungsprozess in *C. elegans* zu untersuchen, um dann ggf. Rückschlüsse auf die molekularen Ursachen der Cholesterin-unabhängigen Protektion durch Statine im Menschen zu ziehen. Der dazu verwendete Organismus *C. elegans* ist ein etablierter Modellorganismus in der Altersforschung, bei welchem Alters-assozierte Signalwege hochkonserviert sind. Im Hinblick auf unsere wissenschaftliche Frage ist es besonders wichtig, dass der Mevalonat-Syntheseweg bis zum Menschen gut konserviert ist, aber die Squalen-Synthase in *C. elegans* fehlt, und somit kein Cholesterol synthetisiert werden kann. Als Cholesterol-auxotropher Organismus ist *C. elegans* daher besonders gut geeignet, um die Cholesterol-unabhängigen und protektiven Effekte von Statinen zu untersuchen. Insgesamt leitet sich daraus die Arbeitshypothese ab, dass Statine in *C. elegans* über die Hemmung der Mevalonat-Synthese Einfluss auf Alters-assozierte Signalwege nehmen und dadurch den Alterungsprozess verlangsamen.

Im Fokus der Analyse steht vor allem die Analyse des Einflusses von Statinen auf die Lebensspanne und zwei ausgewählte Biomarker für die physiologische Alterung (Akkumulation des Alterspigments und die Abnahme in der Fähigkeit zur Körperbewegung). Weiterhin soll der Einfluss von Mevalonat sowie der Mevalonat-abhängigen Prozesse auf einen möglichen Effekt der Statine in Bezug auf die Alterung untersucht werden. Für die molekularen Untersuchungen werden Mutanten und Reporterstämme verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	VX-95	Systec, Linden
Binokular	Stemi 2000	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Feinwaage	ABS	Kern, Balingen
Fluoreszenzmikroskop	BFX 43	Olympus, Tokio, Japan
Gewebezerkleinerer	TissueLyser II	Qiagen, Hilden
Heizblock	-	VWR Peqlab, Radnor, USA
Inkubator	KT 115	Binder, Tuttlingen
Inkubator	KB 400	Binder, Tuttlingen
Inverses-Mikroskop	CKX 41	Olympus, Tokio, Japan
Kamera	XM-10	Olympus, Tokio, Japan
Magnetrührer	SU1150	Sunlab-Instruments, Mannheim
Reagenzglasschüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Spektralphotometer	Lambda 12	Perkin Elmar, Waltham, USA
Thermocycler, PCR	TP Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermocycler, RT-PCR	C1000/CFX96	Bio Rad, Hercules, USA
Ultra-Zentrifuge	Avanti J-25	Beckmann Coulter, Brea, USA
UV/Vis-Spektralphotometer	Nanodrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
Waage	1219 MP	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge	Microfuge 20	Beckmann Coulter, Brea, USA

2.2 Kits

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Kits.

Kit	Hersteller
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied biosystems, Foster City, USA
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SensiMix SYBR Hi-ROX	Bioline, London, England

2.3 Materialien, Chemikalien und Puffer

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Materialien, Chemikalien und Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
1 M KPO ₄ Puffer (pH 6)	108,3 g KH ₂ PO ₄ 35,6 g K ₂ HPO ₄ ad 1 l mit dH ₂ O	-
1,5 ml Reaktionsgefäße	-	Sarstedt, Nümbrecht
100 x 20 mm Petrischalen	-	Greiner Bio-One, Krebsmünster, Österreich
12-Loch-Zellkulturschalen	-	Greiner Bio-One, Krebsmünster, Österreich
15 ml Röhrchen	-	Greiner Bio-One, Krebsmünster, Österreich
2 ml Cryovials	-	Greiner Bio-One, Krebsmünster, Österreich
2 ml Reaktionsgefäße	-	Eppendorf, Hamburg

35 x 10 mm Petrischalen	-	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
50 ml Röhrchen	-	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
60 x 15 mm Petrischalen	-	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
6-Loch- Zellkulturschalen	-	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
96-Loch- Zellkulturschalen	-	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Ampicillin	-	Sigma-Aldrich, St- Louis, USA
Bacto-Agar	-	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
BSA	-	PAN-Biotech, Aidenbach
BSA/Streptomycin	5 g BSA 250 ml 100 mg/ml Streptomycin ad 50 ml S-Medium	-
CaCl ₂	-	Merck, Darmstadt
Deckgläser (24 x 32 mm)	-	Engelbrecht, Edermünde
Farnesyl- pyrophosphat	-	Sigma-Aldrich, St- Louis, USA
Floxuridine	-	Sigma-Aldrich, St- Louis, USA
Fluvastatin (PHR1620)	-	Sigma-Aldrich, St- Louis, USA
Gernaylgeranyl- pyrophosphat	-	Sigma-Aldrich, St- Louis, USA

Hefeextrakt	-	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
IPTG		Sigma-Aldrich, St- Louis, USA
K ₂ HPO ₄	-	Merck, Darmstadt
Kaliumzitrat	-	Sigma-Aldrich, St- Louis, USA
KH ₂ PO ₄	-	Merck, Darmstadt
LB-Medium	10 g Bacto-Pepton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l mit dH ₂ O	-
Lösung mit Spurenelementen	1,86 g disodium EDTA 0,69 g FeSO ₄ • 7 H ₂ O 0,2 g MnCl ₂ • 4 H ₂ O 0,29 g ZnSO ₄ • 7 H ₂ O 0,025 g CuSO ₄ • 5 H ₂ O ad 1 l mit dH ₂ O	-
Lösung zum Einfrieren	5,85 g NaCl 6,8 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l mit dH ₂ O	-
	-Autoklavieren- 3 ml 1 M MgSO ₄	
Lovastatin (PHR1285)	-	Sigma-Aldrich, St- Louis, USA
M9-Puffer	3 g KH ₂ PO ₄ 6 g Na ₂ HPO ₄ 5 g NaCl 1 ml 1 M MgSO ₄ ad 1 l mit dH ₂ O	-
Mevalonat		Sigma-Aldrich, St- Louis, USA
MgSO ₄	-	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	-	Sigma-Aldrich, St- Louis, USA

NaCl	-	VWR, Radnor; USA
NaN ₃	-	Sigma-Aldrich, St-Louis, USA
NGM-Agar	<p>20 g Bacto-Agar 3 g NaCl 2,5 g Soja Pepton ad 1 l mit dH₂O</p> <p>-Autoklavieren- 25 ml 1 M KPO₄ Puffer (pH 6) 500 µl 1 M CaCl₂ 1 ml 1 M MgSO₄</p> <p>1 ml 5 mg/ml Cholesterol in EtOH</p> <p>weitere Zusätze: 500 µl 100 mg/ml Streptomycin 1 ml 100 mg/ml Ampicillin 1 ml 12,5 mg/ml Tetracyclin 2 ml 0,5 M IPTG 1 ml 25 µM Floxuridine</p>	-
Objektträger (76 x 26 mm)	-	Engelbrecht, Edermünde
S-Basal	<p>5,95 g NaCl 1 g K₂HPO₄ 6 g KH₂PO₄ 1 ml 5 mg/ml Cholesterol in EtOH ad 1 l mit dH₂O</p>	-
Simvastatin (PHR1438)	-	Sigma-Aldrich, St-Louis, USA
S-Medium	<p>974 ml S-Basal 10 ml 1 M Kaliumzitrat (pH 6) 10 ml Lösung mit Spurenelementen 3 ml 1 M CaCl₂ 3 ml 1 M MgSO₄</p>	-
Soja Pepton	-	Sigma-Aldrich, St-Louis, USA
Streptomycin	-	Sigma-Aldrich, St-Louis, USA

Synchronisationslösung	300 µl 13 % NaOCl 200 µl 4 M NaOH	-
Tetracyclin	-	Sigma-Aldrich, St-Louis, USA
Ubichinon		Sigma-Aldrich, St-Louis, USA

2.4 *C. elegans* Stämme

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten *C. elegans* Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle und Spender
AM140	rmls132 [unc-54p::Q35::YFP]	Caenorhabditis Genetics Center (CGC) Morimoto
AM141	rmls133 [unc-54p::Q40::YFP]	CGC Morimoto
CB1370	daf-2(e1370) III.	CGC Hodgkin
CF1038	daf-16(mu86) I.	CGC Kenyon & Kin
LD001	ldIs7 [skn-1b/c::GFP + rol-6(su1006)]	CGC Blackwell
N2	Wildtyp	CGC Hodgkin
QC114	etEx2 [(pQC09.6) glo-1p::GFP::ras-2 CAAX + (pRF4) rol-6(su1006)]	CGC Mörck
SJ4005	zcls4 [hsp-4::GFP] V.	CGC Ron
SJ4058	zcls9 [hsp-60::GFP + lin-15(+)].	CGC Ron
SJH1	zls356 [daf-16p::daf-16a/b::GFP + rol-6] jnk-1(gk7) IV.	Kreuzung, Andreas Jahn

TJ356	zls356 [daf-16p:: <daf-16a +="" b::gfp="" rol-6]<="" td=""> <td>CGC Johnson</td> </daf-16a>	CGC Johnson
VC8	jnk-1(gk7) IV.	CGC Moerman

2.5 Verwendete Software

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Software.

Software	Hersteller
Microsoft Office 2013/2019	Microsoft, Redmond, USA
ImageJ 1.52	National Institutes of Health, Bethesda, USA
PASW Statistics 18	IBM, Armonk
Bio-Rad CFX Manager	Bio Rad, Hercules, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, San Diego, USA
cellSens Dimension	Olympus, Tokio, Japan

2.6 Kultivierung von *C. elegans*

Die verschiedenen *C. elegans* Stämme wurden in Petrischalen kultiviert, welche mit NGM-Agar (engl. *Nematode Growth Media*) befüllt waren. Als Nahrungsquelle wurden OP50⁻¹ Bakterien verwendet. OP50⁻¹ ist ein *E. coli* Stamm, welcher resistent gegen Streptomycin und Uracil-auxotroph ist, sodass sein Wachstum auf NGM-Agar begrenzt ist (Brenner, 1974). Zur Stammerhaltung wurden die Stämme jeweils Montag und Freitag auf frische NGM-Agarplatten umgesetzt. Zur Kultivierung in Flüssigmedium wurde S-Medium und als Nahrungsquelle hitzeinaktivierte OP50⁻¹ verwendet. S-Medium, welches mit OP50⁻¹ versetzt ist, nennt man S-Medium_K (S-Medium Komplett). Die Hitzeinaktivierung der Bakterien wurde bei 65°C für 15 Minuten durchgeführt. Um Kontaminationen vorzubeugen, wurde Streptomycin (10 mg/ml) gelöst in 5 % BSA hinzugegeben. BSA vermittelt eine bessere Aufnahme von Lovastatin.

2.7 Ansetzen einer OP50⁻¹ Bakterienkultur

Das Ansetzen einer OP50⁻¹ Bakterienkultur erfolgte unter semisterilen Bedingungen. 200 ml LB-Medium wurden in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit 100 µl Streptomycin

(100 mg/ml) versetzt. Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurde eine OP50⁻¹ Einzelkolonie von einer NGM-Agarplatte gepickt und in das LB-Medium überführt. Die Kultur wurde bei 37°C über Nacht (maximal 18 h) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien pelletiert (4400 rpm/10 min/Raumtemperatur (RT)) und in M9-Puffer suspendiert.

35 µl dieser Bakteriensuspension wurden auf je eine NGM-Agarplatte gegeben und mit Hilfe des Drigalskispatels ausgestrichen. Die beimpften Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert und bei 4°C gelagert (max. 4 Wochen). Zur Verwendung als Nahrungsquelle im Flüssigmedium wurde die optische Dichte (OD) der Bakterienkultur bestimmt. Anschließend wurde mittels der OD₆₀₀ die Konzentration der Bakterienkultur bestimmt und auf 2*10⁹ Zellen/ml eingestellt.

$$\frac{2,5}{x_{OD600}} = y \text{ } \mu\text{l/ml}$$

2.8 Bleiche-Synchronisation

Für die Bleiche-Synchronisation wurden gut bewachsene Platten mit vielen graviden Adulten verwendet. Jede Platte wurde mit ca. 2500 µl M9-Puffer ab gespült und ca. 1,2 ml davon in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Danach folgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei 5000 rpm und RT, damit die adulten Tiere auf den Boden des Reaktionsgefäßes absinken. 80 % des Überstandes wurden anschließend abgenommen und verworfen. 500 µl einer frisch angesetzten Synchronisationslösung wurde auf das Pellet gegeben und mit M9-Puffer auf 1500 µl aufgefüllt. Die Tiere wurden für 3-4 Minuten bei gelegentlichem Verwirbeln inkubiert und anschließend pelletiert (5000 rpm/2 min/RT). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Danach wurde das Pellet mit 1 ml M9-Puffer eingelöst und erneut pelletiert (5000 rpm/2 min/RT). Der Überstand wurde wiederum abgenommen und das Pellet wiederum in 1 ml M9-Puffer eingelöst. 50 µl des Embryonen/M9-Puffer-Gemischs wurden auf eine frische NGM-Agarplatte gegeben, um mittels mikroskopischer Kontrolle die Anzahl an Embryonen pro 50 µl abzuschätzen. Die gewünschte Menge an Embryonen wurde dann hinzupipettiert. Die angesetzten Platten wurden für ca. 72 h bei 20°C inkubiert.

2.9 Ei-Ablage-Synchronisation

Neben der Bleiche-Synchronisation wurde auch die Ei-Ablage-Synchronisation verwendet. Hierfür wurden 100 gravide Adulte auf eine frische NGM-Agarplatte umgesetzt und für 2 h bei 20°C inkubiert. Danach wurden die Adulten Nematoden entfernt und die Platten mit den abgelegten Embryonen für ca. 72 h bei 20°C inkubiert.

2.10 Bestimmung der Fertilität

Zur Bestimmung des Einflusses von Simva- und Fluvastatin auf die Fertilität wurden 35 mm NGM-Agarplatten, welche mit dem entsprechenden Statin versetzt waren, verwendet. Auf jede Platte wurde eine L4-Larve überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 20°C. Jeden Tag wurden die Adulten auf frische NGM-Agarplatten überführt. Danach wurden die alten Platten für weitere 24 h bei 20 °C inkubiert und anschließend die Nachkommen mit Hilfe des Binokulars ausgezählt. Dabei wurde die Anzahl der Nachkommen sowie die Anzahl der nicht geschlüpften Embryonen bestimmt. Dieser Vorgang wurde über die gesamte reproduktive Phase von *C. elegans* (fünf Tage lang) wiederholt.

2.11 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden ca. 5000 synchronisierte L4 Larven pro Bedingung verwendet. Nach der entsprechenden Behandlung erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA. Die Nematoden wurden entweder mit M9 ab gespült (NGM-Agarplatten) oder mit Hilfe der Pipette aufgenommen (S-Medium) und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Tiere dreimal mit kaltem M9 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand abgenommen und 600 µl RLT-Puffer (versetzt mit 10 µl/ml Dithiothreitol) hinzugegeben, um die RNA nach dem Zellaufschluss zu stabilisieren. Anschließend wurden die Nematoden mit Hilfe des Tissue Lysers (Qiagen, Hilden) bei 30 Hz und RT für 2 Minuten lysiert. Das Lysat wurde auf Shredder Säulen (Qiagen, Hilden) gegeben und bei 15000 rpm für 3 Minuten bei RT zentrifugiert. Ab diesem Schritt wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll isoliert. Auch der optionale DNA-Verdau wurde durchgeführt. Konzentration und Qualität der RNA wurden mittels eines UV/Vis-Spektralphotometer bestimmt. Die Qualität der RNA wird hierbei über die Absorptionsverhältnisse A260/A280 und A260/A230 überprüft. Das Absorptionsverhältnis A260/A280 ist ein Indikator für die Kontamination mit Proteinen. Ob die Probe mit Zuckern, Salzen oder Phenolresten kontaminiert ist, kann über das Absorptionsverhältnis A260/A230 bestimmt werden. Das Absorptionsverhältnis einer RNA mit hohem Reinheitsgrad liegt bei 2 (A260/A280) bzw. 2 - 2,2 (A260/A230).

2.12 cDNA-Synthese

Zur Synthese von 500-2000 ng cDNA wurde das Omniskript RT Kit (Qiagen, Hilden) oder das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied biosystems, Foster City, USA) verwendet. Bei beiden Kits wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

2.13 Real-Time-RT-PCR

Die Real-Time-RT-PCR wurde mit Hilfe des SensiMix SYBR & Fluorescein Kit (Bioline, London, England) in einer 96er-Mikrotiterplatte durchgeführt. Pro Vertiefung einer 96er-Mikrotiterplatte galten folgenden Bedingungen:

20 µl Reaktionsvolumen

50% SensiMix SYBR & Fluorescein Mix

20 ng cDNA

250 nM Primerkonzentration

Die verwendeten Primer wurden entweder über Sigma-Aldrich (KiCqStart® SYBR® Green Primers) bezogen, oder mit Hilfe des NCBI Primer Blast selbst entworfen und bei Eurofins Genomics bestellt. Die PCR-Effizienz für die jeweiligen Primerpärchen wurde mit Hilfe des Programms LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2009) berechnet. Die PCR-Effizienz gibt an, wie nah eine Reaktion an die optimalen Amplifikationsbedingungen herankommt. Bei optimalen Bedingungen verdoppelt sich die Produktmenge mit jedem PCR-Zyklus (Effizienz =100 %). Das Programm LinRegPCR berechnet die PCR-Effizienz Werte auf Grundlage der einzelnen Amplifikationskurven.

Tabelle 6: Sequenzen und Effizienzen der eingesetzten Primer für die RTqPCR.

Gen	Sequenzen	Effizienz (%)
<i>aak-2</i>	Fwd: AGGTTATTAGCGGAAAGTTG Rev: TTCCACAAAGAAGTGCATAC	93,0
<i>act-1</i>	Fwd: GCTCTTGTTGTAGACAATGG Rev: GGGTAAGGATACCTCTCTTG	90,1
<i>ama-1</i>	Fwd: GGCTATGGAAAGTGTAATGG Rev: GTGAGGTCCATTCTGAAATC	88,8
<i>B0024.13</i>	Fwd: CCAAATTACCTCAGCTTCAC Rev: TCCTCTAGGACCTTTTCTTG	98,2
<i>cdc-42</i>	Fwd: AGCCATACACATTAGGAT Rev: AGAAGCAAACAAGAAACA	94,9
<i>coq-1</i>	Fwd: AATGTCAACAACCTCCAACAG Rev: GATCCATCTGCAAGAATAGC	94,5
<i>coq-2</i>	Fwd: CAAACTCATGGATGGGAATC Rev: TTGTTTTCTCGTCCTCTTTC	95,9
<i>cyb-1</i>	Fwd: AAAAGGATAGCCTCCAGATG Rev: TGATTCTCTGTGACTTTTGC	92,1

<i>cyp-14A3</i>	Fwd: GATGAAGAAGTCGTAAGC Rev: AAGTGAGTTAGAGGTTGT	93,4
<i>cyp-13A4</i>	Fwd: CAACACATCCAGAGATTCAG Rev: ACTTTCGGTTGTGAACTAAG	92,7
<i>cyp-13A7</i>	Fwd: ATTTGGTCATTCTGGATTCTG Rev: CAGGTCCGTATTTCTTTGTC	92,2
<i>cyp-33C2</i>	Fwd: ACAATTACATGGGCAATCAG Rev: GTTGCGCTTCATTGATAAAC	96,2
<i>cyp-33E1</i>	Fwd: TTTCGGAGGATTTGAAATGG Rev: TGCCCAATTGAGAGTATTTG	94,0
<i>cyp-35A2</i>	Fwd: GACATCTTAGCCTTACTG Rev: TGTGAACTCCTTATTGATT	90,5
<i>daf-16</i>	Fwd: AACTGATCAAATGCGTATCG Rev: AATTGGTTCCGTCTTAATCG	89,5
<i>daf-2</i>	Fwd: AGTACGCATTGATGAATC Rev: TCTCCACATAATCTCCAT	95,7
<i>fdps-1</i>	Fwd: ATATTCTACGTCTCGCATTG Rev: CAGGAACTGTCCAATCAAC	96,4
<i>fnta-1</i>	Fwd: TCTACGATAAGACGGAGGAT Rev: AGGTAGTTCCAGGCACTT	88,1
<i>fntb-1</i>	Fwd: CTCAAGCACTGAACAGAAAC Rev: ATGTTTCTGACGGAAAATCG	95,4
<i>ggtb-1</i>	Fwd: GTGGAGATTTATCTGGAGAAG Rev: CAGTCGACCAAGTAAATGAC	93,2
<i>gro-1</i>	Fwd: CGAGAACATCATCAGAATCG Rev: TTTTCGGATTCCAGTTTCTC	98,2
<i>hmgr-1</i>	Fwd: CGGCGAGAGATGCTGTTTCT Rev: GAAACTCTTGACGAGCCCGA	92,6
<i>hsp-16.1</i>	Fwd: GGACATACATTATCAATTCAAGGA Rev: GCACCAACATCAACATCTT	99,6
<i>hsp-16.2</i>	Fwd: CCATCTGAGTCTTCTGAG Rev: TCTCCTTGGATTGATAGC	94,0
<i>jnk-1</i>	Fwd: GTGGACACCTCAACAATT Rev: ACTGATTGGCAACTATCC	91,5

<i>M57.2</i>	Fwd: CCTGGCATTATAGATCAATCG Rev: IGTATAGGTCCATGCACTTTG	93,3
<i>nuc-1</i>	Fwd: AGACTATGGCTGGATATTCCG Rev: TGTACTACCAACGTGAATTG	95,0
<i>pmp-3</i>	Fwd: GAGTCACTCATCGTGTTATG Rev: TCAGAAGCAATAACGACAAC	92,1
<i>sir-2.1</i>	Fwd: ATCAAATGCCGATTCAGAAG Rev: TTTCGATCCTCGTCAGATAG	89,1
<i>skn-1</i>	Fwd: GAGACGACGTCAATTTATGG Rev: GATCGTATGACGATGATTGG	93,7
<i>smk-1</i>	Fwd: GGACACAAAAGAGGTATCTG Rev: AGGCTTTCCTTGTCATTTTC	90,2
<i>vit-5</i>	Fwd: AGGAAACTGAGAAGGAACTC Rev: TGAAACGGATCTTCTTGTTG	97,5
Y48E1B.3	Fwd: TAATACGATCGAAATCGAGTCAACA Rev: TCATTTTCTCCAAGAATTGGCTCT	94,9

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem C1000/CFX96 Thermocycler (Bio Rad, Hercules, USA) nach folgendem Protokoll:

Tabelle 7: PCR-Programm der Real-Time-RT-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Aktivierung	95°C	10 Min
2. Denaturierung	95°C	15 Sek
3. Annealing der Primer	55°C	15 Sek
4. Elongation	72°C	17 Sek
5. Finale Denaturierung	95°C	1 Min
6. Abschluss	55°C	1 Min
7. Schmelzkurvenbestimmung	65-95°C	1°C/5 Sek

Die Schritte 2 bis 4 wurden 44 Mal wiederholt.

Bei der *Real-Time* PCR wird die DNA-Produktmenge in Echtzeit nach jedem PCR Zyklus fluoreszenz-photometrisch bestimmt. In dieser Arbeit wurde SYBR Green verwendet, welches in die DNA interkaliert und blaues Licht bei einer Wellenlänge von maximal 498 nm absorbiert und grünes Licht bei einer Wellenlänge von maximal 522 nm emittiert. Der Zyklus, an dem die Fluoreszenzintensität bzw. die Produktmenge erstmals exponentiell einen definierten Hintergrundwert übersteigt, wird als CT-Wert (engl *cycle threshold*, Schwellenwert-Zyklus) bezeichnet. Je mehr cDNA des Transkripts zu Beginn der Reaktion vorhanden ist, umso schneller wird der Schwellenwert-Zyklus erreicht. So können bei ähnlicher PCR-Effizienz mit Hilfe der CT-Werte die Ausgangsmengen von cDNA der einzelnen Transkripte verglichen werden. Mit Hilfe des Bio-Rad CFX Manager (Bio Rad, Hercules, USA) wurden die Δ CT-Werte ausgewertet. Die mRNA Menge wurde auf die Kontrolle (=1) bezogen. Um die $\Delta\Delta$ CT-Werte zu generieren und normalisieren, wurden fünf Referenzgene (*cyb-1*, *ama-1*, *pmp-3*, *cdc-42* und *act-1*) verwendet. Nur die Amplifikate mit spezifischer Schmelzkurve und einem maximalen Schwellenwert-Zyklus von 35 wurden für die Analyse berücksichtigt.

2.14 RNA Interferenz über Fütterung („RNAi feeding“)

Die RNAi erfolgte über Fütterung von *E. coli* Bakterien des Stammes HT115. HT115 Bakterien sind resistent gegen Tetracyclin. Zusätzlich sind sie RNAse III defizient und wurden mit einem Plasmid, auf welchem sich eine Ampicillin Resistenz und die Zielsequenz des zu untersuchenden Gens befindet, transformiert. Die Expression der dsRNA (engl. *double stranded RNA*) steht unter der Kontrolle von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Durch die Fütterung dieser Bakterien an *C. elegans* wird die dsRNA in siRNAs (engl. *small interfering RNA*) geschnitten und im Körper von *C. elegans* verteilt. Die Bakterienklone stammen aus der Ahringer *C. elegans* RNAi Kollektion (Source BioScience, Nottingham, England) und das Insert für das jeweilige *gene of interest* wurde vor der Verwendung sequenziert, um die Sequenz zu bestätigen.

Für ein RNAi Experiment wurde eine Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienklons bei 37°C angesetzt. Dazu wurde LB-Medium mit Ampicillin (100 μ g/ml Ampicillin,) und Tetracyclin (12 μ g/ml Tetracyclin) versetzt. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ der Übernachtskultur bestimmt und auf eine OD₆₀₀ von 0,9 eingestellt. Zur Verdünnung wurde LB-Medium verwendet. Danach wurden je 150 μ l der auf eine OD₆₀₀ von 0,9 eingestellten Kultur auf eine *Feeding*-NGM-Agarplatte (100 μ g/ml Ampicillin, 12 μ g/ml Tetracyclin und 1 mM IPTG) gegeben. Die beimpften *Feeding*-Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten entweder direkt verwendet oder bis zu drei Wochen bei 4°C gelagert.

2.15 Quantifizierung der pharyngealen Pumpfrequenz

Für das Experiment mit Vorinkubation wurden synchronisierte L4 Larven 24 h mit 100 μM Lovastatin oder mit 0.2 % DMSO behandelt. Für das Experiment ohne Vorinkubation wurden unbehandelte ein Tag alte Adulte verwendet. Die Nematoden wurden zweimal in M9-Puffer gewaschen und für 2 h in M9 gehungert. Die Messung der pharyngealen Pumpleistung wurde mit Hilfe des Nematrix The ScreenChip™ System durchgeführt. Dabei wurde die Pumpleistung in Anwesenheit von OP50 und 100 μM Lovastatin bzw. 0,2 % DMSO bestimmt. Für jedes Tier wurde die Pumpfrequenz für zwei Minuten aufgezeichnet.

2.16 Chemotaxis-Assay

Für den Chemotaxis-Assay wurden große Petrischalen (10 cm Durchmesser) und L4 Larven aus einer Ei-Ablage-Synchronisation verwendet. In *C. elegans* spielt Chemotaxis eine wichtige Rolle bei der Suche nach Nahrungsquellen oder zur Vermeidung von toxischen Substanzen. Mit Hilfe des Assays können sowohl Einschränkungen des chemotaktischen Verhaltens, verursacht durch Mutationen oder Behandlungen mit Substanzen als auch die chemotaktische Antwort von *C. elegans* auf Substanzen getestet werden. Die Petrischale wurde mit 20 ml NGM Agar, ohne NaCl, Bactopecton und Cholesterol, befüllt. Jede Platte wurde in vier Quadranten (A, B, C und D) unterteilt, wobei sich A und B sowie C und D gegenüberstanden. In einem Abstand von 1,5 cm zum Rand wurde in jedem Quadrant mittig 1 μl 1 M NaN_3 Lösung aufgetragen. Nachdem der Tropfen NaN_3 getrocknet war, wurde auf dieselbe Stelle 1 μl 100 μM Lovastatin (Quadrant A und B) bzw. 1 μl 0,2 % DMSO (Quadrant B und C) gegeben. Danach wurden ungefähr 100 L4 Larven in die Mitte der Platte pipettiert und die überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier entfernt. Innerhalb eines Radius von 2 cm um die aufgetragenen Lösungen wurde nach 2 Stunden die Anzahl der Tiere pro Quadrant bestimmt. Mit diesen Werten wurde der chemotaktische Index (CI) wie hier angegeben berechnet:

$$CI = \frac{(A + B) - (C + D)}{A + B + C + D}$$

Ein chemotaktischer Index von 1 bedeutet, dass die getestete Substanz attraktiv auf *C. elegans* wirkt. Bei einem CI von -1 wirkt die Substanz als Repellent und bei einem CI von 0 ist sie weder attraktiv noch repulsiv.

2.17 Analyse der Lebensspanne

Für die Analyse der Lebensspanne wurden synchronisierte L4 Larven verwendet. Dazu wurden jeweils 30 L4 Larven mit der entsprechenden Lovastatin- oder DMSO-Konzentration bei 20°C in S-Medium_K inkubiert. Aufgrund der besseren Löslichkeit von Fluva- und Simvastatin konnten für die entsprechenden Lebensspannenanalysen NGM-Agarplatten verwendet werden. Auch die RNAi-Experimente wurden auf NGM-Agarplatten durchgeführt. Innerhalb der reproduktiven Phase (ca. 7 Tage) wurden die Tiere alle zwei Tage umgesetzt. Danach nur noch nach Bedarf. Für den ersten Wochenübergang (Freitag bis Montag) wurde Floxuridine (1:1000, FUDR) hinzugegeben. FUDR inhibiert die DNA-Synthese, was zu einer geringeren Fertilität der Adulten und einem Entwicklungsarrest der Larven führt. Somit wurde gewährleistet, dass sich die Nachkommenschaft mit den Alters-synchronen Tieren nicht vermischt. Jeden Tag erfolgte die Lebend-tot-Bestimmung durch Antippen mit einem Platindraht. Erfolgte auf das Antippen eine wahrnehmbare Bewegung des Individuums, wurde dieses für lebendig erklärt. Für die Analyse der postreproduktiven Lebensspanne wurde mit der Lovastatin-Behandlung an Tag 8 begonnen.

2.18 Analyse der Akkumulation des Alterspigments

Für die Analyse der Akkumulation des Alterspigments wurden synchronisierte L4 Larven verwendet. Dazu wurden jeweils 45 L4 Larven mit der entsprechenden Lovastatin- oder DMSO-Konzentration bei 20°C in S-Medium_K inkubiert. Für RNAi Experimente wurden die Nematoden auf NGM-Agarplatten inkubiert. Die Tiere wurden jeden zweiten Tag umgesetzt. Für den ersten Wochenübergang (Freitag bis Montag) wurde FUDR (1:1000) hinzugegeben. Somit wurde gewährleistet, dass sich die Nachkommenschaft mit den Alters-synchronen Tieren nicht vermischt. An Tag 4, 8 und/oder 10 der adulten Lebensphase wurde bei mindestens 10 Individuen eines Ansatzes die Akkumulation des Alterspigments fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Extinktion: 360-370 nm und Emission: 420-460 nm). Die Fluoreszenzintensität des Alterspigments im Darm wurde mit Hilfe des Programms ImageJ bestimmt.

2.19 Bestimmung der Viabilität nach thermalem Stress

Für die Bestimmung der Viabilität nach thermalem Stress wurden synchronisierte L4-Larven verwendet. Dazu wurden L4-Larven für 24 h mit der entsprechenden Simvastatin- oder DMSO-Konzentrationen bei 20°C auf Agarplatten inkubiert. Nach der Vorinkubation wurden die Nematoden auf neue Agarplatten, ohne DMSO oder Simvastatin überführt und für 8 h bei 35°C inkubiert. Nach der entsprechenden

Inkubationszeit wurde die Anzahl der lebenden und toten Individuen bestimmt. Die Lebend-tot-Bestimmung erfolgte durch Antippen mit einem Platindraht. Erfolgte auf das Antippen eine wahrnehmbare Bewegung des Individuums, wurde dieses für lebendig erklärt.

2.20 Quantifizierung des Prenylierungsreporter RAS-2::GFP::CAAX

Für die Untersuchung der Protein-Prenylierung wurde der Reporterstamm QC114 verwendet. Dieser Reporterstamm trägt ein Plasmid mit der genetischen Information für die kleine GTPase RAS-2, welche GFP markiert ist und am C-Terminus des GFPs ein CAAX Prenylierungsmotiv besitzt. Dieses Transgen wird über einen Darm-spezifischen Promotor (*glo-1* Promotor) reguliert und dadurch nur im Darm exprimiert. Durch Prenylierung wird das Fusionsprotein in der Zellmembran der Darmzellen verankert, wodurch sich das GFP-Signal an der Zellmembran anreichert. Wird die Prenylierung gehemmt, reichert sich das Fusionsprotein und somit auch das GFP-Signal im Zytoplasma an. Für die Versuche wurden synchronisierte 1 Tag Adulte dieses Reporterstammes für 24 h mit dem entsprechenden Statin, DMSO und oder Mevalonat bei 20 °C inkubiert. Für die Versuche mit Simvastatin wurden Agarplatten verwendet, für die Versuche mit Lovastatin Flüssigmedium. Nach 24-stündiger Inkubation wurde bei den geschlüpften L2 Larven (F2-Generation) der behandelten Adulten mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops die Anzahl der GFP-angereicherten Zellmembranen gezählt.

2.21 Analyse der Reporterstämme

Tabelle 8: Behandlungs- und Auswertungsmethode der Reporterstämme.

Stamm	Dauer der Vorbehandlung (h)	Induktion	Auswertung
AM140	72/168/216	-	Anzahl der Protein-Aggregate in Muskelzellen
AM141	72/168/216	-	Anzahl der Protein-Aggregate in Muskelzellen
SJ4005	24/48	24 h 5 µg/ml Tunicamycin	Fluoreszenzintensität von hsp-

			4::GFP im gesamten Tier
SJ4058	24/48	24 h 125 µg/ml Ethidiumbromid	Fluoreszenzintensität von hsp-60::GFP im gesamten Tier
SJH1	24	30 min 35°C	Lokalisation von DAF-16::GFP in einer <i>jnk-1</i> Mutante
TJ356	24	30 min 35°C	Lokalisation von DAF-16::GFP
LD001	24	1 h 5 mM Natriumarsenit	Lokalisation von SKN-1::GFP

2.22 „Lifespan-Machine“: thermale Stress-Resistenz

2.22.1 Aufbau und Funktion *Lifespan-Machine*

Die *Lifespan-Machine* nach Stroustrup *et al.* (2013) ist eine Maschine, welche auf umgebauten Flachbettscannern basiert und vollautomatisch die Lebensspanne von *C. elegans* auf Agarplatten analysieren kann. Dabei werden die auf dem Scanner positionierten Agarplatten gescannt und so die Bewegung der Nematoden als Maß für das Überleben dokumentiert. Eine funktionelle Einheit der *Lifespan-Machine* besteht aus einem Scanner und einem Server, welcher für die Bilderfassung und Bildverarbeitung zuständig ist. Ein Server kann mehrere Scanner steuern, wodurch die Maschine durch das Anschließen weiterer Scanner erweiterbar ist. Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei Scanner umgebaut und ein Server aufgesetzt. In das Gehäuse der Scanner wurde nach Anleitung des Erfinders Löcher gefräst, in welche Gehäuselüfter eingesetzt wurden. Diese steuern der Wärmeentwicklung beim Scannvorgang entgegen. Zusätzlich wurde der Focus der Linse des Scanners so verstellt, dass die Nematoden auf den Agarplatten erkennbar waren. Auch der Server wurde entsprechend der Anleitung aufgesetzt.

2.22.2 Bestimmung der thermalen Stress Resistenz

Für die Bestimmung der thermalen Stress Resistenz mit Hilfe der *Lifespan-Machine* wurden L4 Larven aus einer Bleiche-Synchronisation verwendet. Die Nematoden wurden von den 10 cm NGM-Agarplatten ab gespült und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt. Danach wurden ca. 50-100 Nematoden auf eine beimpfte 6 cm NGM-Agarplatte pipettiert. Nach diesem Schema wurden 32 Platten angesetzt. Diese Platten wurden kopfüber und ohne Deckel auf zwei Flachbettscanner verteilt und

bei 35 °C inkubiert. Alle 10 Minuten wurden die Platten gescannt. Über die Software der *Lifspan-Machine* wurde das Überleben in Echtzeit dokumentiert und ausgewertet.

2.23 Motilität („*Body-Bends*“)

Für die Bestimmung der Motilität wurden L4 Larven aus einer Ei-Ablage Synchronisation verwendet. Um den Einfluss von Lovastatin bzw. Simvastatin auf die Motilität zu überprüfen, wurden die Tiere in S-Medium_K bzw. auf NGM-Agarplatten inkubiert. Jeden zweiten Tag wurden die Nematoden umgesetzt. Nach 4, 8 und/oder 10 Tagen der adulten Lebensphase wurde die Motilität der Tiere bestimmt. Dazu wurde pro Vertiefung einer 96er-Mikrotiterplatte 50 µl M9-Puffer vorgelegt. Danach wurden mindestens 15 Tiere pro Bedingung auf 3 Vertiefungen verteilt (5 pro Vertiefung) und die Bewegung der Nematoden mit Hilfe eines inversen Durchlichtmikroskops aufgenommen. Die Videos wurden mit Hilfe des Wormtracker Plugin (Nussbaum-Krammer *et al.*, 2015) für ImageJ ausgewertet und die *Body Bends per second* bestimmt.

2.24 Statistik

Für die statistische Auswertung der Daten wurde Microsoft Excel 2013/2019 verwendet. Alle statistischen Tests (t-test, One-Way ANOVA oder Two-Way ANOVA) wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 6 durchgeführt, außer der Mantel-Cox log rank test der Kaplan-Meyer Überlebenskurven, welcher mit Hilfe von PASW Statistics 18 durchgeführt wurde. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant bewertet. Die Dokumentation der RealTime PCR und die Auswertung erfolgte mit dem Programm Bio-Rad CFX Manager. Für die graphische Darstellung wurde das Programm GraphPad Prism 6 verwendet.

3 Ergebnisse

Die hier verwendeten Statin-Konzentrationen wurden anhand von Literaturdaten und Vorversuchen ausgewählt. So konnten Pilon *et al.* zeigen, dass Konzentrationen jenseits von 300 μM die Entwicklung und Fertilität von *C. elegans* stark beeinträchtigen (Mörck *et al.*, 2009). In Übereinstimmung dazu bestätigen Experimente aus vorangegangenen Abschlussarbeiten unserer Arbeitsgruppe, dass Konzentrationen im Bereich von 25-100 μM nur einen leichten Einfluss auf die zuvor genannten Endpunkte haben. Daher wurde Lovastatin in den folgenden Experimenten in eben diesem Konzentrationsbereich eingesetzt. Teile der im folgenden dargestellten Ergebnisse wurden bereits in der eigenen Masterarbeit¹, welche als Vorarbeit zu dieser Promotion diente, angefertigt und sind in den Abbildungsunterschriften entsprechend gekennzeichnet.

3.1 Lovastatin vermittelt eine Mevalonat-abhängige Lebensverlängerung in *C. elegans*

Um herauszufinden, ob Lovastatin einen positiven Einfluss auf die Alterung in *C. elegans* hat, wurde die Lebensspanne des Nematoden analysiert. Dazu wurde der Einfluss von drei verschiedenen Lovastatin-Konzentrationen (25, 50 und 100 μM) getestet. Die Behandlung mit 100 μM Lovastatin bewirkte dabei eine Verlängerung der mittleren Lebensspanne um ca. 24 % im Vergleich zur Kontrolle. Bei den niedriger eingesetzten Konzentrationen (25 und 50 μM) wurde die Lebensspanne gleichermaßen um ca. 13 % verlängert (Abb. 5A). Das bedeutet, dass die Individuen ca. 5,3 Tage (100 μM) bzw. 2,8 Tage (25 und 50 μM) länger lebten als die Lösungsmittelkontrolle (Abb. 5B). Eine Behandlung mit Lovastatin konnte demnach die Lebensspanne in diesem Experiment in *C. elegans* verlängern.

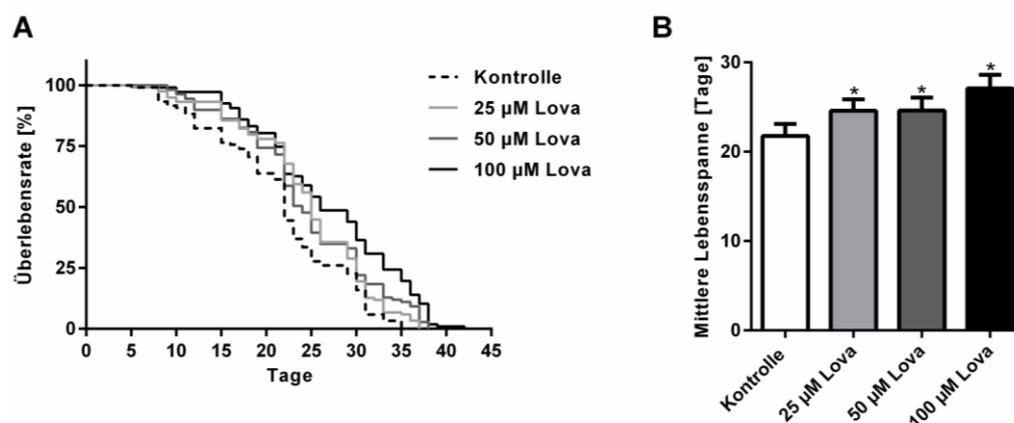


Abbildung 5: Einfluss von Lovastatin auf die Lebensspanne von *C. elegans*.

Individuen einer wildtypischen, Alters-synchronisierten Population (L4 Larven) wurden jeweils mit Lovastatin (25, 50 und 100 μM) oder 0,2 % DMSO (Kontrolle) behandelt. Die Kultivierung der

¹ Andreas Jahn (2015), „Einfluss von Lovastatin auf den Alterungsprozess in *C. elegans*“, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Tiere erfolgte in S-Medium_K bei 20 °C. Jeden Tag wurde die Anzahl der lebenden Tiere bestimmt. **(A)** Dargestellt ist die Kaplan-Meyer Überlebenskurve aus vier unabhängigen Durchläufen (n=4, N ≥ 120). **(B)** Die mittlere Lebensspanne (Mittelwert ± SD, n=4, N ≥ 120) wurde durch die Behandlung mit 25 µM (24,6±1,1 Tage), 50 µM (24,6±1,2 Tage) und 100 µM (27,1±1,3 Tage) Lovastatin im Vergleich zur Kontrolle (21,8±1,2 Tage) erhöht. Statistischer Test: Mantel-Cox log rank test, *p ≤ 0,05 vs. Kontrolle (0,2 % DMSO). Dieses Experiment wurde innerhalb der eigenen Masterarbeit^{1(S.37)} angefertigt.

Für diese Lebensverlängerung könnte prinzipiell kalorische Restriktion ursächlich sein. Denn auch in *C. elegans* ist kalorische Restriktion eine der effektivsten Interventionen, um die Lebensspanne zu verlängern (Houthoofd *et al.*, 2005, Piper & Bartke, 2008). Dadurch besteht die Möglichkeit, dass eine Substanz-abhängige Verlängerung der Lebensdauer durch eine Einschränkung der Nahrungsaufnahme (z. B. durch bitteren Geschmack der Substanz) vermittelt wird. Mit den folgenden Experimenten sollte daher ausgeschlossen werden, dass Lovastatin die Nahrungsaufnahme beeinträchtigt und/oder nicht aufgenommen wird.

Die Aufnahme von Lovastatin wurde indirekt über die mRNA-Expression verschiedener CYPs untersucht. Die Expression einiger CYPs kann durch die Anwesenheit von Fremdstoffen aktiviert werden, da sie eine wichtige Rolle im Fremdstoffmetabolismus spielen. Deshalb wurden für diese Analyse Orthologe der fünf CYPs ausgewählt, welche im Menschen zusammen ca. 80 % der Arzneimittel metabolisieren (Guengerich, 2003, Chakrapani *et al.*, 2008). Mit CYP3A4 (*cyp-13A7*), CYP2C9 (*cyp-35A2*) und CYP2C19 (*cyp-33E1*) sind auch jene CYPs darunter, welche im Menschen für die Verstoffwechslung von Statinen verantwortlich sind (Maroo *et al.*, 2008). Als Behandlungsdauer wurden 96 Stunden gewählt, um eine möglichst starke Expression der CYPs zu induzieren. In Folge der 96-stündigen Behandlung mit 100 µM Lovastatin, stieg die mRNA Expression von drei der getesteten CYPs in *C. elegans* an (Abb. 6A). Am stärksten wurde dabei die Expression von *cyp-33C2* (CYP2E1) erhöht (416x). *Cyp-13A7* (CYP3A4) und *cyp-14A3* (CYP1A2) wurden 2,4-fach bzw. 1,4-fach im Vergleich zur Kontrolle exprimiert. Die Expression der anderen beiden CYPs wurde vermindert (*cyp-33E1*: 0,7x und *cyp-35A2*: 0,5x). Die Behandlung mit Lovastatin bewirkte demnach eine spezifische Aktivierung und Inhibition der Transkription von Fremdstoffmetabolismus assoziierten Genen.

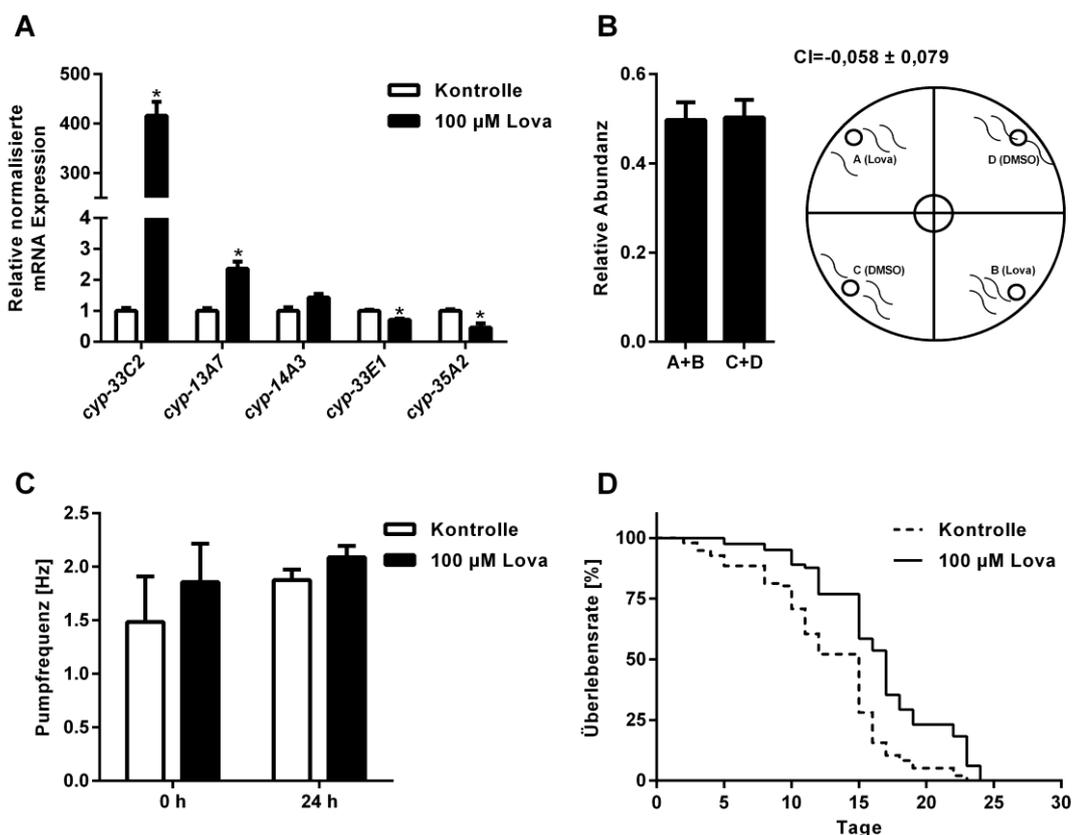


Abbildung 6: Einfluss von Lovastatin auf die CYP-Expression, die Nahrungsaufnahme und die postreproduktive Lebensspanne.

Für alle dargestellten Experimente wurden wildtypische und Alters-synchronisierte L4 Larven verwendet. Die Kultivierung der Tiere erfolgte in S-Medium_K bei 20 °C. **(A)** Gezeigt ist die mRNA Expression von fünf ausgewählten CYPs nach 96-stündiger Behandlung mit 100 µM Lovastatin aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert ± SEM, n=3). Die Expression von *cyp-33C2* ($415,7 \pm 27,9$), *cyp-13A7* ($2,4 \pm 0,23$) und *cyp-14A3* ($1,4 \pm 0,11$) war im Vergleich zur Kontrolle (= 1, 0,2 % DMSO) erhöht. *Cyp-33E1* ($0,71 \pm 0,04$) und *cyp-35A2* ($0,46 \pm 0,14$) wurden dagegen vermindert exprimiert. Statistischer Test: Student's t-test, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (0,2 % DMSO). **(B)** Dargestellt ist die relative Verteilung der Nematoden bezogen auf die Quadranten mit 100 µM Lovastatin (A+B) oder 0,2 % DMSO (C+D) aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert ± SD, n=3, N ≥ 240). In den Quadranten mit Lovastatin befanden sich nach 2 Stunden $49 \pm 3,9$ % der Nematoden. In den Quadranten mit 0,2 % DMSO waren es $50 \pm 3,9$ %. Der chemotaktische Index (CI) lag bei $-0,058 \pm 0,079$. **(C)** Die Pumpfrequenz war in Anwesenheit von 100 µM Lovastatin (0 h: $1,86 \pm 0,36$ vs. $1,48 \pm 0,42$) oder nach 24-stündiger Vorbehandlung (24 h: $2,09 \pm 0,11$ vs. $1,88 \pm 0,10$) mit 100 µM Lovastatin im Vergleich zur Kontrolle (0,2 % DMSO) tendenziell erhöht (Mittelwert ± SD, n=3, N ≥ 30). **(D)** Dargestellt ist die Kaplan-Meyer Überlebenskurve aus drei unabhängigen Durchläufen (n=3, N ≥ 90) nach postreproduktiver Behandlung (ab Tag 8) mit 100 µM Lovastatin. Die mittlere Lebensspanne wurde durch die Behandlung mit 100 µM Lovastatin um 30 % erhöht. Experiment D wurde innerhalb der eigenen Masterarbeit^{1(S.37)} angefertigt.

Unabhängig der Tatsache, dass Lovastatin die Transkription einiger CYPs beeinflusst, kann es immer noch repulsiv auf *C. elegans* wirken. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde ein Chemotaxis-Assay durchgeführt. Dazu wurde eine Agarplatte in vier Quadranten unterteilt. In den gegenüberliegenden Quadranten wurde jeweils 1 µl 0,2 % DMSO oder 1 µl 100 µl Lovastatin aufgetragen. Nach zwei Stunden wurde die Verteilung der Nematoden analysiert und der chemotaktische Index bestimmt.

Es konnte in diesem Experiment kein Unterschied in der Verteilung festgestellt werden. Der chemotaktische Index von *C. elegans* zu Lovastatin lag hier bei $-0,058 \pm 0,079$, was einem neutralen chemotaktischen Index entspricht (Abb. 6B). Damit kann geschlussfolgert werden, dass Lovastatin weder repulsiv noch attraktiv auf *C. elegans* wirkte.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte Lovastatin daher keinen negativen und damit lebensverlängernden Einfluss auf die Nahrungsaufnahme bzw. die pharyngeale Pumprate von *C. elegans* haben. Um dies zu untersuchen, wurde die Pumpfrequenz mit Hilfe des *Nematrix The ScreenChip*TM Systems bestimmt und die Lebensspanne nach postreproduktiver Behandlung mit Lovastatin analysiert. Grundlage des Experiments zur Bestimmung der postreproduktiven Lebensspanne ist, dass die Pumprate nach der reproduktiven Phase stark absinkt, sodass ein möglicher Einfluss durch Lovastatin auf die Pumprate lediglich eine untergeordnete Rolle in Hinblick auf die Lebensverlängerung spielen würde (Zullo *et al.*, 2019). Zunächst wurde die pharyngeale Pumprate in Anwesenheit von Lovastatin bestimmt. Dabei zeigte sich eine tendenziell erhöhte Pumpfrequenz im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 6C). Auch nach 24-stündiger Vorbehandlung mit 100 μ M Lovastatin war eine solche Tendenz erkennbar (Abb. 6C). Insgesamt zeigt sich aber in keinem Fall ein statistisch signifikanter negativer Einfluss auf die pharyngeale Pumprate. Zudem verlängert auch die postreproduktive Behandlung mit 100 μ M Lovastatin die Lebensspanne von *C. elegans* um ca. 30 % (Abb. 6D).

Zusammenfassend kann aus den hier gezeigten Experimenten geschlussfolgert werden, dass die Behandlung mit Lovastatin eine Aktivierung der Expression von CYPs bewirkte, keine chemotaktische Antwort ausgelöst hat, keinen negativen Einfluss auf die pharyngeale Pumprate hatte sowie auch postreproduktiv eine Lebensverlängerung in *C. elegans* bewirkte.

Ob die Lovastatin-abhängige Verlängerung der Lebensspanne in direktem Zusammenhang mit einer Hemmung der HMG-CoA-Reduktase steht, sollte mit dem nachfolgenden Experiment untersucht werden. In diesem Experiment wurden die Individuen zusätzlich zu Lovastatin mit Mevalonat, dem Produkt der durch die HMG-CoA-Reduktase katalysierten Reaktion behandelt, um zu untersuchen, ob die Lebensverlängerung durch Lovastatin durch die zusätzliche Gabe von Mevalonat revertierbar ist. Es zeigte sich, dass die Lebensverlängerung durch 100 μ M Lovastatin vollständig Mevalonat-abhängig ist (Abb 7A). So wurde die Lebensspanne durch die alleinige Behandlung mit 100 μ M Lovastatin um 15 % verlängert (Abb. 7B). Dagegen

fürte die Co-Behandlung mit Lovastatin und Mevalonat zu keiner Lebensverlängerung (Abb. 7B). Es wurde bereits gezeigt, dass die verwendete Mevalonat-Konzentration keinen Einfluss auf die Lebensspanne des Wildtyps hat und einen *Knockdown* der HMG-CoA-Reduktase mittels RNAi retten kann (Ranji *et al.*, 2014).

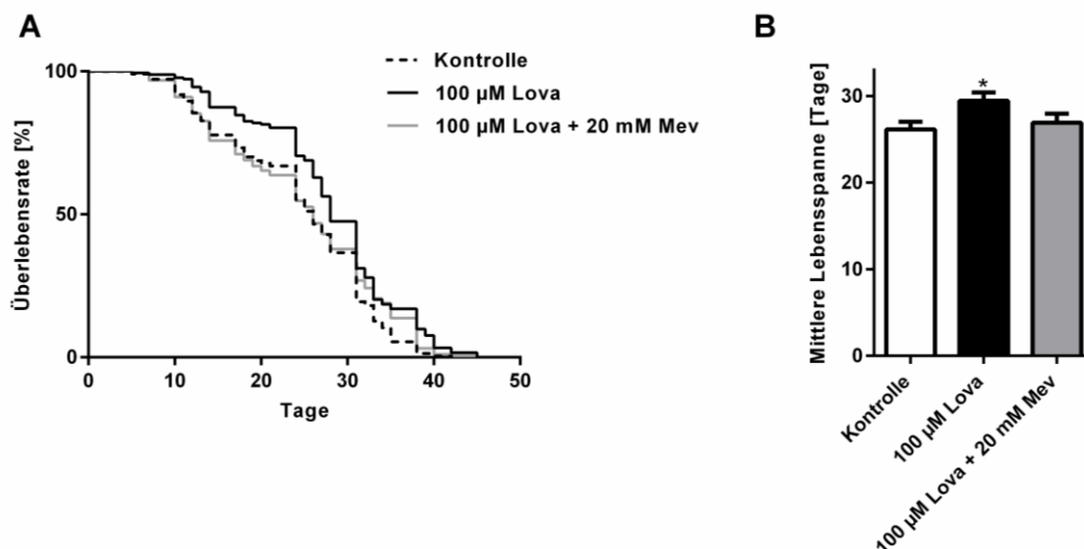


Abbildung 7: Einfluss von Lovastatin und Mevalonat auf die Lebensspanne von *C. elegans*.

Individuen einer wildtypischen, Alters-synchronisierten Population (L4 Larven) wurden jeweils mit 100 µM Lovastatin, 100 µM Lovastatin und 20 mM Mevalonat oder 0,2 % DMSO (Kontrolle) behandelt. Die Kultivierung der Tiere erfolgte in S-Medium_K bei 20 °C. Jeden Tag wurde die Anzahl der lebenden Tiere bestimmt. **(A)** Dargestellt ist die Kaplan-Meier Überlebenskurve aus drei unabhängigen Durchläufen (n=3, N ≥ 180). **(B)** Die mittlere Lebensspanne (Mittelwert ± SD, n=3, N ≥ 180) wurde durch die Behandlung mit 100 µM Lovastatin (29,4±0,9 Tage) im Vergleich zur Kontrolle (26,1±0,9 Tage) erhöht. Die Co-Behandlung mit 100 µM Lovastatin und 20 mM Mevalonat hat keinen Effekt auf die Lebensspanne (26,9±1,1 Tage). Statistischer Test: Mantel-Cox log rank test, *p ≤ 0,05 vs. Kontrolle (0,2 % DMSO). Dieses Experiment wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit von Bo Scherer² durchgeführt.

Um die molekularen Ursachen der Statin-bedingten und Mevalonat-abhängigen Lebensverlängerung genauer zu untersuchen, sollte ein geeigneter Biomarker für das biologische Alter in *C. elegans* Verwendung finden. Hierfür diene die Untersuchung des Alterspigments, da dieses altersabhängig im Darm akkumuliert und autofluoreszent ist. Dadurch ist es im durchsichtigen Fadenwurm einfach zu quantifizieren und ein akzeptierter Biomarker für das physiologische Alter in *C. elegans* (Gerstbrein *et al.*, 2005). Zunächst wurde überprüft, ob die Akkumulation des Alterspigments auch innerhalb unseres Versuchsaufbaus mit dem Alter zunimmt (Abb. 8A und B). Dazu wurde die Akkumulation des Alterspigments ohne Lovastatin-Behandlung nach 4, 8 und 10 Tagen der adulten Lebensphase gemessen. Hierbei stieg die Akkumulation des Alterspigments von Tag 4 bis Tag 10 um 60% an (Abb. 8A und B). Der Einfluss von

² Bo Scherer (2018) "Investigation of Adverse and Favorable Statin Effects in *C. elegans* Regarding Mevalonate Dependency" HAN University of Applied Sciences, Nijmegen

Lovastatin auf diesen Biomarker wurde nach 10 Tagen bestimmt. Die Behandlung mit Lovastatin führte zu einer reduzierten Akkumulation des Alterspigments um ca. 36 % (Abb. 8C und D). Dabei ist diese Statin-vermittelte Reduktion wiederum Mevalonat-abhängig (Anhang Abb. 28).

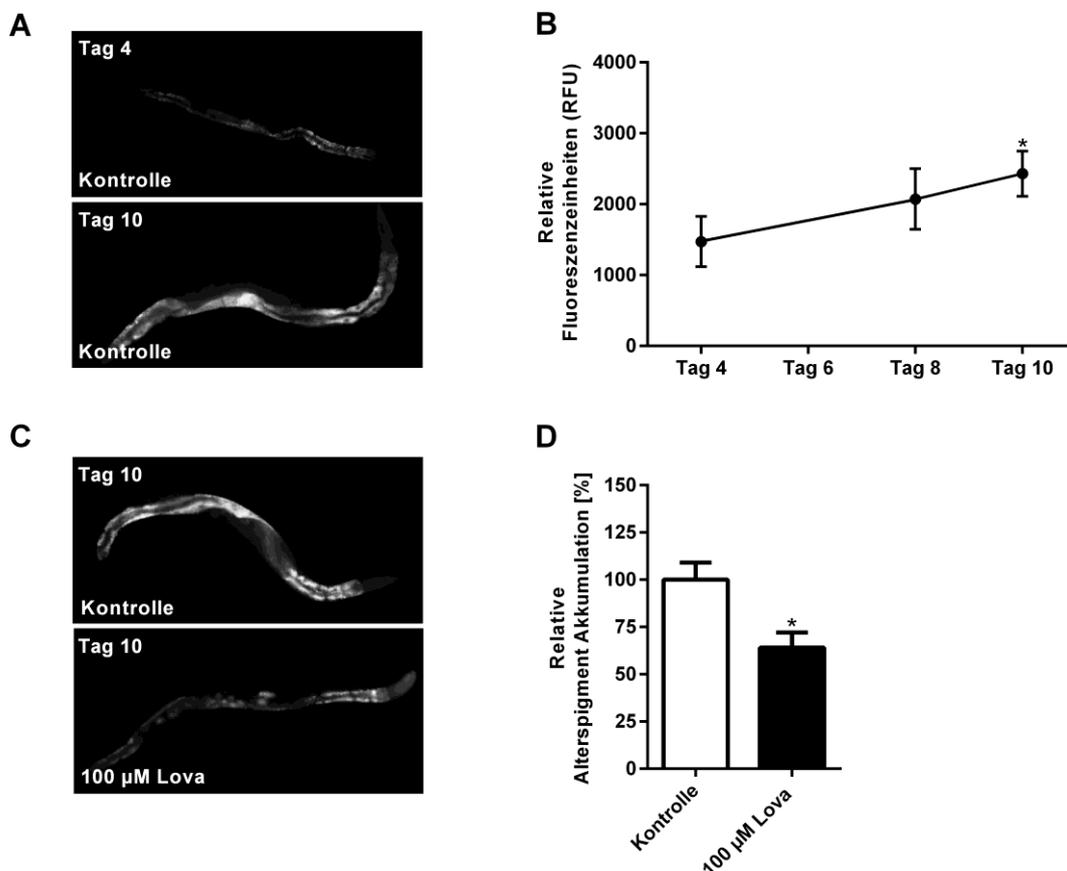


Abbildung 8: Einfluss von Lovastatin auf die altersabhängige Akkumulation des Alterspigments in *C. elegans*.

(A) Übersichtsaufnahmen der altersabhängigen Akkumulation des autofluoreszenten Alterspigments im Darm von *C. elegans*. Die Fluoreszenzintensität nahm mit dem Alter stark zu. (B) Wildtypische und Alters-synchrone L4 Larven wurden bei 20°C in S-Medium_K mit 0,2 % DMSO (Kontrolle) behandelt und an Tag 4, 8 und 10 der adulten Lebensphase die Akkumulation des autofluoreszenten Alterspigments bestimmt (Extinktion: 360-370 nm; Emission: 420-460 nm). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität pro Messtag aus vier unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, n=4, N \geq 40). Die Fluoreszenzintensität des Alterspigments stieg von Tag 4 (1472 ± 308) bis Tag 10 (2431 ± 276) an. Statistischer Test: One-Way ANOVA, *p \leq 0,05 vs. Tag 4. (C) Übersichtsaufnahmen der Akkumulation des Alterspigments an Tag 10 der adulten Lebensphase nach Behandlung mit 100 µM Lovastatin. Zu sehen ist eine deutliche Reduktion der Akkumulation des Alterspigments durch Lovastatin. (D) Quantifizierung der Akkumulation des Alterspigments nach Behandlung mit 100 µM Lovastatin. Wildtypische und Alters-synchrone L4 Larven wurden bei 20°C in S-Medium_K mit 0,2 % DMSO bzw. 100 µM Lovastatin behandelt und an Tag 10 der adulten Lebensphase die Akkumulation des autofluoreszenten Alterspigments bestimmt (Extinktion: 360-370 nm; Emission: 420-460 nm). Gezeigt ist die relative Akkumulation bezogen auf die Kontrolle (100 %) aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, n=3, N \geq 33). Durch die Behandlung mit 100 µM Lovastatin war die Akkumulation des Alterspigments um ca. 36 % geringer. Statistischer Test: Student's t-test, *p \leq 0,05 vs. Kontrolle (0,2 % DMSO).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Behandlung mit 100 μ M Lovastatin eine Mevalonat-abhängige Lebensverlängerung bewirkte, keinen negativen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme von *C. elegans* hatte und die altersabhängige Akkumulation des Alterspigments verlangsamen konnte.

3.2 Die Lebensverlängerung durch Lovastatin ist abhängig vom Transkriptionsfaktor DAF-16

Um die molekularen Ursachen der Lebensverlängerung durch Lovastatin zu untersuchen, wurde zunächst der Einfluss von Lovastatin auf die beiden Transkriptionsfaktoren SKN-1 (Nrf2) und DAF-16(Foxo) untersucht. In *C. elegans* sind SKN-1 und DAF-16 zwei bekannte Schlüsseltranskriptionsfaktoren in Hinblick auf die Langlebigkeit (Uno & Nishida, 2016). Der Einfluss von Lovastatin auf diese beiden Transkriptionsfaktoren wurde jeweils mit Hilfe eines Reporterstammes untersucht. Diese Reporterstämme enthalten jeweils ein Transgen, auf welchem der entsprechende Transkriptionsfaktor mit GFP fusioniert ist. So lässt sich eine mögliche Translokation des Transkriptionsfaktors in den Nukleus *in vivo* beobachten. Für DAF-16 konnte jedes Individuum einem der drei Stadien bestehend aus nukleäre, intermediäre oder zytosolische DAF-16::GFP Lokalisation zugeordnet werden (Abb. 9A). Für den SKN-1 Reporterstamm konnte nur zwischen zytosolisch oder nukleär unterschieden werden (Abb. 9B). Die 24-stündige Behandlung mit 100 μ M Lovastatin führte dazu, dass bei 31 % der Individuen DAF-16 kernlokalisiert. Dagegen waren es in der Kontrollgruppe (0,2 % DMSO) nur 8 % der Individuen (Abb. 9C). Die gleiche Behandlung führte beim SKN-1 Reporterstamm hingegen zu keiner Veränderung der Lokalisation von SKN-1::GFP im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 9D). Als Positivkontrolle für die Translokation von DAF-16 in den Nukleus wurde der Reporterstamm für eine Stunde bei 37°C inkubiert, wodurch 85 % der Individuen ein kernlokalisiertes DAF-16 aufwiesen (Abb. 9C). Für SKN-1 wurden die Individuen für eine Stunde mit 5 mM Natriumarsenit behandelt. Auch hier war bei ca. 82 % der Individuen der Transkriptionsfaktor in den Kern transloziert (Abb. 9D). Die mRNA-Expression der beiden Transkriptionsfaktoren wurde durch die Behandlung mit Lovastatin nicht beeinflusst (Abb. 9E). Zusammenfassend zeigte sich, dass Lovastatin lediglich die Translokation von DAF-16, nicht aber von SKN-1, in den Nukleus induziert.

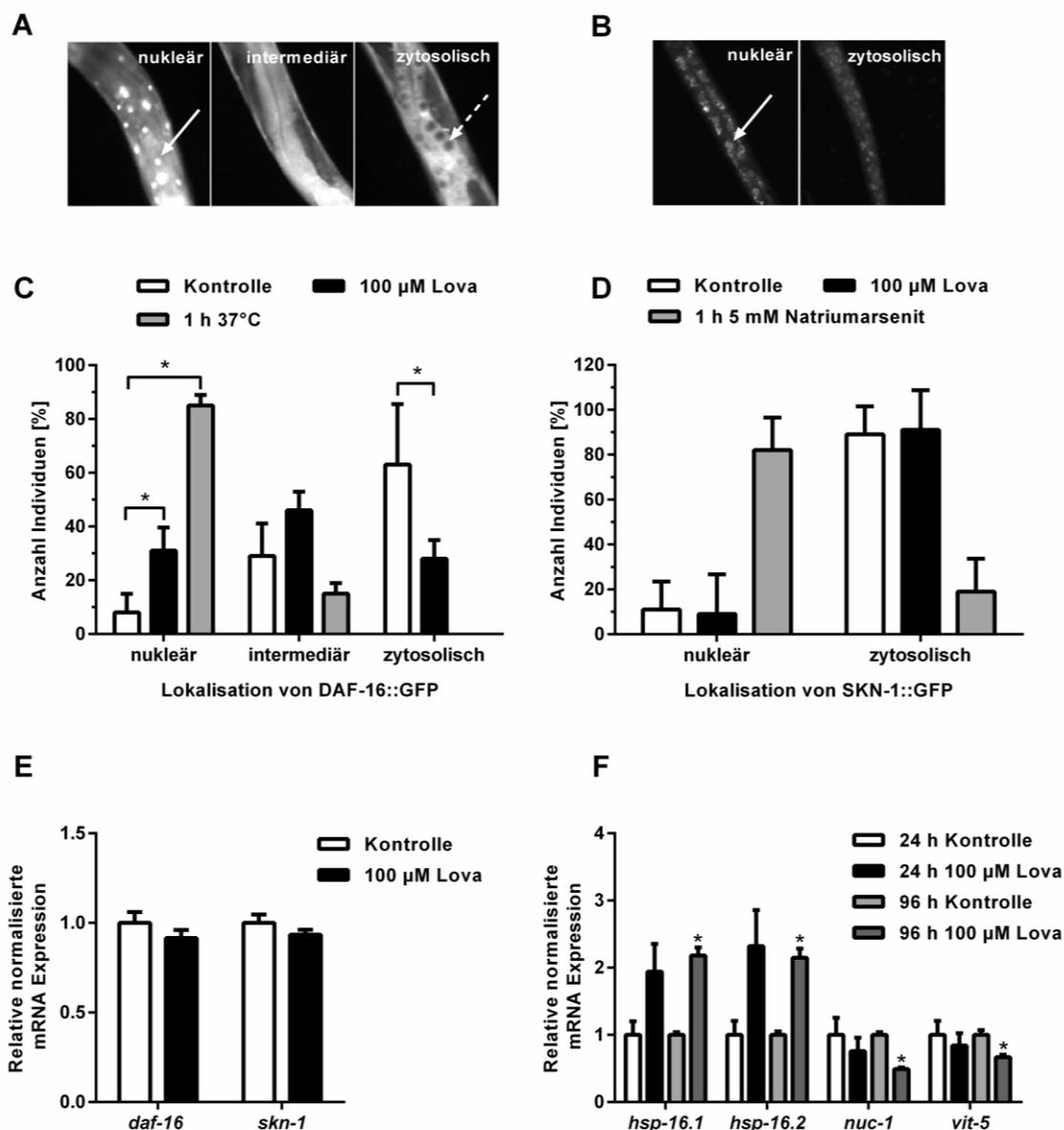


Abbildung 9: Einfluss von Lovastatin auf die Lokalisation und mRNA-Expression der beiden Transkriptionsfaktoren DAF-16 und SKN-1, sowie die mRNA-Expression von DAF-16 Zielgenen.

(A) Beispielbilder der verschiedenen Lokalisationsstadien von DAF-16::GFP, welchen die einzelnen Individuen zugeordnet wurden. Nukleäres Stadium: DAF-16::GFP ist nur im Zellkern (Pfeil) lokalisiert. Intermediäres Stadium: DAF-16::GFP ist im Zellkern und im Zytosol lokalisiert. Zytosolische Stadium: DAF-16::GFP ist nur im Zytosol aber nicht im Zellkern (gestrichelter Pfeil) lokalisiert. (B) Beispielbilder der verschiedenen Lokalisationsstadien von SKN-1::GFP, welchen die einzelnen Individuen zugeordnet wurden. Nukleäres Stadium: SKN-1::GFP ist vermehrt im Zellkern (Pfeil) lokalisiert. Zytosolische Stadium: SKN-1::GFP ist vermehrt im Zytosol (C) Quantifizierung der Lokalisation von DAF-16::GFP. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, $n=3$, $N \geq 45$). Alters-synchrone L4 Larven wurden für 24 Stunden bei 20°C in S-Medium_K mit 100 μ M Lovastatin behandelt. Nach der Behandlung mit Lovastatin war bei $31 \pm 8,6$ % der Individuen DAF-16 kernlokalisiert. Dagegen waren es in der Kontrolle (0,2 % DMSO) nur 8 ± 7 %. Statistischer Test: Two-Way ANOVA, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (0,2 % DMSO). Experiment C wurde innerhalb der eigenen Masterarbeit^{1(S.37)} angefertigt. (D) Quantifizierung der Lokalisation von SKN-1::GFP. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, $n=3$, $N \geq 45$). Die 24- stündige Behandlung mit Lovastatin hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation von SKN-1::GFP in Alters-synchronen L2 Larven. (E) Gezeigt ist die mRNA Expression von *daf-16* und *skn-1* nach 24-

stündiger Behandlung von Alters-synchronen L4 Larven mit 100 μ M Lovastatin bei 20°C in S-Medium_K aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SEM, n=3). In beiden Fällen war kein Unterschied zur normalisierten Kontrolle (= 1) erkennbar. **(F)** mRNA Expression von vier DAF-16 Zielgenen nach 24- oder 96-stündiger Behandlung von Alters-synchronen L4 Larven mit 100 μ M Lovastatin bei 20°C in S-Medium_K. Dargestellt ist die relative mRNA Expression bezogen auf die normalisierte Kontrolle (= 1, 24 h 0,2 % DMSO oder 96 h 0,2 % DMSO) aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SEM, n=3). Die Expression der Gene, welche durch DAF-16 aktiviert werden, wurde durch Behandlung mit Lovastatin erhöht (*hsp-16.1*: 24 h: 1,9 \pm 0,41, 96 h: 2,2 \pm 0,12; *hsp-16.2*: 24 h: 2,3 \pm 0,53, 96 h: 2,1 \pm 0,14). Dagegen wurde die Expression der durch DAF-16 inhibierten Gene vermindert (*nuc-1*: 24 h: 0,8 \pm 0,20, 96 h: 0,5 \pm 0,02; *vit-5*: 24 h: 0,8 \pm 0,18, 96 h: 0,67 \pm 0,03). Statistischer Test: Student's t-test, *p \leq 0,05 vs. 96 h Kontrolle (0,2 % DMSO).

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Kernlokalisierung von DAF-16 nach Statin-Behandlung auch mit einer erhöhten Aktivität des Transkriptionsfaktors einhergeht, wurde die Expression von fünf DAF-16 Zielgenen untersucht. Dazu wurde die Expression von drei Genen (*dod-1*, *hsp-16.1* und *hsp-16.2*) untersucht, deren Transkription durch DAF-16 induziert wird, und von zwei Genen (*nuc-1* und *vit-5*), welche durch DAF-16 reprimiert werden (Murphy *et al.*, 2003). Es zeigte sich, dass sowohl nach 24- als auch nach 96-stündiger Behandlung mit 100 μ M Lovastatin die Expression von vier der fünf Zielgenen mit einer erhöhten DAF-16 Aktivität vereinbar ist (Abb. 9F). *Hsp-16.1* und *hsp-16.2* wurden unabhängig vom Analysezeitpunkt beide ca. 2-fach im Vergleich zur Kontrolle exprimiert (Abb. 9F). Die Inhibition der Expression von *nuc-1* und *vit-5* wurde dagegen durch die zunehmende Behandlungsdauer verstärkt (Abb. 9F). Die Expression von *dod-1* konnte nicht bestimmt werden, da der maximale Schwellenwert-Zyklus der RT-qPCR von 35 Zyklen überschritten wurde.

Ob die Statin-bedingte Lebensverlängerung im direkten Zusammenhang mit der erhöhten Kernlokalisierung von DAF-16 steht, sollte anschließend mittels Analyse der Lebensspanne und der Akkumulation des Alterspigments überprüft werden. Dazu wurde eine *daf-16* Nullmutante verwendet, um zu untersuchen, ob eine Statin-Behandlung in Abwesenheit von DAF-16 den positiven Einfluss auf die zuvor genannten Endpunkte verliert. Es zeigte sich, dass eine Behandlung mit 100 μ M Lovastatin die Akkumulation des Alterspigments über 10 Tage in der *daf-16* Nullmutante durch Lovastatin nicht beeinflusst (Abb. 10A und B). Zusätzlich wurde auch die Lebensspanne der *daf-16* Nullmutante nicht verlängert (Abb. 10C und D).

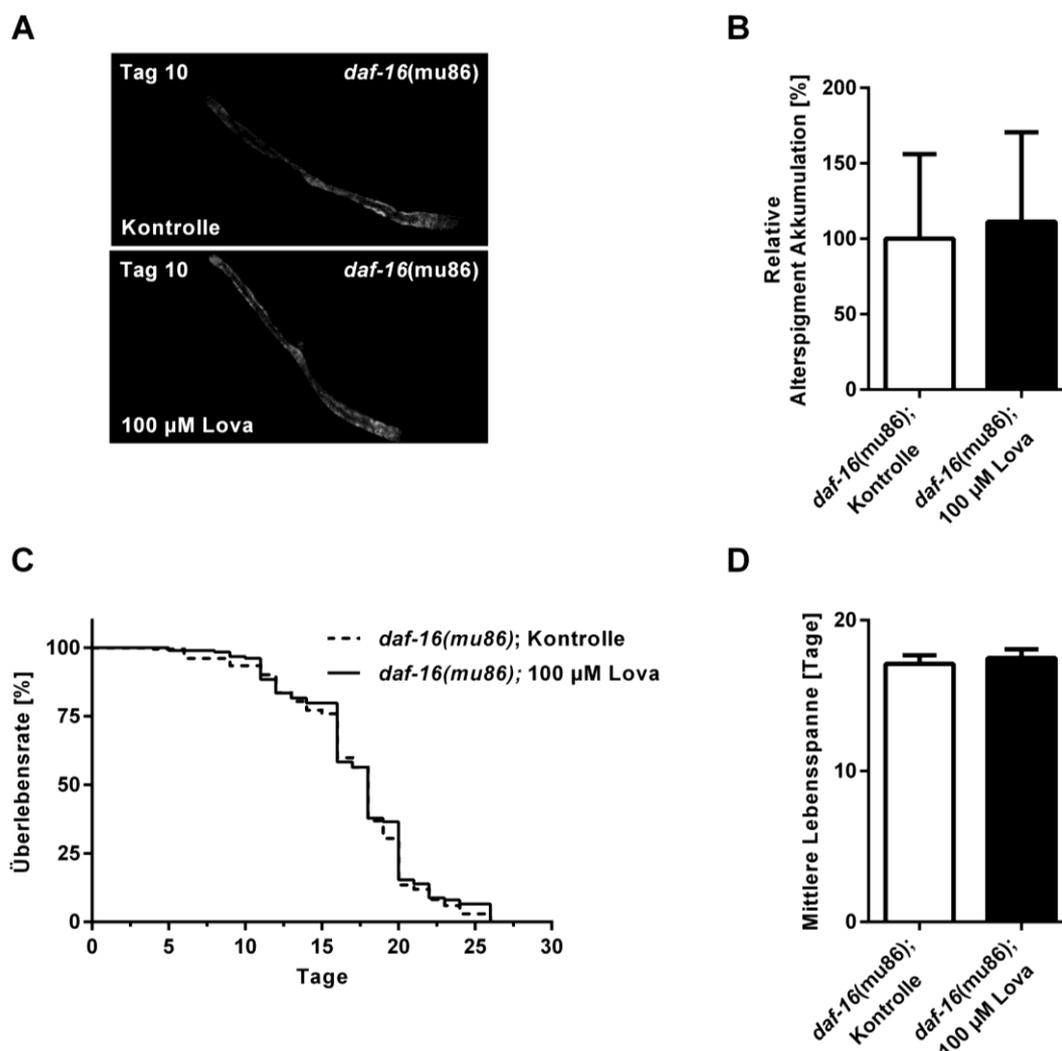


Abbildung 10: Einfluss von Lovastatin auf die Akkumulation des Alterspigments und die Lebensspanne in einer *daf-16* Mutante.

(A) Übersichtsaufnahmen der Akkumulation des Alterspigments einer *daf-16* Mutante nach Behandlung mit 100 µM Lovastatin. Es war kein Unterschied zur Kontrolle (0,2 % DMSO) erkennbar. (B) Quantifizierung der Akkumulation des Alterspigments einer *daf-16* Mutante. Für dieses Experiment wurden Alters-synchrone L4 Larven bei 20°C in S-Medium_K, welches mit 100 µM Lovastatin oder 0,2 % DMSO versetzt war, inkubiert. Nach 10 Tagen wurde die Akkumulation des Alterspigments gemessen (Extinktion: 360-370 nm; Emission: 420-460 nm). Dargestellt ist die relative Akkumulation bezogen auf die Kontrolle (100 %) aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert ± SD, n=3, N ≥ 30). Die Behandlung mit 100 µM Lovastatin hatte keinen Einfluss auf die Akkumulation des Alterspigments der *daf-16* Mutante. Experiment B wurde innerhalb der eigenen Masterarbeit^{1(S,37)} angefertigt (C) Gezeigt ist die Kaplan-Meier Überlebenskurve aus drei unabhängigen Durchläufen (n=3, N ≥ 213). Es ist kein Unterschied zwischen der Behandlung mit 100 µM Lovastatin und der Kontrolle (0,2 % DMSO) erkennbar (D) Die mittlere Lebensspanne (Mittelwert ± SD, n=3, N ≥ 213) der *daf-16* Mutante wurde durch die Behandlung mit 100 µM Lovastatin (17,5±0,6 Tage) im Vergleich zur Kontrolle (17,1±0,6 Tage, 0,2 % DMSO) nicht verändert. Für dieses Experiment wurden Alters-synchrone L4 Larven bei 20°C in S-Medium_K mit den entsprechenden Substanzen inkubiert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Behandlung mit 100 µM Lovastatin eine Translokation von DAF-16 in den Zellkern bewirkte, wodurch die mRNA Expression von vier DAF-16 Zielgenen DAF-16 typisch reguliert wurde. Weiterhin konnte ein

Lovastatin-vermittelter lebensverlängernder Effekt in der *daf-16* Nullmutante nicht beobachtet werden. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass die Lebensverlängerung durch Lovastatin von DAF-16 abhängig ist.

3.3 Die Lebensverlängerung durch Lovastatin ist DAF-2 unabhängig

Der DAF-2-Rezeptor (IGF1R), eine Rezeptor-Tyrosin Kinase, ist der Hauptregulator von DAF-16. Dabei führt eine erhöhte DAF-2 Aktivität zu einer Inhibition von DAF-16. Um zu überprüfen, ob Lovastatin über DAF-2 Einfluss auf die Aktivität von DAF-16 nimmt, wurde die Akkumulation des Alterspigments und die Lebensspanne in einer *daf-2* Mutante analysiert. Die 10-tägige Behandlung mit 100 μ M Lovastatin hatte keinen Einfluss auf die Akkumulation des Alterspigments der *daf-2* Mutante (Abb. 11A und B). Dagegen wurde die Lebensspanne der *daf-2* Mutante durch die Behandlung mit 100 μ M Lovastatin um ca. 11 % erhöht (Abb. 11C und D).

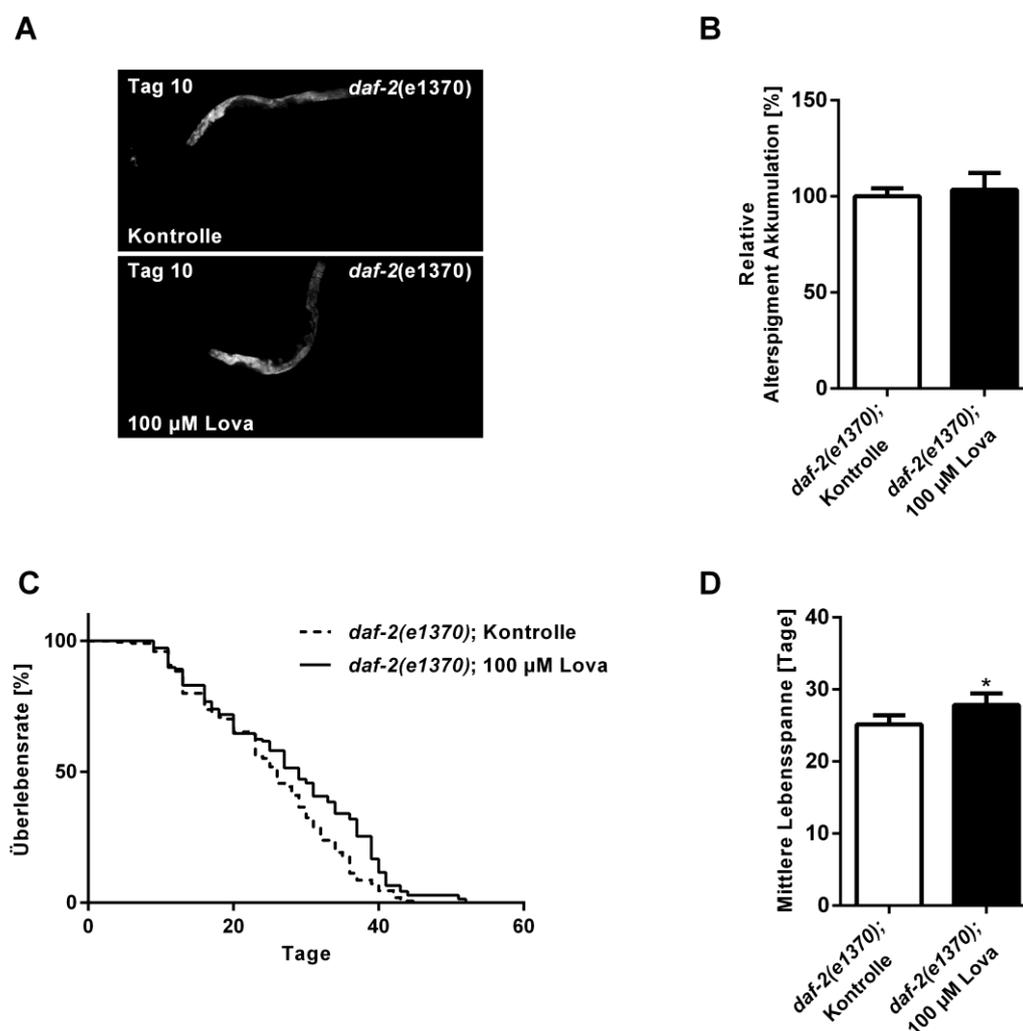


Abbildung 11: Einfluss von Lovastatin auf die Akkumulation des Alterspigments und die Lebensspanne in einer *daf-2* Mutante.

(A) Übersichtsaufnahmen der Akkumulation des Alterspigments einer *daf-2* Mutante nach Behandlung mit 100 μ M Lovastatin. Es war kein Unterschied in der Akkumulation des

Alterspigments im Vergleich zur Kontrolle (0,2 % DMSO) erkennbar. **(B)** Quantifizierung der Akkumulation des Alterspigments einer *daf-2* Mutante. Für dieses Experiment wurden Alters-synchrone L4 Larven bei 20°C in S-Medium_K, welches mit 100 µM Lovastatin oder 0,2 % DMSO (Kontrolle) versetzt war, inkubiert. Nach 10 Tagen wurde die Akkumulation des Alterspigments gemessen (Extinktion: 360-370 nm; Emission: 420-460 nm). Dargestellt ist die relative Akkumulation bezogen auf die Kontrolle (100 %) aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert ± SD, n=3, N ≥ 30). Die Behandlung mit 100 µM Lovastatin hatte keinen Einfluss auf die Akkumulation des Alterspigments der *daf-2* Mutante. **(C)** Gezeigt ist die Kaplan-Meyer Überlebenskurve aus drei unabhängigen Durchläufen (n=3, N ≥ 199). Die Lebensspanne wird durch die Behandlung mit Lovastatin verlängert. **(D)** Die mittlere Lebensspanne (Mittelwert ± SD, n=3, N ≥ 199) der *daf-2* Mutante wurde durch die Behandlung mit 100 µM Lovastatin (27,8±1,6 Tage) im Vergleich zur Kontrolle (25,1±1,3 Tage, 0,2 % DMSO) erhöht. Für dieses Experiment wurden Alters-synchrone L4 Larven bei 20°C in S-Medium_K mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Statistischer Test: Mantel-Cox log rank test, *p ≤ 0,05 vs. Kontrolle (0,2 %DMSO).

Insgesamt deuten die Ergebnisse daraufhin, dass Lovastatin auch in einer *daf-2* Mutante eine Lebensverlängerung bewirkt, jedoch keine Reduktion der Akkumulation des Alterspigments.

3.4 Die Lebensverlängerung durch Lovastatin ist JNK-1 abhängig

Da die vorherigen Ergebnisse vermuten lassen, dass die Lebensverlängerung durch Lovastatin zumindest teilweise unabhängig von DAF-2 ist, wurde nach weiteren DAF-16-Aktivatoren gesucht, deren Aktivität durch Lovastatin moduliert werden könnte. Dazu wurde die mRNA-Expression verschiedener DAF-16-Aktivatoren nach 24-stündiger Behandlung mit 100 µM Lovastatin untersucht. Es zeigt sich, dass von den vier getesteten DAF-16 Aktivatoren (AAK-2, JNK-1, SIR-2.1 und SMK-1) lediglich die mRNA Expression von *aak-2* und *jnk-1* nach Behandlung mit 100 µM Lovastatin erhöht war (Abb. 12A). Dabei wurde *jnk-1* 1,8-fach und *aak-2* 1,4-fach im Vergleich zur Kontrolle exprimiert (Abb. 12A). Da Lovastatin den stärksten Einfluss auf die Expression von *jnk-1* hatte, wurde der Einfluss von JNK-1 auf die Lovastatin-vermittelte Translokation von DAF-16 untersucht. Hierzu wurde der DAF-16::GFP Reporterstamm mit einer *jnk-1* Nullmutante gekreuzt und anschließend die Lokalisation von DAF-16 nach 24-stündiger Lovastatin-Behandlung analysiert. Die *jnk-1* Deletion führte dazu, dass Lovastatin keinen Einfluss mehr auf die Lokalisation von DAF-16::GFP hatte (Abb. 12B). Als Positivkontrolle wurden die Individuen, wie schon beim wildtypischen Reporterstamm, für eine Stunde bei 37°C inkubiert, wodurch bei ca. 75 % der Individuen DAF-16 kernlokalisierte (Abb. 12B).

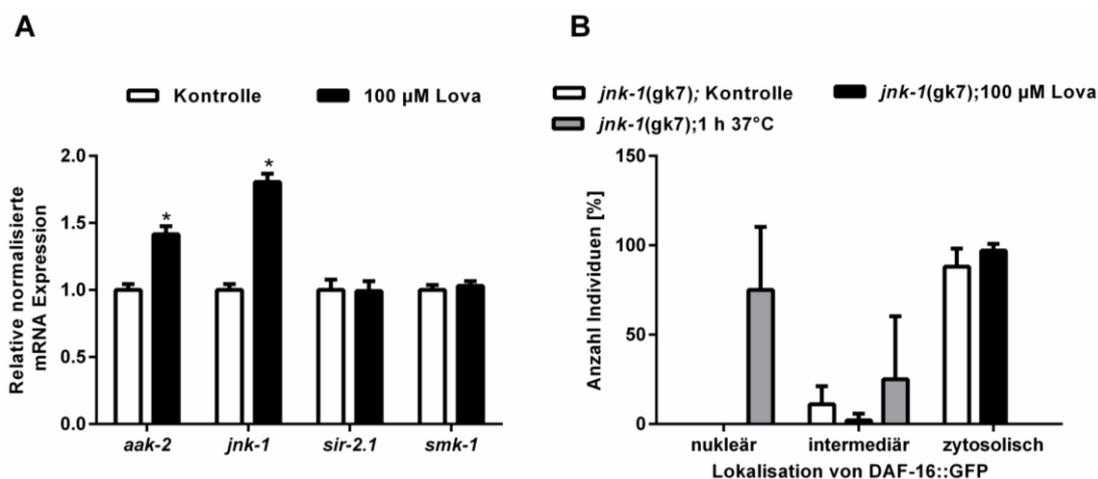


Abbildung 12: Einfluss von Lovastatin auf die mRNA Expression verschiedener DAF-16 Aktivatoren und auf die Lokalisation von DAF-16 in einer *jnk-1* Mutante.

(A) Gezeigt ist die mRNA Expression von vier DAF-16 Aktivatoren (*aak-2*, *jnk-1*, *sir-2.1* und *smk-1*) nach 24-stündiger Behandlung von Alters-synchronen L4 Larven mit 100 μ M Lovastatin bei 20°C in S-Medium_K aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SEM, n=3). Die mRNA Expression von *aak-2* ($1,4 \pm 0,06$) und *jnk-1* ($1,8 \pm 0,6$) war im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Die Expression der anderen beiden Aktivatoren wurde nicht beeinflusst. Statistischer Test: Student's t-test, *p \leq 0,05 vs. Kontrolle (0,2 % DMSO). (B) Quantifizierung der Lokalisation von DAF-16 in einer *jnk-1* Mutante. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, n=3, N \geq 45). Alters-synchrone L4 Larven wurden für 24 Stunden bei 20°C in S-Medium_K mit 100 μ M Lovastatin behandelt. Die Behandlung mit Lovastatin hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation von DAF-16.

Da Lovastatin in einer *jnk-1* Nullmutante keinen Einfluss mehr auf die Lokalisation von DAF-16 hatte, wurde die Abhängigkeit der Lovastatin-vermittelten und DAF-16 abhängigen Lebensverlängerung von JNK-1 analysiert. Dazu wurde die Akkumulation des Alterspigments und die Lebensspanne nach Behandlung mit 100 μ M Lovastatin in einer *jnk-1* Mutante untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass die Behandlung mit 100 μ M Lovastatin weder die Akkumulation des Alterspigments reduzierte noch die Lebensspanne verlängerte (Abb. 13).

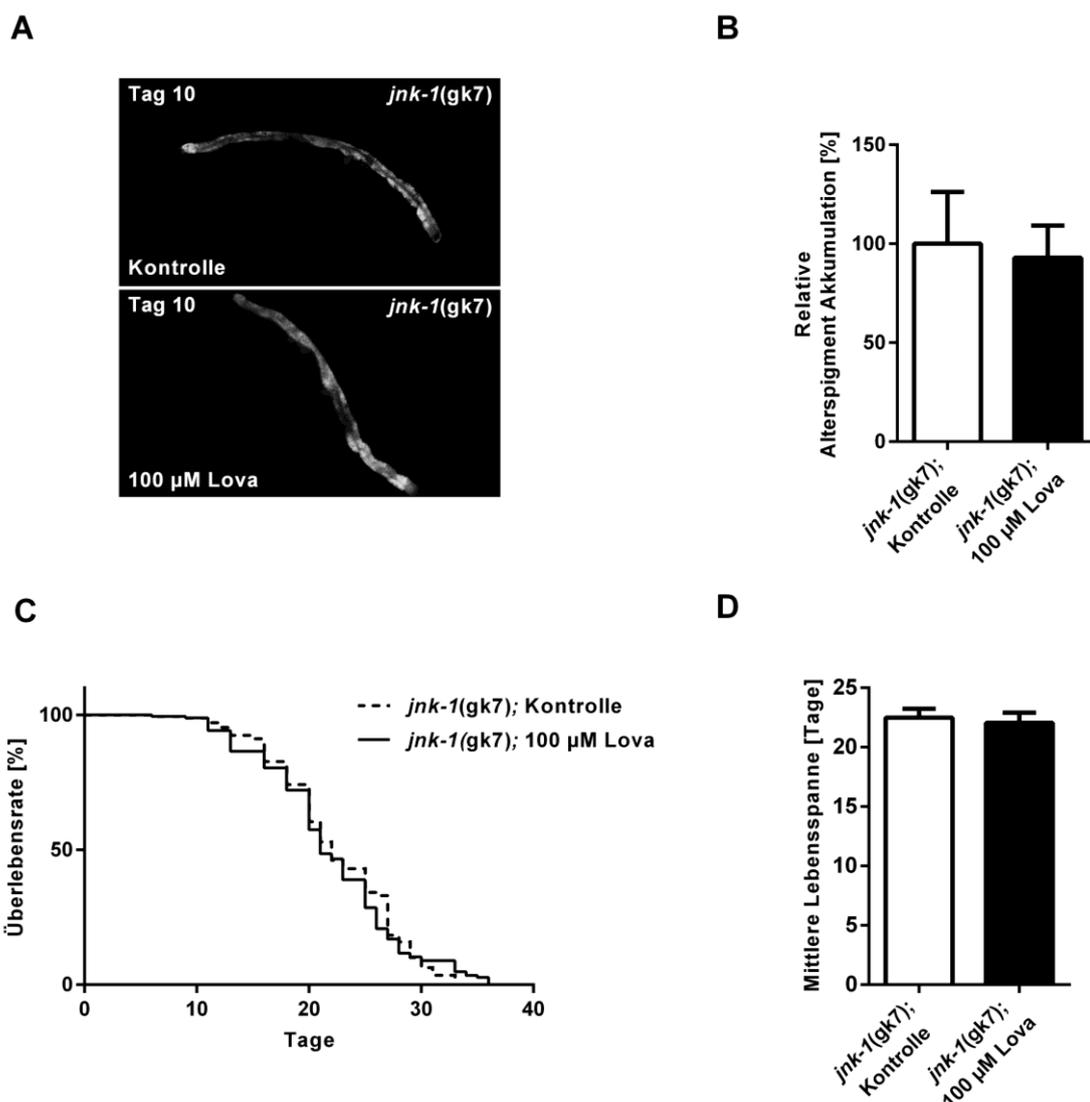


Abbildung 13: Einfluss von Lovastatin auf die Akkumulation des Alterspigments und die Lebensspanne einer *jnk-1* Mutante.

(A) Übersichtsaufnahmen der Akkumulation des Alterspigments einer *jnk-1* Mutante nach Behandlung mit 100 µM Lovastatin. Es war kein Unterschied zur Kontrolle erkennbar. (B) Quantifizierung der Akkumulation des Alterspigments einer *jnk-1* Mutante. Für dieses Experiment wurden Alters-synchrone L4 Larven bei 20°C in S-Medium_K, welches mit 100 µM Lovastatin oder 0,2 % DMSO versetzt war, inkubiert. Nach 10 Tagen wurde die Akkumulation des Alterspigments gemessen (Extinktion: 360-370 nm; Emission: 420-460 nm). Dargestellt ist die relative Akkumulation bezogen auf die Kontrolle (100 %) aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert ± SD, n=3, N ≥ 30). Die Behandlung mit 100 µM Lovastatin hat keinen Einfluss auf die Akkumulation des Alterspigments der *jnk-1* Mutante. (C) Gezeigt ist die Kaplan-Meier Überlebenskurve aus drei unabhängigen Durchläufen (n=3, N ≥ 186). Es ist kein Unterschied zwischen der Behandlung mit 100 µM Lovastatin und der Kontrolle (0,2 % DMSO) erkennbar. (D) Die mittlere Lebensspanne (Mittelwert ± SD, n=3, N ≥ 186) der *jnk-1* Mutante wird durch die Behandlung mit 100 µM Lovastatin (22,1±0,8 Tage) im Vergleich zur Kontrolle (22,5±0,7 Tage) nicht verändert. Für dieses Experiment wurden Alters-synchrone L4 Larven bei 20°C in S-Medium_K mit den entsprechenden Substanzen inkubiert.

Insgesamt zeigte sich, dass Lovastatin die mRNA-Expression der beiden DAF-16 Aktivatoren *aak-2* und *jnk-1* erhöhte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl die Lebensverlängerung als auch die reduzierte Akkumulation des Alterspigments durch

Lovastatin von JNK-1 abhängig sind. Daraus kann geschlossen werden, dass die Statin-vermittelte Lebensverlängerung neben DAF-16 auch JNK-1 abhängig ist.

3.5 Die Protektion durch Lovastatin ist nur teilweise eine Phänokopie der genetischen Inhibition der HMG-CoA-Reduktase mittels RNAi

Die MAP Kinase JNK-1 ist ein wichtiger Bestandteil von MAPK-Signalwegen, welche eine Vielzahl an zellulären Stressantworten regulieren (Wolf *et al.*, 2008). Auch bei metabolischem Stress spielt JNK-1 eine wichtige Rolle in *C. elegans* (Solinas & Becattini, 2017). Um herauszufinden, wodurch Lovastatin über JNK-1 und DAF-16 die Lebensverlängerung vermittelt, sollte der jeweilige Einfluss einer Inhibition von Mevalonat-abhängigen Prozessen auf die Statin-bedingte Reduktion der Akkumulation des Alterspigments untersucht werden. Dazu sollten die an diesen Prozessen beteiligten Enzyme jeweils mittels RNAi herunterreguliert werden. Zunächst musste dafür aber überprüft werden, ob die Protektion hinsichtlich der Akkumulation des Alterspigments durch Lovastatin eine Phänokopie der genetischen Inhibition der HMG-CoA-Reduktase (*hmgr-1*) mittels RNAi darstellt. Der dazu durchgeführte *Knockdown* der HMG-CoA-Reduktase hatte nach 10 Tagen eine gestörte Verteilung des Alterspigments zur Folge, wobei der Darm des Tieres nicht mehr erkennbar war (Abb.14). Auch eine 1:2 oder 1:4 Verdünnung der *hmgr-1* dsRNA produzierenden Bakterien bewirkte nach 10-tägiger Behandlung einen ähnlichen Phänotyp wie die Inkubation auf den unverdünnten Bakterien (Abb. 14). Erst ab einer Verdünnung von 1:8 konnte die Akkumulation des Alterspigments im Darm der Tiere wieder ausgewertet werden (Abb. 14).

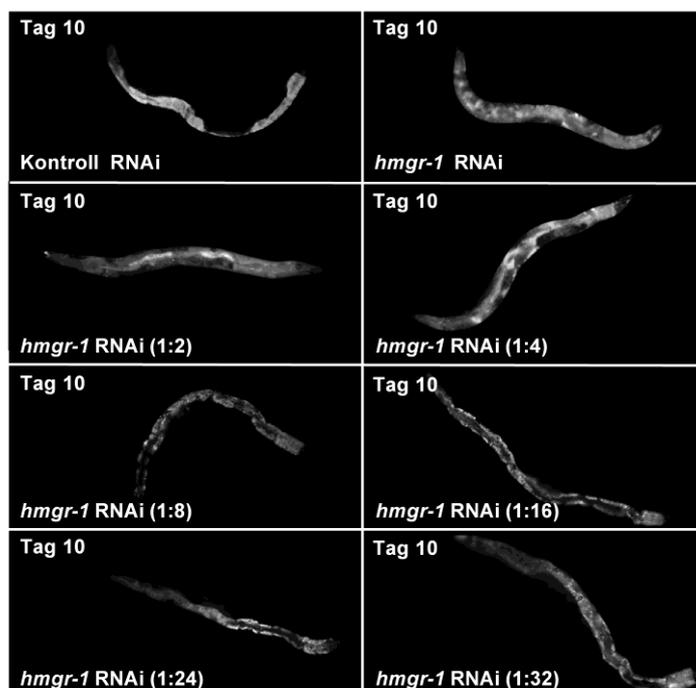


Abbildung 14: Akkumulation des Alterspigments nach genetischer Inhibition der HMG-CoA-Reduktase mittels verschiedenen dsRNA Verdünnungen.

Übersichtsaufnahmen der Akkumulation des Alterspigments nach Inkubation auf verschiedenen Verdünnungen von *hmgr-1* dsRNA produzierenden Bakterien im Wildtyp. Die Inkubation auf unverdünnten, 1:2 oder 1:4 verdünnten dsRNA produzierenden Bakterien hatte zur Folge, dass sich das Alterspigment im ganzen Tier verteilt und der Darm nicht mehr erkennbar war. Die Inkubation mit einer 1:8, 1:16, 1:24 oder 1:32 Verdünnung führte zu einer deutlichen Reduktion der Akkumulation des Alterspigments.

Dabei reduzierten die getesteten Verdünnungen von 1:8 bis 1:32 nach 10 Tagen gleichermaßen die Akkumulation des Alterspigments (um ca. 40 %) (Abb. 14 und Abb. 15A). Erst ab einer Verdünnung von 1:64 der Bakterien bewirkte die RNAi gegen die HMG-CoA-Reduktase keine Reduktion der Akkumulation des Alterspigments mehr (Abb. 15B und Anhang Abb. 29). Analog zu den Lovastatin-Versuchen hatten die niedrigste und die höchste protektive Verdünnung (1:8 bzw. 1:32) im Wildtyp in einer *daf-16*, *daf-2* oder *jnk-1* Mutante keine Wirkung mehr (Abb. 15C-E und Abb. 16). Die Analyse der *hmgr-1* Knockdown-Effizienz zeigte, dass eine zunehmende Verdünnung der dsRNA produzierenden Bakterien die Knockdown-Stärke von *hmgr-1*, welche anhand der mRNA Expression von *hmgr-1* gemessen wurde, reduzierte (Abb. 15F).

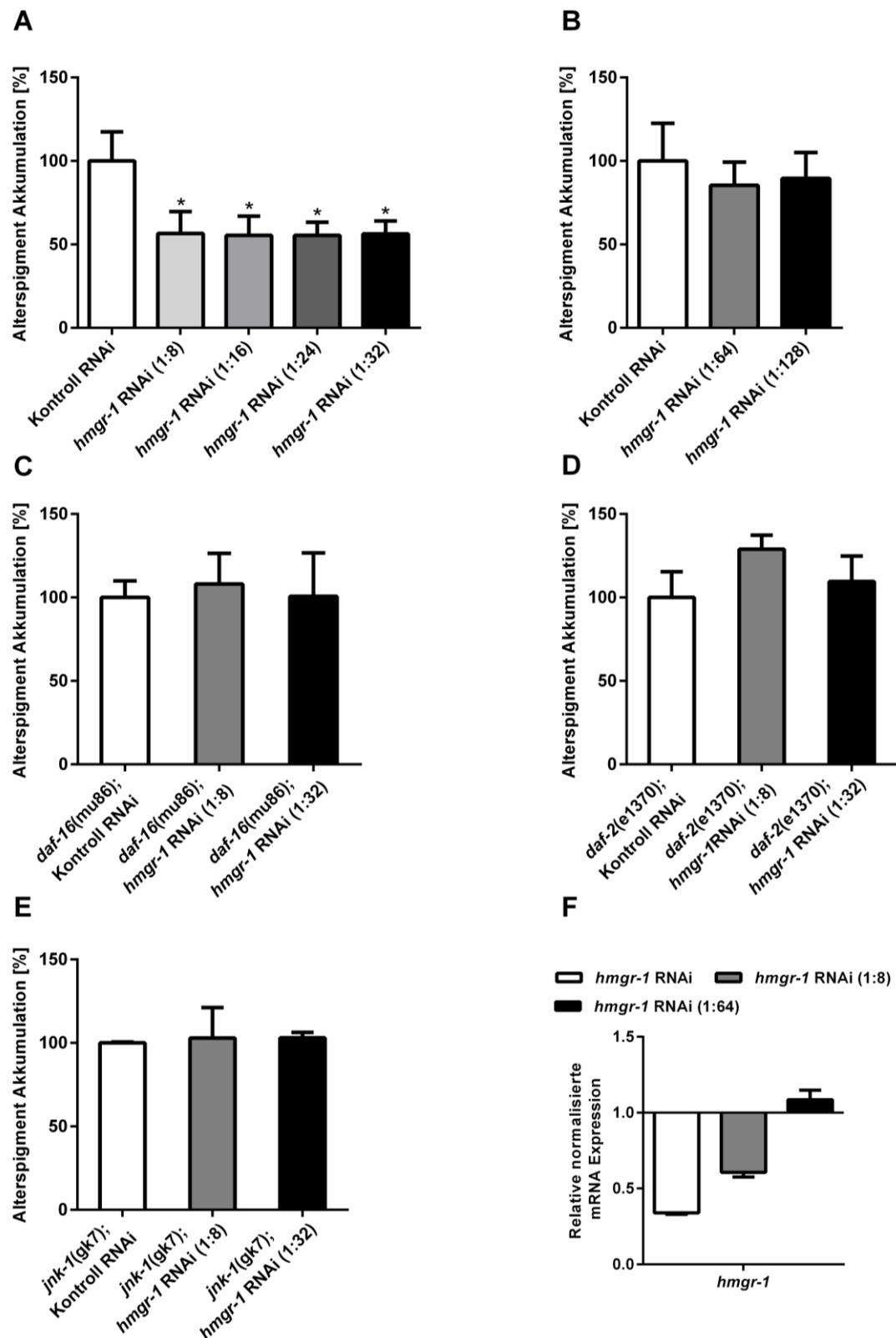


Abbildung 15: Akkumulation des Alterspigments nach genetischer Inhibition der HMG-CoA-Reduktase im Wildtyp einer *daf-16*, *daf-2* und *jnk-1* Mutante sowie die *Knockdown* Effizienz von *hmgr-1* im Wildtyp.

(A) Akkumulation des Alterspigments nach Inkubation auf verschiedenen Verdünnungen von *hmgr-1* dsRNA produzierenden Bakterien im Wildtyp. Für dieses Experiment wurden Alters-synchrone L4 Larven bei 20°C auf Agarplatten mit den entsprechenden Bakterien inkubiert. Nach 10 Tagen der adulten Lebensphase wurde die Akkumulation des Alterspigments gemessen

Auf Grundlage dieses positiven Befundes bezüglich der Akkumulation des Alterspigments sollte nun der jeweilige Einfluss einer gezielten Inhibition verschiedener Mevalonat-abhängiger Prozesse (Abb. 1) auf die Lovastatin-vermittelte Reduktion des Alterspigments untersucht werden. Für dieses *Screening*-Verfahren wurden die an diesen Prozessen beteiligten Enzyme (Tab. 9) jeweils mittels RNAi herunterreguliert und dann der Einfluss dieser genetischen Inhibition auf die Akkumulation des Alterspigments analysiert.

Tabelle 9: Auflistung von Enzymen von *C. elegans* die an Mevalonat-abhängigen Prozessen beteiligt sind und deren humanes Homolog.

Prozess	<i>C. elegans</i> Enzym	Humanes Homolog
Synthese von Farnesyldiphosphat	FDPS-1	Farnesyldiphosphatsynthase (FDPS)
Isopentenyl Adenosin	GRO-1	tRNA Isopentenylidiphosphat - Transferase (TRIT1)
Synthese von Coenzym Q	COQ-1	Prenyl (decaprenyl) diphosphatsynthase, Untereinheit 1 (PDSS1 oder COQ1)
	COQ-2	4-Hydroxybenzoat-Polyprenyltransferase (COQ2)
Protein Glykosylierung	B0024.13	Polyprenolreduktase oder Steroid 5 alpha-Reduktase 3 (SRD5A3)
Protein Prenylierung	FNTA-1	Farnesyltransferase, CAAX box, Untereinheit alpha (FNTA)
	FNTB-1	Farnesyltransferase, Untereinheit beta (FNTB)
	Y48E1B.3	Protein Geranylgeranyltransferase Typ-1 Untereinheit beta (PGGT1B)
	M57.2	Rab Geranylgeranyltransferase Typ 2 Untereinheit alpha (RABGGTA)
	GGTB-1	Rab Geranylgeranyltransferase Typ 2 Untereinheit beta (RABGGTB)

Der jeweilige *Knockdown* von 9 der 10 Kandidaten-Gene hatte keinen Einfluss auf die Akkumulation des Alterspigments nach 10 Tagen (Abb. 17A, B und C und Anhang Abb. 30, 31 und 32). Der *Knockdown* der Rab Geranylgeranyltransferase Typ 2 Untereinheit alpha M57.2 bewirkte dagegen einen ähnlichen Phänotyp wie der starke *Knockdown* der HMG-CoA-Reduktase hinsichtlich der Akkumulation des Alterspigments. Auch hier ist der Darm der Individuen nicht mehr erkennbar (Anhang Abb. 33). Ähnlich wie zuvor bei den RNAi-Versuchen mit *hmgr-1* führte eine Verdünnung dazu, dass die Akkumulation des Alterspigments im Darm wieder ausgewertet werden konnte. Jedoch verursachte keine der getesteten Verdünnungen (1:2, 1:4, 1:8, 1:32 und 1:64) eine Reduktion der Akkumulation des Alterspigments (Abb. 17D und E und Anhang Abb. 33 und 34). Die *Knockdown*-Effizienz von 8 der 10 eingesetzten siRNAs lag über 50 %. Die Effizienz der *coq-1* siRNA lag nur bei ca. 10 %. Für Y48E1B.3 konnte die *Knockdown*-Effizienz nicht bestimmt werden, da das Signal unterhalb des Detektionslevels lag (Anhang Abb. 35).

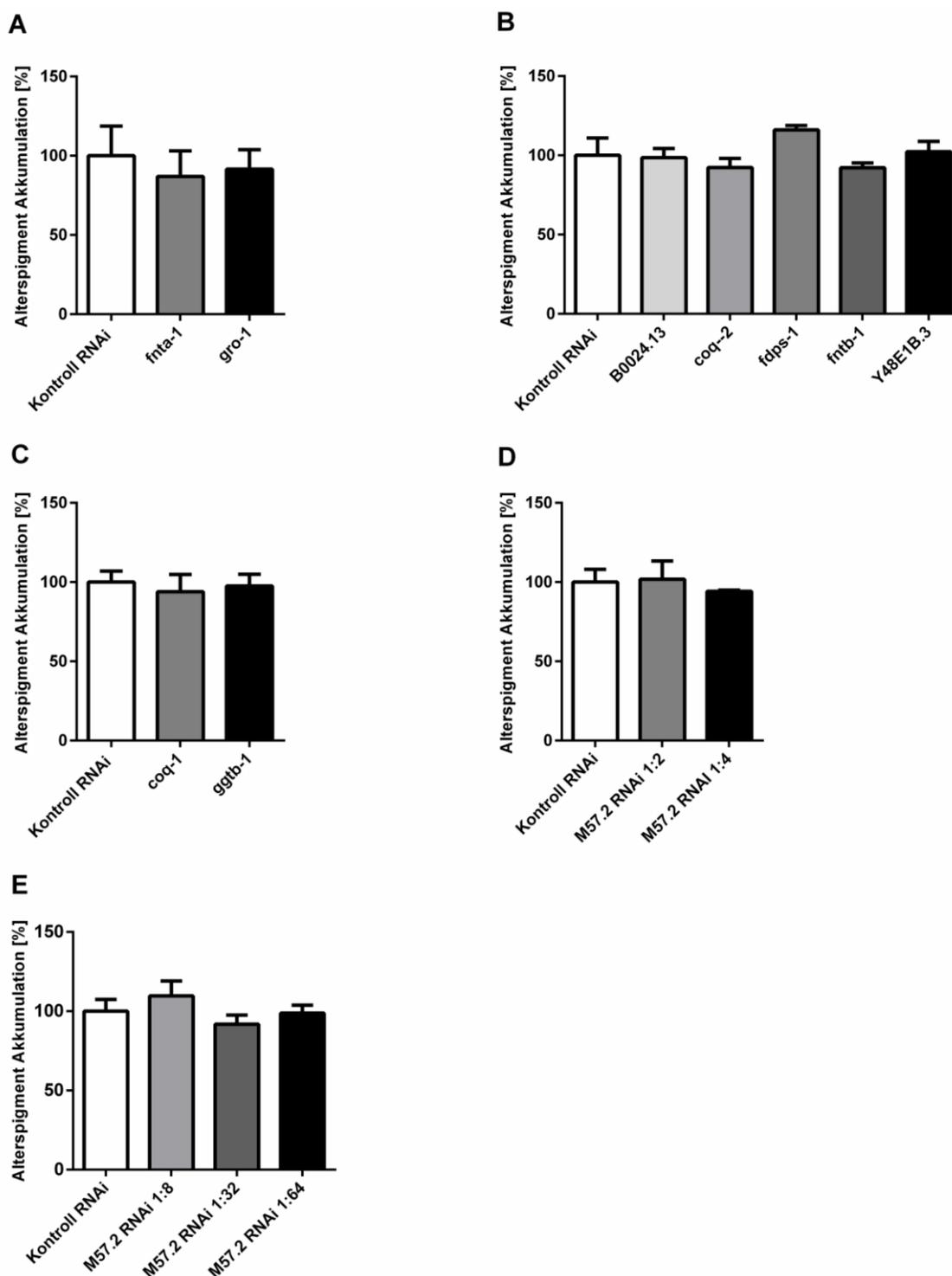


Abbildung 17: Akkumulation des Alterspigments nach *Knockdown* von Enzymen, welche an Mevalonat-abhängigen Prozessen beteiligt sind.

(A-C) Akkumulation des Alterspigments nach *Knockdown* von *fnta-1*, *gro-1* (A), B0024.13, *coq-2*, *fdps-1*, *fntb-1*, Y48E1B.3 (B), *coq-1* oder *ggtb-1* (C). Für diese Experimente wurden Alters-synchrone L4 Larven bei 20°C auf Agarplatten mit den entsprechenden Bakterien inkubiert. Nach 10 Tagen der adulten Lebensphase wurde die Akkumulation des Alterspigments gemessen (Extinktion: 360-370 nm; Emission: 420-460 nm). Dargestellt ist die relative Akkumulation bezogen auf die Kontrolle (100 %) aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, n=3, N \geq 31). In allen Fällen war kein Unterschied in der Akkumulation des Alterspigments im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. (D-E) Akkumulation des Alterspigments nach *Knockdown* von M57.2. Die Durchführung erfolgte wie unter (A-C) beschrieben. Dargestellt ist die relative Akkumulation bezogen auf die Kontrolle (100 %) aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, n=3,

N \geq 22). Die eingesetzten Verdünnungen der M57.2 dsRNA produzierenden Bakterien hatten keinen Einfluss auf die Akkumulation des Alterspigments.

Insgesamt bewirkt keiner der spezifischen *Knockdowns* einzelner Enzyme, welche an Mevalonat-abhängigen Prozessen beteiligt sind, eine Reduktion der Akkumulation des Alterspigments.

Nichtdestotrotz führte aber ein moderater *Knockdown* der HMG-CoA-Reduktase zu einer verringerten Akkumulation des Alterspigments (Abb. 15A). Daher sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob diese Reduktion auch prädiktiv für eine Lebensverlängerung ist. Dazu wurden wildtypische Individuen auf der niedrigsten (1:8) und höchsten (1:32) protektiven Verdünnung der *hmgr-1* dsRNA produzierenden Bakterien inkubiert und die Lebensspanne analysiert. Entgegen der Erwartung wurde in beiden Fällen die Lebensspanne von *C. elegans* deutlich verkürzt (Abb. 18A). Auch eine postreproduktive Inkubation, beginnend an Tag 8 der adulten Lebensphase, führte zu keiner Lebensverlängerung. Allerdings wurde die Lebensspanne auch nicht mehr verkürzt (Abb. 18B). Zusätzlich wurde überprüft, ob der abgeschwächte *Knockdown* der HMG-CoA-Reduktase nach 24 Stunden zu einer Translokation von DAF-16::GFP führt, wie durch die Behandlung mit 100 μ M Lovastatin beobachtet werden konnte (Abb. 9C). Hier zeigte sich, dass weder die 1:8 noch die 1:32 Verdünnung der *hmgr-1* dsRNA produzierenden Bakterien eine Veränderung in der Lokalisation von DAF-16::GFP bewirken konnte (Abb. 18C).

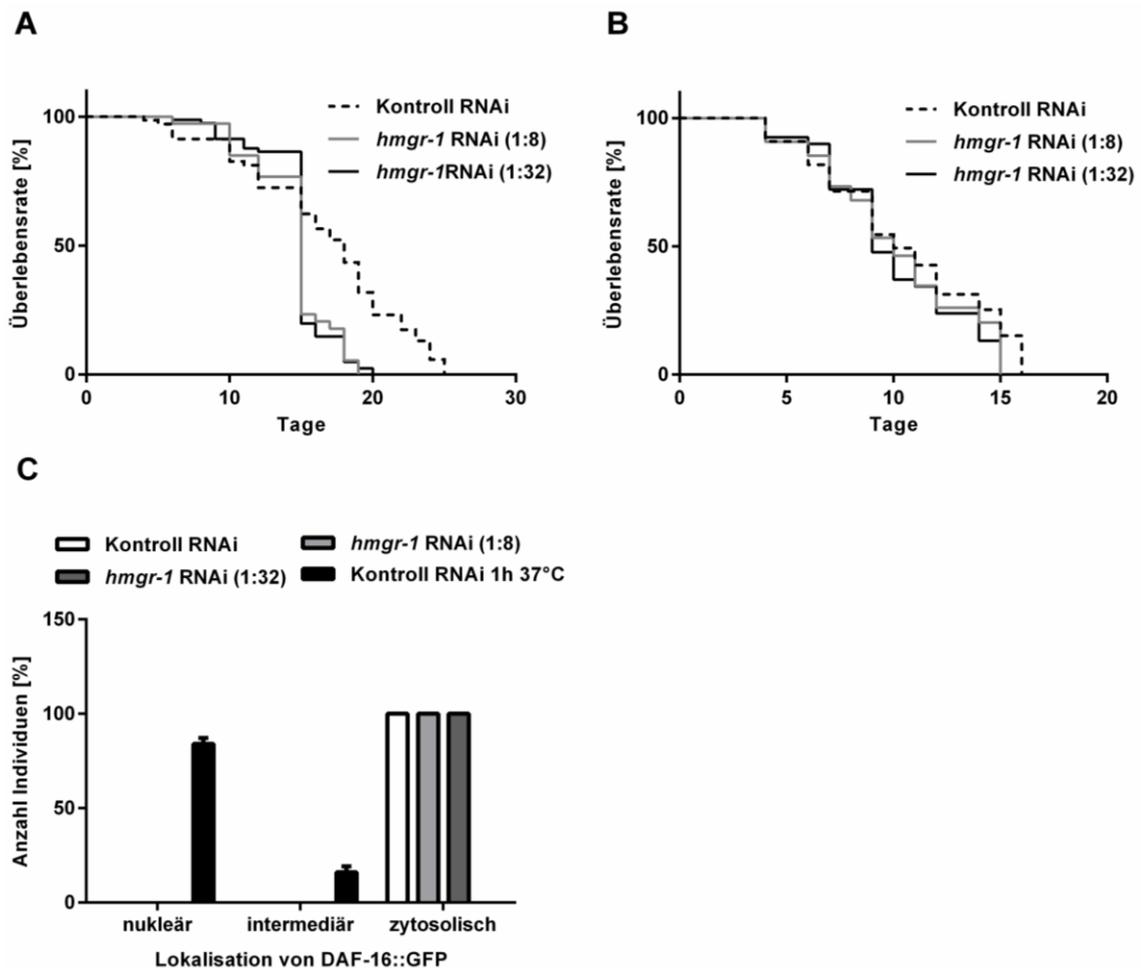


Abbildung 18: Analyse der Lebensspanne nach genetischer Inhibition der HMG-CoA-Reduktase mittels verschiedener dsRNA Verdünnungen.

(A) Gezeigt ist die Kaplan-Meier Überlebenskurve aus drei unabhängigen Durchläufen ($n=3$, $N \geq 76$) nach genetischer Inhibition mittels 1:8 oder 1:32 verdünnten dsRNA produzierenden Bakterien. Die Lebensspanne wurde in beiden Fällen durch den moderaten *Knockdown* von *hmgr-1* verkürzt. (B) Kaplan-Meier Überlebenskurve aus drei unabhängigen Durchläufen ($n=3$, $N \geq 75$) nach postreproduktiver (Start= Tag 8 der adulten Lebensphase) genetischer Inhibition mittels 1:8 oder 1:32 verdünnten dsRNA produzierenden Bakterien. Die postreproduktive Inhibition hatte in beiden Fällen keinen Einfluss auf die Lebensspanne. (C) Quantifizierung der Lokalisation von DAF-16 nach 24-stündiger genetischer Inhibition mittels 1:8 oder 1:32 verdünnten dsRNA produzierenden Bakterien. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, $n=3$, $N \geq 45$). Der leichte *Knockdown* von *hmgr-1* hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation von DAF-16.

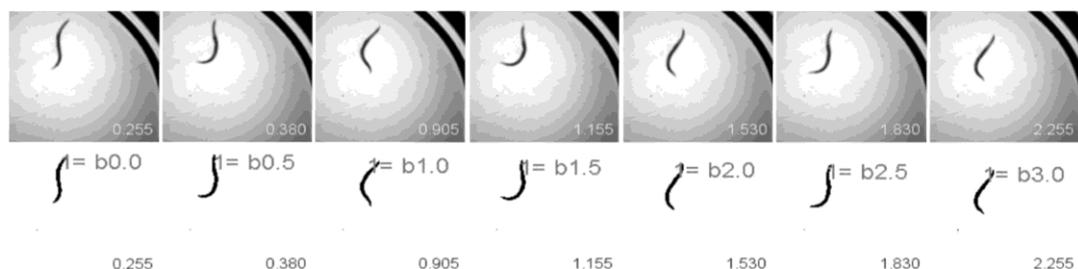
Insgesamt zeigte sich, dass ein moderater *Knockdown* der HMG-CoA-Reduktase eine Reduktion der Akkumulation des Alterspigments bedingte, welche allerdings nicht prädiktiv für eine Lebensverlängerung war.

3.6 Simvastatin vermittelt eine Mevalonat – und DAF-16-abhängige Verzögerung der physiologischen Alterung

Die genetische Inhibition mittels RNAi der HMG-CoA-Reduktase ist nicht vergleichbar mit einer pharmakologischen Inhibition durch Lovastatin hinsichtlich der Lebensverlängerung. Die Akkumulation des Alterspigments konnte dagegen mit Hilfe

eines moderaten *Knockdown* der HMG-CoA Reduktase ähnlich wie durch Lovastatin reduziert werden. Daher scheint dieser Endpunkt in diesem Fall kein zuverlässiger prädiktiver Biomarker für das physiologische Alter zu sein und es wurde nach einer neuen Möglichkeit gesucht, die Abhängigkeit der Protektion durch Lovastatin von den Mevalonat-abhängigen Prozessen zu untersuchen. Neben der Akkumulation des Alterspigments ist die Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung der am meisten genutzte und prädiktive Biomarker für das physiologische Alter in *C. elegans* (Collins et al., 2008). Zur Messung der Körperbewegung wurden Individuen mit 100 μM Lovastatin behandelt und an Tag 4, 8 und 10 der adulten Lebensphase die Schlagbewegungen der Individuen in Flüssigmedium analysiert. Dazu wurde die Anzahl der Ausschläge mit Hilfe eines ImageJ Makros ausgewertet. Hierbei wurde eine Bewegung in eine Richtung als halber Ausschlag gezählt und erst bei einer darauffolgenden Bewegung in die entgegengesetzte Richtung als kompletter Ausschlag gewertet (Abb. 19A). Die Behandlung mit 100 μM Lovastatin hatte an keinem Messtag einen Einfluss auf die Fähigkeit zur Körperbewegung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 19B). Allerdings war auch keine altersabhängige Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung in der Kontrolle erkennbar (Abb. 19B).

A



B

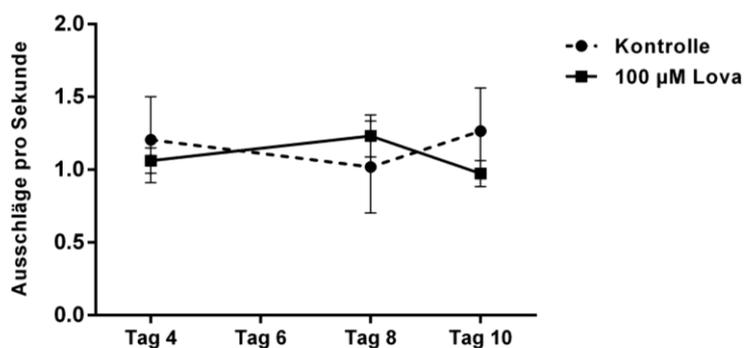


Abbildung 19: Einfluss von Lovastatin auf die altersabhängige Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung.

(A) Bildsequenz der Körperbewegung eines Individuums an Tag 4 der adulten Lebensphase nach Behandlung mit 0,2 % DMSO (Kontrolle). Die obere Reihe zeigt die Originalaufnahme, die untere

Reihe die dazugehörige computergestützte Auswertung mit Hilfe von ImageJ. Ein Ausschlag in eine Richtung wurde als halber Ausschlag (zweites Bild: $1=b0.5$, 1 ist die Nummer des Individuums und b steht für *bends*) gewertet und erst bei einem darauffolgenden Ausschlag in die entgegengesetzte Richtung (drittes Bild: $1=b1.0$) als ganzer Ausschlag gewertet. Die Zahl unten rechts in jedem Bild ist die Zeitanagabe in Sekunden. **(B)** Quantifizierung der Fähigkeit zur Körperbewegung an Tag 4, 8 und 10 der adulten Lebensphase nach Behandlung mit 100 μM Lovastatin. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ausschläge pro Sekunde pro Individuum aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, $n=3$, $N \geq 45$). Es kam zu keiner altersabhängigen Abnahme der Körperbewegung innerhalb der Kontrolle (0,2 % DMSO). Zudem hatte die Behandlung mit Lovastatin keinen Einfluss auf die Körperbewegung.

Da es unter den gegebenen Bedingungen zu keiner altersabhängigen Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung kam, war der Biomarker innerhalb des verwendeten experimentellen Aufbaus nicht geeignet, um die physiologische Alterung zu untersuchen. Es ist bekannt, dass eine Inkubation in Flüssigmedium das Muskelwachstum in *C. elegans* stimuliert, wodurch es zu einer verzögerten Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung kommen könnte (Harada *et al.*, 2016). Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Lovastatin in Wasser konnten die Nematoden allerdings nur in Flüssig- aber nicht auf Festmedium mit der entsprechenden Lovastatin Konzentration behandelt werden. Daher wurde nach einem Statin mit höherer Löslichkeit in Wasser gesucht, welches eine qualitativ ähnliche Protektion wie Lovastatin bewirkt. Mit Fluva- und Simvastatin wurden zwei sehr gut wasserlösliche Statine zunächst auf ihren Einfluss auf die Fertilität von *C. elegans* untersucht, um die generelle Toxizität zu untersuchen. Eine Behandlung mit Fluvastatin führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der Anzahl an lebendigen Nachkommen, wobei mit der höchsten Konzentration von 100 μM Fluvastatin die Fertilität um ca. 71 % reduziert wurde (Abb. 20A). Dagegen bewirkte bei Simvastatin nur die Behandlung mit 100 μM eine Reduktion der Fertilität um ca. 32 % (Abb. 20A). Die Analyse der Lebensspanne zeigte, dass lediglich 50 und 100 μM Simvastatin die Lebensspanne um ca. 13 % verlängern konnten (Abb. 20B und D). Die Behandlung mit 100 μM Fluvastatin führte dagegen zu einer Verkürzung der Lebensspanne um ca. 30 % (Abb. 20C und D). Die anderen getesteten Statin-Konzentrationen hatten keinen Einfluss auf die Lebensspanne (Abb. 20B, C und D).

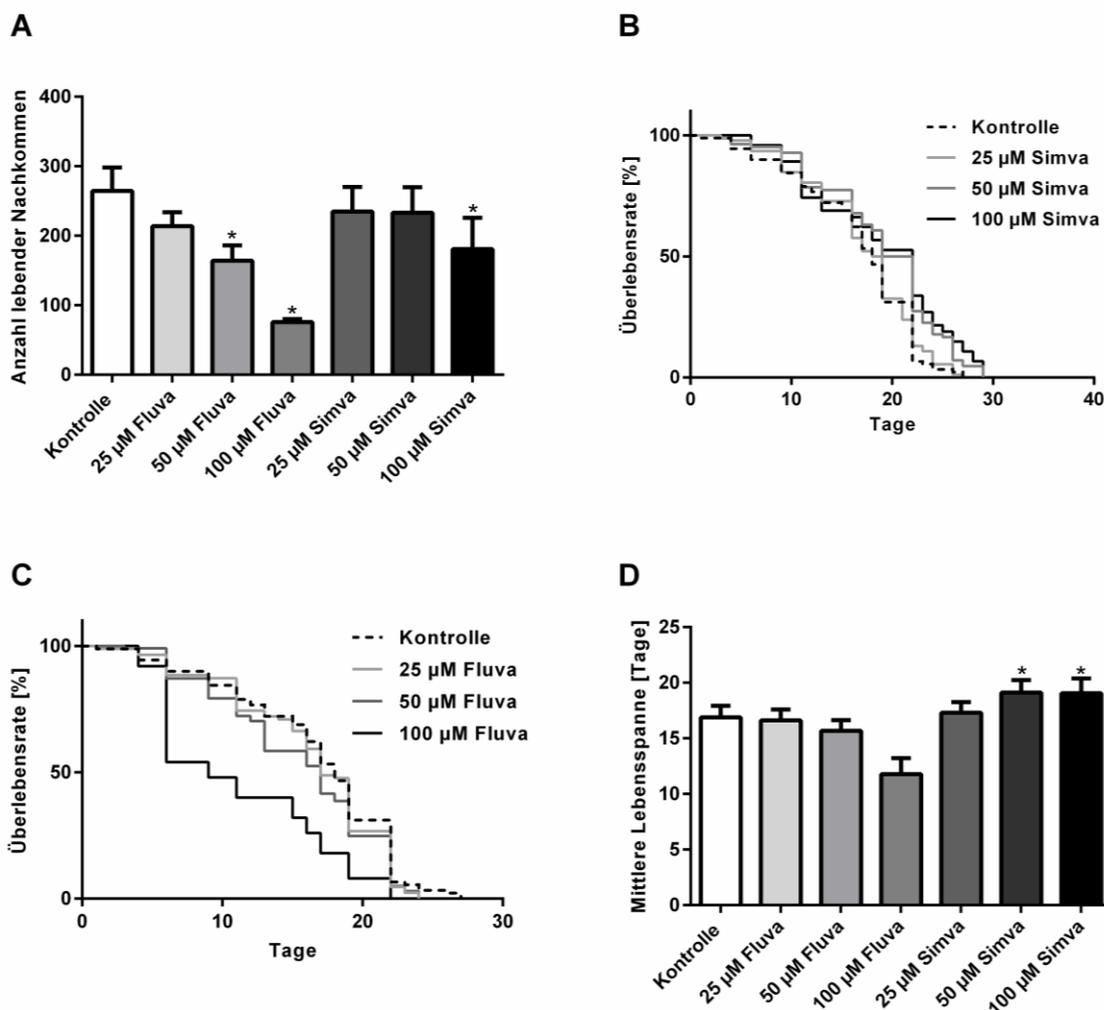


Abbildung 20: Einfluss von Fluva- und Simvastatin auf die Fertilität und die Lebensspanne.

(A) Anzahl der lebenden Nachkommen pro Individuum der gesamten reproduktiven Phase (5 Tage) während Behandlung mit Fluva- oder Simvastatin. Für die Behandlung wurden alterssynchrone und wildtypische L4 Larven auf Agarplatten mit den entsprechenden Statin-Konzentrationen behandelt. Dargestellt ist die mittlere Fertilität aus drei unabhängigen Durchläufen ((Mittelwert \pm SD, $n=3$, $N \geq 14$). 50 ($264,5 \pm 27,4$) und 100 μM ($164,1 \pm 18$) Fluvastatin reduzierte die Fertilität im Vergleich zur Kontrolle ($75,8 \pm 3,7$, 0,2 % DMSO). Auch die Behandlung mit 100 μM Simvastatin ($180,9 \pm 36,8$) führte zu einer Reduktion der Fertilität. Statistischer Test: One-Way ANOVA, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (0,2 % DMSO). (B) Gezeigt ist die Kaplan-Meier Überlebenskurve aus drei unabhängigen Durchläufen ($n=3$, $N \geq 102$) nach Behandlung mit 25, 50 oder 100 μM Simvastatin. 50 und 100 μM Simvastatin erhöhten die Lebensspanne um ca. 13 % im Vergleich zur Kontrolle (0,2 % DMSO). (C) Gezeigt ist die Kaplan-Meier Überlebenskurve aus drei unabhängigen Durchläufen ($n=3$, $N \geq 102$; außer 100 μM Fluvastatin: $n=2$; $N \geq 60$) nach Behandlung mit 25, 50 oder 100 μM Fluvastatin. 100 μM Fluvastatin reduzierte die Lebensspanne um ca. 30 % im Vergleich zur Kontrolle (0,2 % DMSO). (D) Die mittlere Lebensspanne (Mittelwert \pm SD, $n=3$, $N \geq 102$, außer 100 μM Fluvastatin: $n=2$; $N \geq 60$) wurde durch die Behandlung mit 50 ($19,1 \pm 1,1$) oder 100 μM Simvastatin ($19,0 \pm 1,4$ Tage) im Vergleich zur Kontrolle ($16,9 \pm 1,0$ Tage, 0,2 % DMSO) erhöht. Dagegen wurde die Lebensspanne durch die Behandlung mit 100 μM Fluvastatin ($11,8 \pm 1,4$) reduziert. Statistischer Test: Mantel-Cox log rank test, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (0,2 % DMSO). Da das Experiment mit 100 μM Fluvastatin nur zweimal unabhängig voneinander durchgeführt wurde, wurde auf eine statistische Analyse verzichtet.

Da die Behandlung mit Simvastatin in einer Lebensverlängerung resultierte, wurde dieses Statin ausgewählt, um erneut den Einfluss von Statin auf die Abnahme der

Fähigkeit zur Körperbewegung zu untersuchen. Entgegen den Versuchen mit Lovastatin in Flüssigmedium kam es in diesem Versuch auf Festmedium zu einer altersabhängigen Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung innerhalb der Kontrolle (Abb. 21A). Die Behandlung mit 50 und 100 μM Simvastatin bewirkte zudem eine deutliche Verzögerung der Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung an Tag 8 und 10 (Abb. 21A).

Im nächsten Versuch sollte überprüft werden, ob diese Protektion durch Simvastatin analog zu Lovastatin auch Mevalonat- und DAF-16-abhängig ist. Dazu wurde die Fähigkeit zur Körperbewegung an Tag 10 der adulten Lebensphase nach Behandlung mit 100 μM Simvastatin und gleichzeitiger Gabe von 20 mM Mevalonat sowie in einer *daf-16*-Mutante gemessen. Durch die Co-Behandlung mit Simvastatin und Mevalonat verlor Simvastatin seinen protektiven Effekt hinsichtlich der Aufrechterhaltung der Fähigkeit zur Körperbewegung (Abb. 21B). In einer *daf-16* Mutante hatte die alleinige Behandlung mit Simvastatin keinen Effekt mehr auf die Fähigkeit zur Körperbewegung (Abb. 21B). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass wie bei Lovastatin auch die Protektion durch Simvastatin Mevalonat und DAF-16 abhängig ist.

Wie zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, sollte mit Hilfe des neuen Biomarkers für das physiologische Alter die Abhängigkeit der Statin-vermittelten Protektion von den Mevalonat-abhängigen Prozessen untersucht werden. Daher wurde die Fähigkeit der Körperbewegung erneut untersucht, wobei die Individuen zusätzlich zu Simvastatin auch noch mit einer Vorstufe Mevalonat-abhängiger Prozesse behandelt wurden. Dadurch wurde ein möglicher Einfluss dieser Prozesse auf die Statin-vermittelte Protektion unterbunden. Dazu wurde Farnesylpyrophosphat (FPP), Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und Ubichon 10 (Q10) verwendet. Die Abhängigkeit des Statin-Effekts von der Glykosylierung konnte nicht untersucht werden, da Dolichylphosphat nicht kommerziell erhältlich war. Wiederum wurde die Fähigkeit zur Körperbewegung an Tag 10 der adulten Lebensphase ausgewertet. Es zeigte sich, dass in allen Fällen eine Tendenz zur Verzögerung der Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung, wie nach alleiniger Behandlung mit Simvastatin, erhalten blieb (Abb. 21C). Mit Hilfe eines Prenylierungs-Reporterstamms konnte aber alters-unabhängig gezeigt werden, dass sowohl Simvastatin als auch Lovastatin die Prenylierung von Proteinen hemmen können (Anhang Abb. 36).

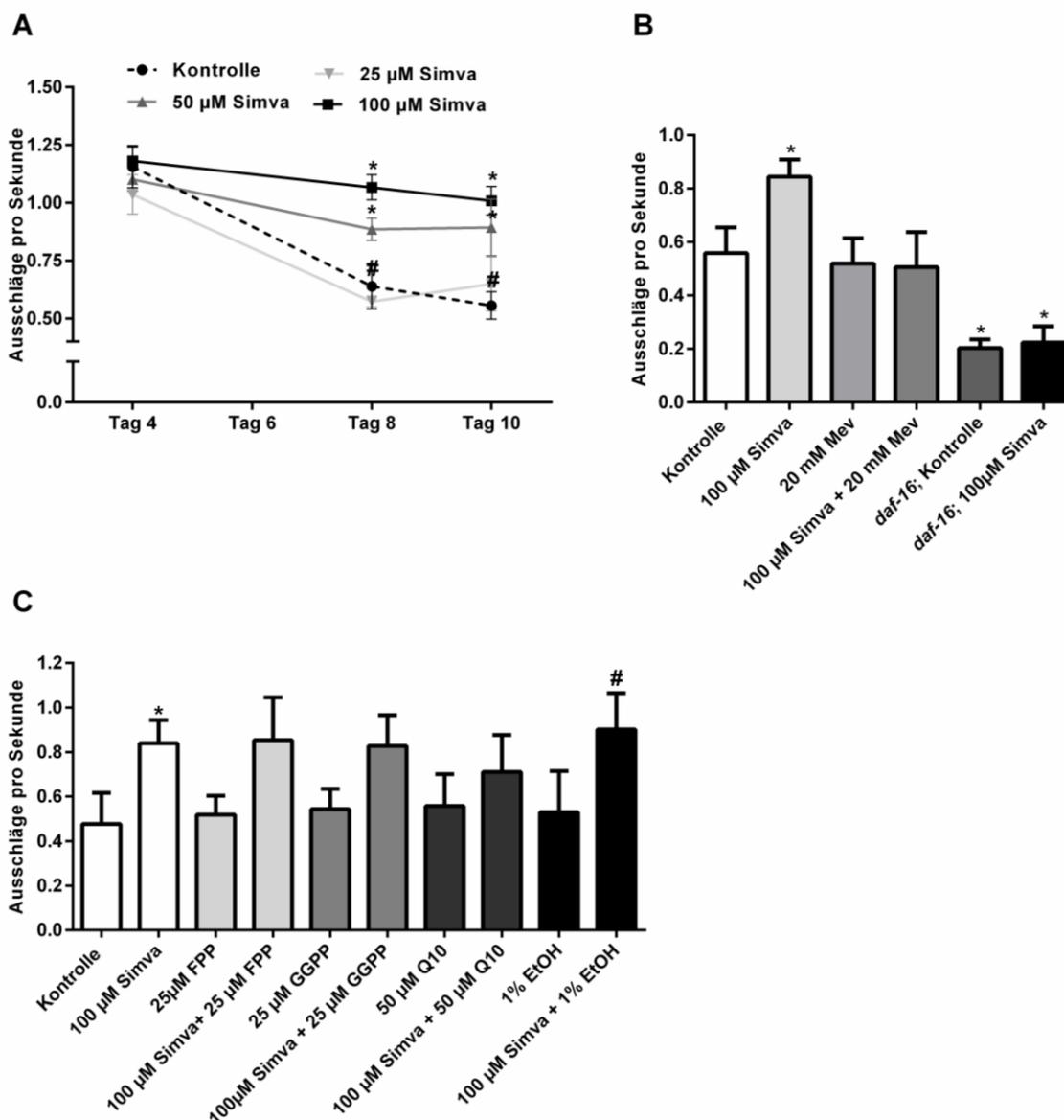


Abbildung 21: Einfluss von Simvastatin und/oder der Mevalonat-abhängigen Prozesse auf die Fähigkeit zur Körperbewegung.

(A) Quantifizierung der Fähigkeit zur Körperbewegung an Tag 4, 8 und 10 der adulten Lebensphase nach Behandlung mit 25, 50 oder 100 µM Simvastatin. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ausschläge pro Sekunde pro Individuum aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, $n=3$, $N \geq 48$). Es kam zu einer altersabhängigen Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung innerhalb der Kontrolle (0,2 % DMSO) von Tag 4 ($1,16 \pm 0,09$) über Tag 8 ($0,64 \pm 0,10$) bis Tag 10 ($0,56 \pm 0,06$). Die Behandlung mit 50 und 100 µM Simvastatin verzögerte diese Abnahme an Tag 8 ($0,89 \pm 0,05$ bzw. $1,07 \pm 0,05$) und Tag 10 ($0,89 \pm 0,12$ bzw. $1,00 \pm 0,06$). Statistischer Test: Two-Way ANOVA, $*p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (0,2 % DMSO), $\#p \leq 0,05$ vs. Kontrolle Tag 4 (0,2 % DMSO). **(B)** Fähigkeit zur Körperbewegung an Tag 10 der adulten Lebensphase nach Behandlung mit Simvastatin und Mevalonat. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ausschläge pro Sekunde pro Individuum an Tag 10 aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, $n=3$, $N \geq 44$). Die Behandlung mit 100 µM Simvastatin ($0,84 \pm 0,06$) erhöhte die Fähigkeit zur Körperbewegung nach 10 Tagen im Vergleich zur Kontrolle ($0,56 \pm 0,09$, 0,2 % DMSO). Durch die Co-Behandlung mit 100 µM Simvastatin und 20 mM Mevalonat verlor Simvastatin seinen protektiven Effekt. In einer *daf-16* Mutante hatte Simvastatin keinen Effekt auf die Fähigkeit zur Körperbewegung. Statistischer Test: One-Way ANOVA, $*p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (0,2 % DMSO). **(C)** Fähigkeit zur Körperbewegung an Tag 10 der adulten Lebensphase nach Co-Behandlung mit Simvastatin und der jeweiligen Vorstufe eines Mevalonat-abhängigen Prozesses. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ausschläge pro Sekunde pro Individuum an Tag 10 aus drei

unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, $n=3$, $N \geq 56$). 100 μM Simvastatin ($0,84 \pm 0,10$) verzögerte die Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung nach 10 Tagen im Vergleich zur Kontrolle ($0,48 \pm 0,14$, 0,2 % DMSO). Alle Co-Inkubationen von Simvastatin mit der jeweiligen Vorstufe der Mevalonat-abhängigen Prozesse zeigten eine ähnliche Tendenz zur Verzögerung der Abnahme wie die Behandlung mit Simvastatin alleine. Als Lösungsmittel für Q10 wurde EtOH verwendet. Statistischer Test: One-Way ANOVA, * $p \leq 0,05$ vs. 0,2 % DMSO, # $p \leq 0,05$ vs. 0,2 % DMSO + 1 % EtOH.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass es durch eine Inkubation im Flüssigmedium zu keiner altersabhängigen Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung kommt. Daher konnte auch der Einfluss des schlecht wasserlöslichen Lovastatin auf diesen Biomarker nicht untersucht werden. Weiterhin verzögerte eine Behandlung mit 50 und 100 μM Simvastatin (wasserlöslich) die altersabhängige Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung auf Festmedium. Diese Verzögerung war Mevalonat und DAF-16 abhängig.

3.7 Simvastatin reduziert die altersabhängige PolyQ-Aggregation und erhöht die Überlebensrate bei thermalem Stress

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist eine Vermutung, dass die Alterspigmente mitunter aus quervernetzten Proteinen bestehen. Weiterhin ist bekannt, dass Hitzestress bei Proteinen zur Fehlfaltung und letztendlich zur Proteinaggregation führt. Innerhalb der eigenen Masterarbeit^{1(S.37)} konnte bereits gezeigt werden, dass Lovastatin die Überlebensrate bei thermalen Stress erhöht (Jahn *et al.*, 2020). Zudem reduziert Lovastatin die Akkumulation des Alterspigments. Daher sollte zunächst der Einfluss von Simvastatin auf das Überleben bei Hitzestress untersucht werden und aufbauend darauf der Einfluss des Statins auf eine altersabhängige Proteinaggregation mit Hilfe eines Reporterstammes. Für die Analyse der thermalen Stressresistenz wurden die Individuen mit den beiden lebensverlängernden Simvastatin-Konzentrationen 50 und 100 μM für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden die Tiere für 8 Stunden bei 35°C inkubiert und die Überlebensrate ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass eine Vorinkubation mit 50 μM Simvastatin eine deutlich erhöhte Überlebensrate (um ca. 37%) bewirkte (Abb. 22A). Auch durch eine Vorinkubation mit 100 μM Simvastatin war eine solche Tendenz zu einer erhöhten Überlebensrate erkennbar (Abb. 22A). Neben dieser Endpunktbestimmung wurde mit Hilfe der *Lifespan-Machine* auch das Überleben in Echtzeit nach 24 stündiger Vorbehandlung mit 50 μM Simvastatin bei 35°C untersucht. Auch in diesem Fall führte die Vorinkubation mit Simvastatin zu einer gesteigerten Überlebensrate um ca. 8 % (Abb. 22B).

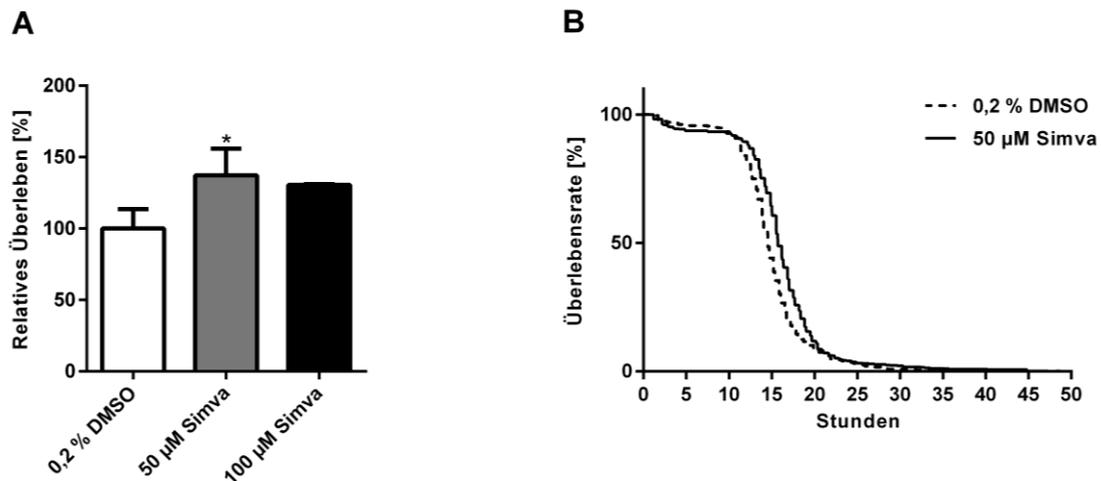


Abbildung 22: Einfluss von Simvastatin auf die Überlebensrate bei thermalem Stress.

(A) Überleben nach 24-stündiger Vorbehandlung mit 50 oder 100 µM Simvastatin und 8-stündiger Inkubation bei 35°C. Dargestellt ist die relative Überlebensrate bezogen auf die Kontrolle (100%) aus drei unabhängigen Durchläufen (Mittelwert ± SD, n=3, N ≥ 110). Durch die Behandlung mit 50 µM Simvastatin (137 % ± 19 %) überlebten mehr Tiere den Hitzestress im Vergleich zur Kontrolle (100 % ± 14 %, 0,2 DMSO). Statistischer Test: One-Way ANOVA, *p ≤ 0,05 vs. Kontrolle (0,2 % DMSO). **(B)** Gezeigt ist die Kaplan-Meier Überlebenskurve aus drei unabhängigen Durchläufen (n=3, N ≥ 594) nach 24-stündiger Vorbehandlung mit 50 µM Simvastatin bei 35°C. Durch die Vorbehandlung wurde die mittlere Überlebensspanne um 8% im Vergleich zur Kontrolle (0,2 % DMSO) erhöht. Dieses Experiment wurde mit Hilfe der *Lifespan-Machine* durchgeführt. Statistischer Test: Mantel-Cox log rank test, *p ≤ 0,05 vs. Kontrolle (0,2 % DMSO).

Zusammenfassend zeigte sich demnach, dass auch Simvastatin die thermale Stressresistenz von *C. elegans* erhöht.

Im Weiteren sollte nun überprüft werden, ob Simvastatin auch einen Einfluss auf die Proteinaggregation hat. Für diese Untersuchungen wurden zwei Reporterstämme für Proteinaggregation analysiert. Diese beiden Reporterstämme tragen ein Plasmid, welches jeweils für ein Nonsense-Protein, bestehend aus 35 Glutaminen (Q35) bzw. 40 Glutaminen (Q40), kodiert und unter der Kontrolle eines Muskel-spezifischen Promotors exprimiert wird. Beide Proteine sind mit einem YFP (engl. *yellow fluorescent protein*) fusioniert. Polyglutamin-Einheiten spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Polyglutaminerkrankungen wie zum Beispiel Chorea Huntington (Kalathur *et al.*, 2015). Dabei neigen längere Polyglutaminketten schneller dazu zu aggregieren. Aus der Literatur weiß man, dass Q35 altersabhängig ab dem L4-Stadium aggregiert, wohingegen Q40 bereits ab dem L4 Stadium größtenteils aggregiert ist (Morley *et al.*, 2002). Die Aggregation von Q35 und Q40 wurde an Tag 4, 8 und 10 untersucht. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit 25 und 100 µM Simvastatin die altersabhängige Aggregation von Q35::YFP an Tag 8 verzögerte (Abb. 23A und Abb. 24). Bei Q40 kam es nur zu einer leichten altersabhängigen Zunahme der Aggregation von Tag 4 bis Tag 10 (Abb. 23B und Abb 25). Dieser altersabhängige Anstieg der Aggregation wurde durch

die Behandlung mit 50 und 100 μM Simvastatin an Tag 10 verzögert (Abb. 23B und Abb. 25).

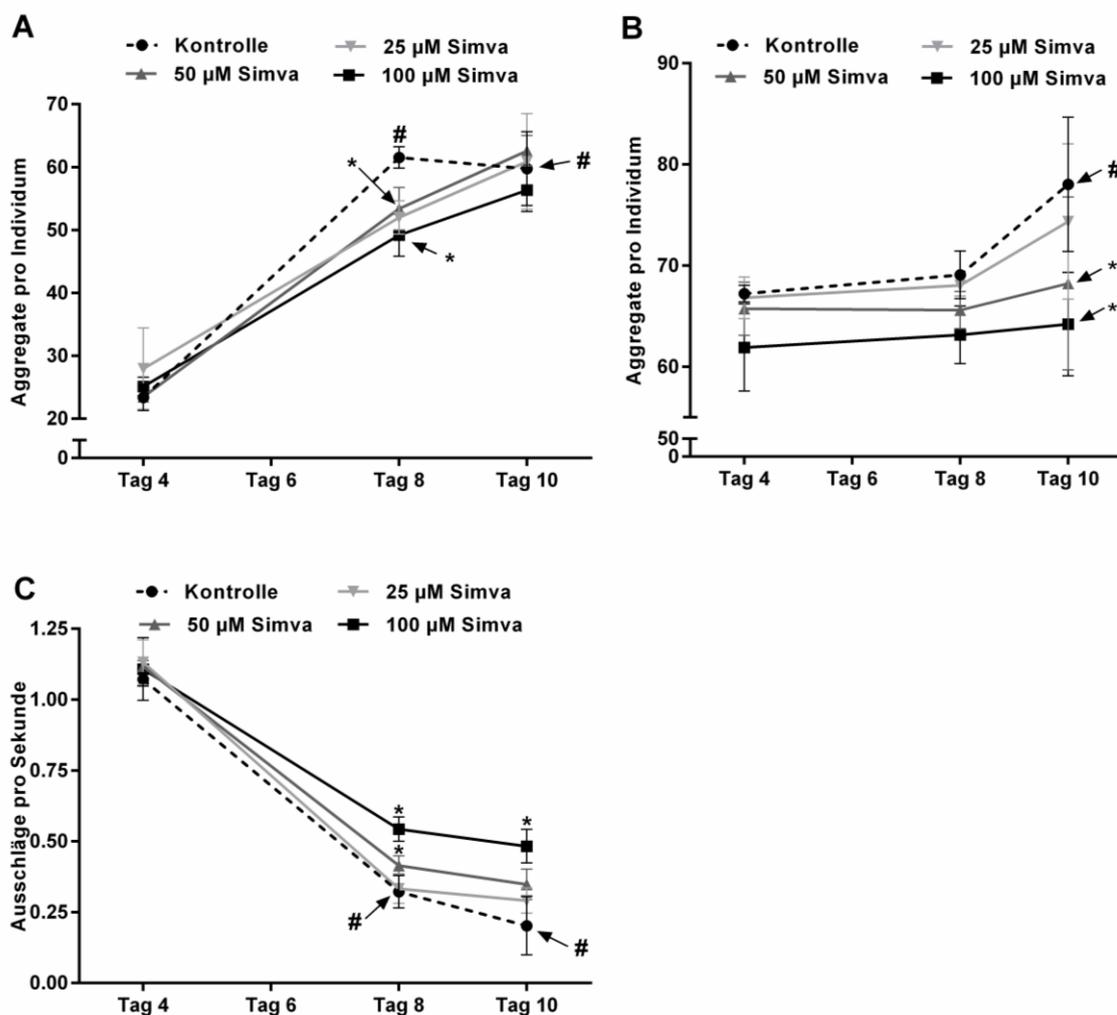


Abbildung 23: Einfluss von Simvastatin auf die altersabhängige und altersunabhängige Aggregation von PolyQs.

(A) Quantifizierung der Aggregation von Q35::YFP nach Behandlung mit Simvastatin an Tag 4, 8 und 10. Die Individuen wurden mit den entsprechenden Konzentrationen oder 0,2 % DMSO auf Agarplatten behandelt. Dargestellt ist die mittlere Anzahl an Q35::YFP Aggregaten aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, $n=3$, $N \geq 41$). Die Aggregation von Q35 stieg altersabhängig in der Kontrolle (0,2 % DMSO) von Tag 4 (23 ± 2) auf Tag 10 (60 ± 6) an. Durch die Behandlung mit 25 (52 ± 3) oder 100 μM Simvastatin (49 ± 3) wurde diese Aggregation an Tag 8 im Vergleich zur Kontrolle (62 ± 2) verzögert. Statistischer Test: Two-Way ANOVA, $*p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (0,2 % DMSO), $\#p \leq 0,05$ vs. Kontrolle Tag 4 (0,2 % DMSO). **(B)** Quantifizierung der Aggregation von Q40::YFP nach Behandlung mit Simvastatin an Tag 4, 8 und 10. Die Individuen wurden mit den entsprechenden Simvastatin-Konzentrationen oder 0,2 % DMSO (Kontrolle) auf Agarplatten behandelt. Dargestellt ist die mittlere Anzahl an Q40::YFP Aggregaten aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, $n=3$, $N \geq 38$). Die Aggregation von Q40 stieg altersabhängig in der Kontrolle von Tag 4 (67 ± 1) auf Tag 10 (78 ± 7) an. Durch die Behandlung mit 50 (68 ± 9) und 100 μM Simvastatin (64 ± 5) wurde diese Aggregation im Vergleich zur Kontrolle (78 ± 7) an Tag 10 verzögert. Statistischer Test: Two-Way ANOVA, $*p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (0,2 % DMSO), $\#p \leq 0,05$ vs. Kontrolle Tag 4 (0,2 % DMSO). **(C)** Quantifizierung der Fähigkeit zur Körperbewegung des Reporterstammes Q35::YFP an Tag 4, 8 und 10 der adulten Lebensphase nach Behandlung mit 25, 50 oder 100 μM Simvastatin. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ausschläge pro Sekunde pro Individuum aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, $n=3$, $N \geq 68$). Es kam zu einer altersabhängigen Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung innerhalb der Kontrolle (0,2 % DMSO) von Tag 4 ($1,07 \pm 0,02$) über Tag 8 ($0,32 \pm 0,06$) bis Tag 10

($0,20 \pm 0,10$). Die Behandlung mit 50 (Tag 8: $0,41 \pm 0,03$) oder 100 μM Simvastatin (Tag 8: $0,54 \pm 0,04$, Tag 10: $0,48 \pm 0,06$) verzögerte diese Abnahme im Vergleich zur Kontrolle (Tag 8: $0,32 \pm 0,06$, Tag 10: $0,20 \pm 0,11$). Statistischer Test: Two-Way ANOVA, $*p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (0,2 % DMSO), $\#p \leq 0,05$ vs. Kontrolle Tag 4 (0,2 % DMSO).

Da die altersabhängige Aggregation von Q35 auch die Funktionalität der Muskeln einschränkt, wodurch es zu einer beschleunigten Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung im Vergleich zum Wildtyp kommt, wurde auch der Einfluss von Simvastatin auf diesen Endpunkt untersucht. Auch beim Reporterstamm (Q35::YFP) zeigte sich ein altersbedingter Abfall der Fähigkeit zur Körperbewegung von Tag 4 bis Tag 10, welcher im Vergleich zum Wildtyp deutlicher ausfiel (Abb. 23C vgl. Abb. 21A). Die Behandlung des Reporterstammes mit 50 oder 100 μM Simvastatin konnte diese Abnahme verzögern (Abb. 23C).

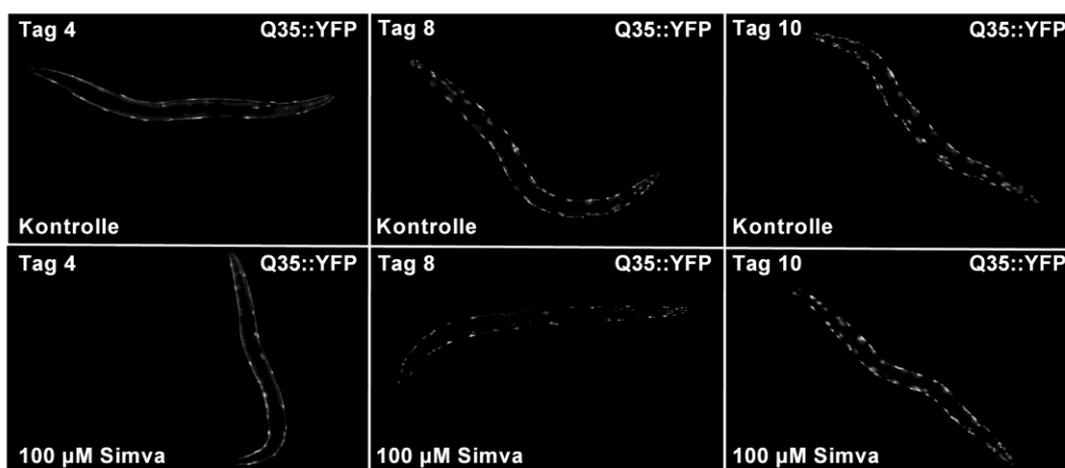


Abbildung 24: Aggregation von Q35::YFP nach Behandlung mit 100 μM Simvastatin. Übersichtsaufnahmen der Aggregation von Q35::YFP an Tag 4, 8 und 10 nach Behandlung des Reporterstammes mit 100 μM Simvastatin. Es war ein altersabhängiger Anstieg der Aggregation innerhalb der Kontrollgruppe erkennbar. An Tag 8 reduzierte die Behandlung mit 100 μM Simvastatin die Aggregation von Q35::YFP.

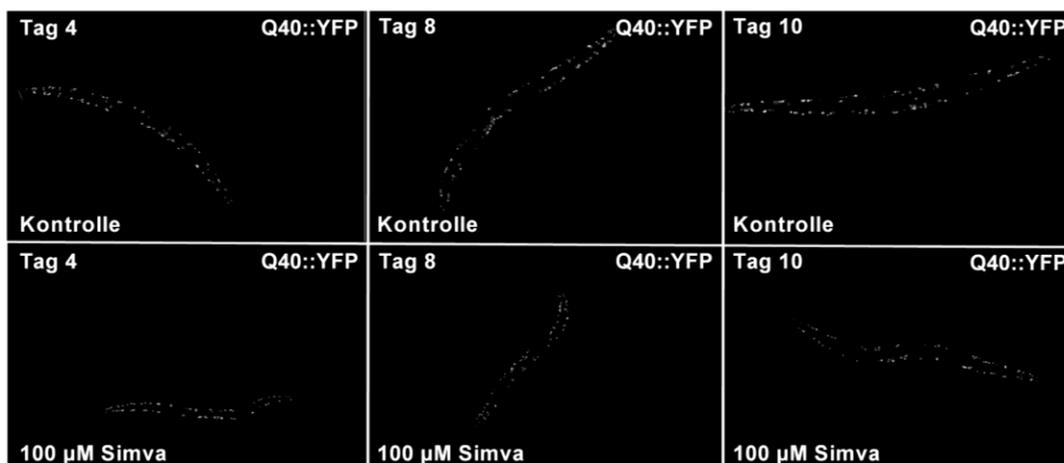


Abbildung 25: Aggregation von Q40::YFP nach Behandlung mit 100 µM Simvastatin.

Übersichtsaufnahmen der Aggregation von Q40::YFP an Tag 4, 8 und 10 nach Behandlung des Reporterstammes mit 100 µM Simvastatin. Es war ein leichter altersabhängiger Anstieg der Aggregation innerhalb der Kontrollgruppe erkennbar. An Tag 10 reduzierte die Behandlung mit 100 µM Simvastatin die Aggregation von Q40::YFP.

Insgesamt zeigte sich somit, dass Simvastatin die altersbedingte Formation von Polyglutamin-Aggregaten in den Muskelzellen verzögern kann, wodurch auch eine mit dem Alter einhergehende Abnahme der Funktionalität der Muskelzellen verzögert wird.

Bei der Polyglutaminerkrankung Chorea Huntington spielt die ungefaltete Proteinantwort (UPR) wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Progression dieser Krankheit (Kalathur *et al.*, 2015). Daher wurde der Einfluss von Simvastatin auf die UPR des endoplasmatischen Retikulums (UPR_{ER}) und auf die UPR des Mitochondriums (UPR_{MT}) untersucht. Hierzu wurden zwei Reporterstämme verwendet, bei welchen hsp-4 (UPR_{ER}) oder hsp-60 (UPR_{MT}) mit einem GFP fusioniert ist. Der Einfluss von Simvastatin wurde nach 24 und 48 Stunden untersucht. Nach keinem der Messzeitpunkte hatten die getesteten Simvastatin-Konzentrationen (25, 50 und 100 µM) einen Einfluss auf die beiden Marker für die UPR (Abb. 26). Als Positivkontrolle für hsp-4::GFP wurden die Tiere für 24 Stunden mit 5 µg/ml Tunicamycin sowie für hsp-60::GFP mit 125 µg/ml Ethidiumbromid behandelt. In beiden Fällen kam es zu einem deutlichen Anstieg der Expression der jeweiligen UPR-Markerproteine (Abb. 26). Diese Befunde deuten darauf hin, dass Simvastatin in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Markerproteine hsp-4 (UPR_{ER}) oder hsp-60 (UPR_{MT}) hat.

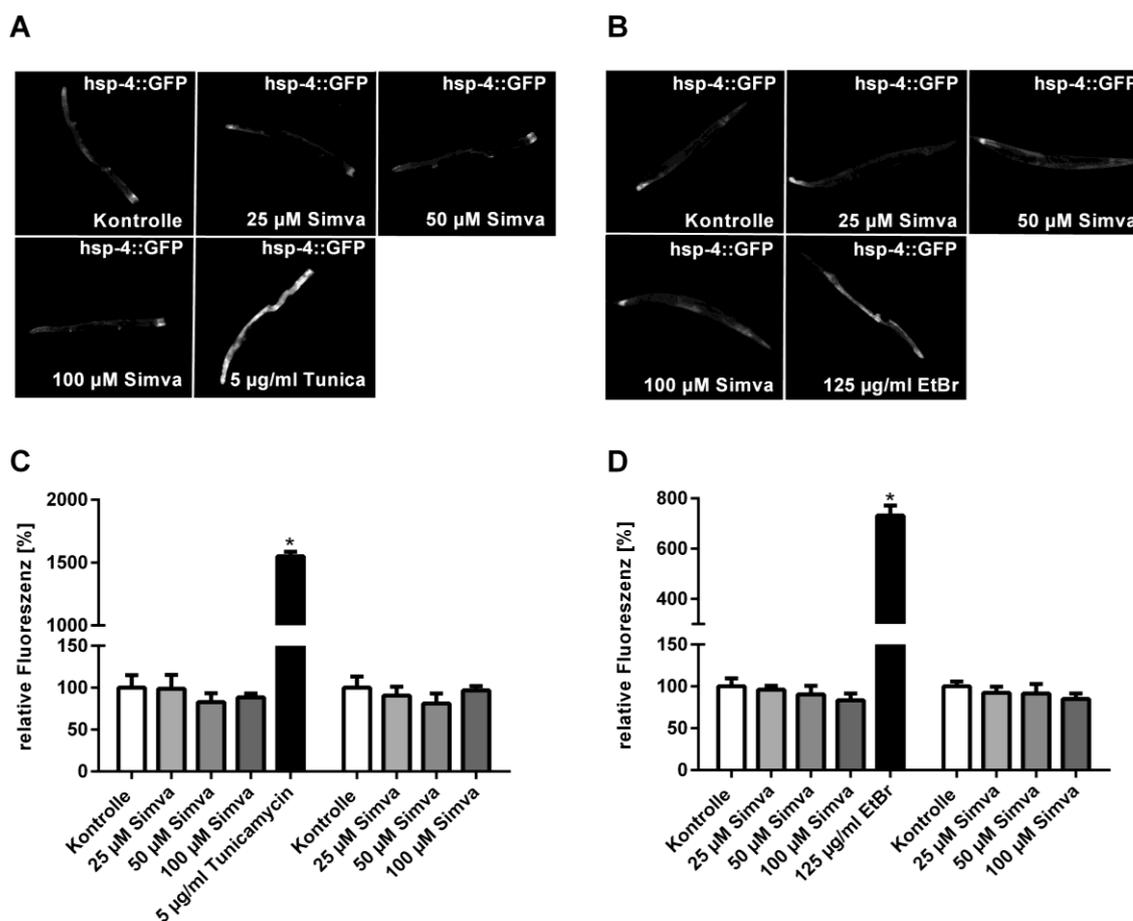


Abbildung 26: Einfluss von Simvastatin auf die Expression von *hsp-4::GFP* und *hsp-60::GFP*.

(A) Übersichtsaufnahmen der Expression von *hsp-4::GFP* nach 24-stündiger Behandlung mit 25, 50 oder 100 μ M Simvastatin. Es war kein Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrolle (0,2 % DMSO) erkennbar. Die Behandlung mit 5 μ g/ml Tunicamycin (Tunica) führte zu einem deutlichen Anstieg der Expression. **(B)** Übersichtsaufnahmen der Expression von *hsp-60::GFP* nach 24-stündiger Behandlung mit 25, 50 oder 100 μ M Simvastatin. Es war kein Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrolle (0,2 % DMSO) erkennbar. Die Behandlung mit 125 μ g/ml Ethidiumbromid (EtBr) führte zu einem deutlichen Anstieg der Expression. **(C)** Quantifizierung der Expression von *hsp-4::GFP* nach 24-stündiger Behandlung mit 25, 50 oder 100 μ M Simvastatin. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität in Bezug zur Kontrolle (100 %, 0,2 % DMSO) (Mittelwert \pm SD, n=3, N \geq 32). Weder nach 24 noch nach 48 Stunden führte eine der Behandlungen mit Simvastatin zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität. Durch die 24-stündige Behandlung mit 5 μ g/ml Tunicamycin stieg die Intensität ca. um das 15-fache an. Statistischer Test: One-Way ANOVA, *p \leq 0,05 vs. Kontrolle (0,2 % DMSO). **(D)** Quantifizierung der Expression von *hsp-60::GFP* nach 24-stündiger Behandlung mit 25, 50 oder 100 μ M Simvastatin. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität in Bezug zur Kontrolle (100 %, 0,2 % DMSO) (Mittelwert \pm SD, n=3, N \geq 30). Weder nach 24 noch nach 48 Stunden führte eine der Behandlungen mit Simvastatin zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität. Durch die 24-stündige Behandlung mit 125 μ g/ml Ethidiumbromid stieg die Intensität ca. um das 7-fache an. Statistischer Test: One-Way ANOVA, *p \leq 0,05 vs. Kontrolle (0,2 % DMSO).

4 Diskussion

4.1 Statine verlängern das Leben in *C. elegans*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Lovastatin oder Simvastatin eine Lebensverlängerung im Cholesterol-auxotrophen Nematoden *C. elegans* bewirkt. Dabei fällt die Lebensverlängerung durch Lovastatin deutlicher aus, als jene durch Simvastatin. Für Fluvastatin wurde ein solcher Effekt nicht beobachtet. Stattdessen führte die Behandlung mit der höchsten hier getesteten Fluvastatin-Konzentration zu einer Verkürzung der Lebensspanne. Auch die Anzahl an überlebenden Nachkommen wurde durch Fluvastatin stärker reduziert als durch Simvastatin. Während der eigenen Masterarbeit^{1(S.37)} wurde zudem der Einfluss von Lovastatin auf die Fertilität untersucht, wobei die Reduktion der Fertilität im Bereich von Simvastatin lag (Jahn *et al.*, 2020). In allen Versuchen wurden äquimolare Konzentrationen der Statine eingesetzt, wobei 100 µM der höchsten Konzentration entsprach. Im Gegensatz zur lebensverlängernden Wirkung von Lova- und Simvastatin hatte die Behandlung mit 100 µM Fluvastatin eine Verkürzung der Lebensspanne zur Folge, was für eine zu starke und bereits adverse Wirkung und somit für eine zu hohe Dosierung spricht. Auf Grundlage der Wirkstärken der Statine im Menschen hätte man einen solchen Unterschied nicht erwartet. Hier ist die tägliche minimale Äquivalenzdosis bezogen auf die Senkung des LDL-Cholesterols für Fluvastatin höher als für Lova- bzw. Simvastatin (Turner *et al.*, 2011). Da höhere Fluvastatin-Konzentrationen in *C. elegans* bereits getestet wurden und zu adversen Effekten führen, wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine zur Patientensituation analoge Dosierung der Statine verzichtet und äquimolare Konzentration der Statine eingesetzt (Mörck *et al.*, 2009, Rauthan *et al.*, 2013, Ranji *et al.*, 2014). Der Grund für den Interspezies-Unterschied innerhalb der Wirkstärke der Statine könnte in den verschiedenen Eigenschaften von Statinen liegen, welche Spezies-spezifische Auswirkungen haben. So sind Lova- und Simvastatin beides *Prodrugs* und lipophiler als Fluvastatin (Schachter, 2005). Zur Klärung, ob diese Eigenschaften dazu führen, dass Fluvastatin in *C. elegans* stärker wirkt als Lova- und Simvastatin, müssten allerdings weitere Analysen (z. B. Messung der Aufnahme der Statine durch die Nematoden mittels HPLC-MS, Messung der Enzymaktivität der HMG-CoA Reduktase, oder Analyse des Mevalonatspiegels) durchgeführt werden. Nichtsdestotrotz könnte Fluvastatin möglicherweise in niedriger eingesetzten Konzentrationen eine Lebensverlängerung in *C. elegans* bewirken. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass mit moderaten Dosierungen von Fluvastatin (20 bzw. 50 µM) die Lebensspanne in *C. elegans* verlängert werden kann (Andreux *et al.*, 2014). In der vorliegenden Arbeit hatte die Behandlung mit 25 oder 50 µM Fluvastatin jedoch keinen

Einfluss auf die Lebensspanne. Allerdings wurden die Individuen in der genannten Studie die gesamte Lebensdauer mit Fluvastatin behandelt und nicht erst ab dem L4-Stadium wie in den hier gezeigten Experimenten. Dieser Unterschied in der Durchführung könnte der Grund für die Diskrepanz der Ergebnisse sein. Mit Fluvastatin-Konzentrationen unterhalb von 20 μM könnte eventuell auch in dem hier verwendeten Versuchsaufbau eine Lebensverlängerung erzielt werden. Diese Hypothese müsste in nachfolgenden Untersuchungen geprüft werden.

Unter Berücksichtigung der hier durchgeführten Analysen mit Lova- und Simvastatin und den Literaturdaten zu Fluvastatin konnte somit für drei verschiedene Statine eine lebensverlängernde Wirkung in *C. elegans* nachgewiesen werden, wodurch man prinzipiell von einem Gruppeneffekt der Statine ausgehen kann. Aufgrund der unterschiedlichen physikochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften von Statinen sind Abweichungen innerhalb des protektiven Dosisbereich und der Stärke des lebensverlängernden Effekts vorstellbar.

Neben *C. elegans* wurde auch in *Drosophila melanogaster*, einem weiteren Cholesterolauxotrophen Modellorganismus, gezeigt, dass eine Behandlung mit Statinen das Leben verlängern kann. In dieser Studie wurden die Individuen mit Simvastatin behandelt (Spindler *et al.*, 2012). Doch auch in Cholesterol-prototrophen Modellorganismen kann sich eine Behandlung mit Statinen unabhängig vom Cholesterol positiv auf die Alterung auswirken. So führt eine Kombinations-Behandlung mit Pravastatin und Zoledronat, einem Bisphosphonat, zu einer Verzögerung der beschleunigten Alterung in einem Mausmodell für Progerie. Durch die genannte Kombinations-Behandlung wird unter anderem die Farnesylierung und Prenylierung von Prelamin A und dem pathologisch verkürzten Prelamin A (Progerin) gehemmt, wodurch der beschleunigte Altersprozess der ZMPSTE24 (CAAX-Prenylprotease) defizienten Mäuse verlangsamt wird (Varela *et al.*, 2008). Progerin wird mit zunehmendem Alter auch während der physiologischen Alterung gebildet (Scaffidi & Misteli, 2008). Daher könnten diese Erkenntnisse auch unabhängig von einer beschleunigten Alterung, d. h. für physiologische Alterungsprozesse, interessant sein. Die Metastudie von Jacobs *et al.* (2013), zeigt zudem, dass sich die Einnahme von Statinen, Cholesterol-unabhängig, positiv auf die Lebenserwartung in alten Menschen auswirkt. Zu diesen Cholesterol-unabhängigen Wirkungen gehören unter anderem die Verbesserung der Endothelfunktion, die Abschwächung des Gefäß- und Myokardumbaus, die Hemmung der Gefäßentzündung und -oxidation sowie die Stabilisierung von atherosklerotischen Plaques (Liao & Laufs, 2005, Zhou & Liao, 2010).

Zusammenfassend bedeutet das, dass Statine in Cholesterol-auxotrophen oder Cholesterol-prototrophen Organismen sowie im Menschen einen Cholesterol-unabhängigen und positiven Einfluss auf Alterungsprozesse haben können.

4.2 Statine verzögern die physiologische Alterung in *C. elegans*

Abgesehen von der Verlängerung der Lebenszeit wurde in dieser Arbeit auch das physiologische Alter der Nematoden, zu bestimmten Zeitpunkten, mit Hilfe von ausgewählten Biomarkern untersucht. Für Lovastatin wurde dazu die Akkumulation des Alterspigments und für Simvastatin die Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung gemessen. Die Akkumulation des Alterspigments wurde dabei indirekt über die Autofluoreszenz dieses Pigments gemessen. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Akkumulation des Alterspigments bzw. die Fluoreszenzintensität altersabhängig im Darm der Individuen ansteigt. Dieser Anstieg wurde durch die Behandlung mit Lovastatin verzögert. Das bedeutet, dass die behandelten Tiere zum Messzeitpunkt physiologisch jünger waren als die Tiere der nicht Statin-behandelten Kontrollpopulation. Für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der hier gezeigten Experimente wurde ein Extinktionsfilter für den Bereich 360-370 nm und ein Emissionsfilter für den Bereich 420-460 nm gewählt. Damit stimmte das gewählte Filterset mit den aus der Literatur bekannten Extinktions- und Emissionswerten des Alterspigments überein (Braeckman *et al.*, 2002). Gemessen werden können entweder wässrige Homogenate gepoolter Nematoden oder die Fluoreszenz wird direkt *in vivo* im Darm bestimmt (Collins *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzintensität des Alterspigments im Darm der lebenden Tiere ausgewertet. Der Vorteil dieser Methode ist, dass, im Gegensatz zu einer Extraktion, Veränderungen im pH-Wert, welche das Signal beeinflussen können, keine Rolle spielen (Gerstbrein *et al.*, 2005). Zusätzlich kann durch die *in vivo* Messung die Fluoreszenz pro Tier bestimmt werden. Da in dieser Arbeit keine genaue Untersuchung der Pigmente (z. B. mittels NMR-Spektroskopie oder HPLC-MS) erfolgte, kann über die biochemische Zusammensetzung des gemessenen fluoreszierenden Materials keine detaillierte Aussage getroffen werden. Trotz der allgemeinen Unklarheit über den Ursprung der Fluoreszenz wird die Akkumulation des Alterspigments weiterhin von der Forschungsgemeinschaft als Biomarker zur Erfassung von altersabhängigen Veränderungen empfohlen (Collins *et al.*, 2008, Son *et al.*, 2019). Wie bereits erwähnt, konnte auch in der vorliegenden Arbeit ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität mit dem Alter festgestellt werden. Zudem wurde bereits gezeigt, dass bei langlebigen Mutanten das Alterspigment langsamer akkumuliert (Garigan *et al.*, 2002, Gerstbrein *et al.*, 2005). Insgesamt ist die Untersuchung der Akkumulation des Alterspigments daher

geeignet, um generelle Unterschiede im physiologischen Alter zweier Populationen festzustellen. Die Annahme, dass die mit Lovastatin behandelten Tiere aufgrund der verringerten Akkumulation des Alterspigment physiologisch jünger sind, ist also durchaus berechtigt. Rückschlüsse auf mögliche molekulare Mechanismen, welche der Statinwirkung zu Grunde liegen, können aufgrund der Unklarheiten bzgl. der Zusammensetzung der Pigmente jedoch nicht getroffen werden.

Ein weiterer hier verwendeter Biomarker für das physiologische Alter ist die Abnahme der Fähigkeit zur Körperbewegung. Dabei kann entweder die Anzahl der Ausschläge der Nematoden gezählt werden oder die provozierten Bewegungen werden einem zuvor definierten Bewertungsschema (z. B. Typ I: vollständige Beweglichkeit, Typ II: eingeschränkte Beweglichkeit, Typ III: wenig bis keine Beweglichkeit) zugeordnet (Collins *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurde die altersabhängige Abnahme anhand der Anzahl der Ausschläge in Flüssigmedium mit Hilfe eines ImageJ Makros automatisch bestimmt, da die visuelle Bewertung einer Bewegung oftmals subjektiv ist. Diese Art der Bestimmung der Körperbewegung wurde zuvor auch schon in anderen Studien als Biomarker für die Alterung verwendet (Mulcahy *et al.*, 2013, Cooper *et al.*, 2015, Smolentseva *et al.*, 2017). Des Weiteren ist die Abnahme der Körperbewegung, analog zur Akkumulation des Alterspigments, bei langlebigen Mutanten verzögert (Huang *et al.*, 2004). Bei dem hier gezeigten Experiment mit Lovastatin konnte weder bei den behandelten noch bei den unbehandelten Nematoden eine altersabhängige Abnahme der Ausschläge festgestellt werden. Es ist anzunehmen, dass die Inkubation im Flüssigmedium das Muskelwachstum stimuliert (Harada *et al.*, 2016). Dadurch könnte das Muskelwachstum der altersabhängigen Abnahme der Bewegung entgegenwirken und diese stark verzögern, wodurch altersabhängige Unterschiede in dem gemessenen Zeitraum nicht mehr sichtbar wären. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von Lovastatin konnte diese Versuchsreihe nicht auf Festmedium wiederholt werden (Patel *et al.*, 2008). Auf Festmedium zeigt sich die erwartete altersabhängige Abnahme der Ausschläge innerhalb der Kontrollpopulation. Hierbei konnte die Behandlung mit dem besser wasserlöslichen Simvastatin diese Abnahme verzögern. Dieser Befund spricht dafür, dass die mit Simvastatin behandelten Tiere an den verschiedenen Messzeitpunkten physiologisch jünger als die Individuen der Kontrollpopulation waren.

Insgesamt wurde somit sowohl für Simvastatin als auch für Lovastatin gezeigt, dass eine Behandlung mit Statinen die physiologische Alterung in *C. elegans* verzögern kann.

4.3 Simvastatin verzögert eine altersabhängige PolyQ-Aggregation in *C. elegans*

Neben den beiden physiologischen Biomarkern wurde zusätzlich der Einfluss von Simvastatin auf eine pathologische und altersabhängige Proteinaggregation untersucht. Hierzu wurde ein Reporterstamm (Q35::YFP) verwendet, bei welchem im Verlauf der Alterung vermehrt PolyQ-Aggregate in den Muskelzellen gebildet werden, wodurch auch die Abnahme der Beweglichkeit im Vergleich zum Wildtyp beschleunigt wird (Morley *et al.*, 2002). Durch die Behandlung mit Simvastatin konnte die Anzahl der Aggregate am mittleren Messtag (Tag 8) im Vergleich zur Kontrolle reduziert werden. Am letzten Messtag (Tag 10) war zwischen Behandlung und Kontrolle dagegen kein Unterschied in der Anzahl der Aggregate mehr erkennbar. Dies lag daran, dass die Anzahl der Aggregate innerhalb der Kontrolle vom mittleren bis zum letzten Messtag nicht mehr zunahm und an beiden Tagen bei ca. 60 Aggregaten pro Individuum lag. Auch in der Originalliteratur zu diesem Reporterstamm liegt die Anzahl der Aggregate an beiden Tagen bei ca. 60 Aggregaten, weshalb man davon ausgehen kann, dass dies dem typischen Verlauf der Zunahme der Aggregate dieses Reporterstammes entspricht (Morley *et al.*, 2002). Obwohl es an Tag 10 keinen Unterschied mehr in der Anzahl der Aggregate zwischen der Kontrolle und der Simvastatin-Behandlung gab, konnte auf funktioneller Ebene in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die PolyQ-Aggregations-bedingte beschleunigte Abnahme der Beweglichkeit dieses Reporterstammes neben dem mittleren auch am letzten Messtag durch Simvastatin verzögert wurde. Dies legt die Vermutung nahe, dass Simvastatin auch am letzten Messtag eine Verzögerung der Aggregation bewirkt, welche aber optisch nicht mehr auflösbar ist. Die präventive Wirkung von Simvastatin bzgl. der Entstehung von PolyQ-Aggregaten wurde außerdem bei Verwendung eines weiteren Reporterstammes (Q40::YFP) deutlich. Bei diesem Stamm sind laut Literatur seit Beginn der adulten Lebensphase die meisten PolyQ-Proteine komplett aggregiert. Dadurch kommt es nur zu einem leichten weiteren altersabhängigen Anstieg in der Anzahl der Aggregate (Morley *et al.*, 2002). Dieser Anstieg mit dem Alter konnte, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, wiederum durch die Behandlung mit Simvastatin reduziert werden. Dadurch konnte mit zwei Reporterstämmen für PolyQ-Proteine, welche jeweils unterschiedlich anfällig für ein Aggregationsereignis sind, gezeigt werden, dass Simvastatin die Entstehung von PolyQ-Aggregaten verhindern kann. Bei Patienten mit Chorea Huntington weist das Huntingtin-Protein eine abnormal hohe Anzahl an Glutamin-Wiederholung auf, wodurch es mit dem Alter anfälliger für Aggregationen wird. Dabei bestehen die PolyQ-Einheiten bei einem gesunden Menschen aus 2 bis 34 Glutamin-Wiederholungen (Orr & Zoghbi, 2007). Die *non-sense* Proteine der beiden

Reporterstämme bestehen einmal aus 35 und einmal aus 40 Glutamin Wiederholungen (Morley *et al.*, 2002). Damit liegt die Anzahl an Wiederholungen in beiden Fällen knapp über dem Grenzwert für einen gesunden Menschen, wobei man erst ab 36 Glutamin Wiederholungen innerhalb des Huntingtin-Proteins von einer pathologischen Anzahl an Wiederholungen spricht (Orr & Zoghbi, 2007). Ab 55 Wiederholungen spricht man zudem von der juvenilen Huntington Krankheit, welche eine schwerere Form der Krankheit darstellt (Jacquet *et al.*, 2015). Das bedeutet, dass die Anfälligkeit zur Aggregation zumindest im zweiten *C. elegans* Reporterstamm (Q40::YFP) vergleichbar ist mit der Situation in Patienten mit Chorea Huntington. Da der Reporter zur besseren Sichtbarkeit in den Körperwand Muskelzellen von *C. elegans* exprimiert wird, kann allerdings keine Aussage über eine mögliche neuroprotektive Wirkung von Simvastatin getroffen werden. In Ratten und im Menschen konnte die neuroprotektive Wirkung von Statinen bei Chorea Huntington allerdings schon gezeigt werden (Kumar *et al.*, 2013, Schultz *et al.*, 2019). In *in vitro* Modellen für Parkinson konnte zudem nachgewiesen werden, dass Statine die Aggregation von α -Synuclein reduzieren (Bar-On *et al.*, 2008). Meistens werden diese neuroprotektiven Wirkungen auf die Cholesterolsenkende Wirkung von Statinen zurückgeführt. Es werden jedoch auch Cholesterolumabhängige Effekte, wie die anti-inflammatorische Wirkung von Statinen, in Betracht gezogen zur Neuroprotektion beizutragen (Chu *et al.*, 2018).

Ob Statine bei Proteinfehlfaltungserkrankung Cholesterolumabhängig die Aggregation der verursachenden Proteine verzögern können, muss folglich noch genauer untersucht werden. Allerdings konnte in dieser Arbeit *in vivo* gezeigt werden, dass Simvastatin, Cholesterolumabhängig, die pathologische PolyQ-Aggregation altersabhängig reduzieren kann. Demnach ist zu vermuten, dass Statine zumindest bei Chorea Huntington die PolyQ-Aggregation, Cholesterolumabhängig, verzögern könnten. Zusätzlich kann angenommen werden, dass die in dieser Arbeit gezeigte erhöhte thermale Stressresistenz nach Simvastatin-Behandlung ein weiterer indirekter Hinweis auf eine allgemeine Protektion gegenüber Proteinfehlfaltung und letztendlich Proteinaggregation ist.

Doch nicht nur die Aggregation der krankheitsverursachenden Proteine allein ist zytotoxisch. So inhibiert das aggregierte Huntingtin zum Beispiel die Endoplasmatische Retikulum (ER) -assoziierte Proteindegradation (ERAD). Dadurch kommt es zu ER-Stress und folglich zur Aktivierung der ungefalteten Protein-Antwort (Unfolded Protein Response, UPR_{ER}) (Duennwald & Lindquist, 2008). Diese Aktivierung führt zu einer Abschwächung der Proteintranslation, einer Aktivierung der proteasomalen

Proteindegradation und einer Expression verschiedener Chaperone, wodurch der Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen und dem ER-Stress entgegenwirkt wird. Chronischer ER-Stress bzw. eine chronisch aktivierte UPR_{ER} kann allerdings auch zur Caspase Aktivierung und letztendlich zum neuronalen Zelltod führen (Kalathur *et al.*, 2012). Daher werden sowohl eine Aktivierung als auch eine Hemmung der UPR_{ER} als mögliche therapeutische Maßnahme bei Chorea Huntington diskutiert (Shacham *et al.*, 2019). Somit hätte eine aktivierende ebenso wie eine hemmende Wirkung von Simvastatin auf die UPR_{ER} ein therapeutisches Potential. HSP-4 ist homolog zum menschlichen BIP/HSPA5 und im Menschen als auch in *C. elegans* ein Marker für die UPR_{ER} (Shen *et al.*, 2001). Simvastatin hatte keinen Einfluss auf die Expression von HSP-4, wie hier mit Hilfe eines Reporterstammes (HSP-4::GFP) gezeigt werden konnte. In *C. elegans* konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass hochdosiertes Fluvastatin die UPR_{ER} aktivieren kann. Auch der *Knockdown* der HMG-CoA-Reduktase führt in *C. elegans* zu einer Aktivierung der UPR_{ER} (Mörck *et al.*, 2009, Ranji *et al.*, 2014). Natürlich ist eine durch eine sehr starke Hemmung der HMG-CoA Reduktase aktivierte UPR_{ER} therapeutisch betrachtet nicht hilfreich, da diese wahrscheinlich selbst aus einem erhöhten ER-Stress resultiert. Dennoch wäre es möglich, dass die hier eingesetzten protektiven Simvastatin-Konzentrationen durch Induktion von hormetischem Stress zu einer leichten Aktivierung der UPR_{ER} führen könnten, welche mit dem eingesetzten Reporterstamm nicht detektierbar ist. Zusätzlich wurde der Einfluss von Simvastatin auf die UPR_{MT} mit Hilfe eines Reporterstammes (HSP-60::GFP) untersucht. Auch hier zeigte sich kein Statin-Effekt. Im Gegensatz zur UPR_{ER} konnte für die UPR_{MT} in *C. elegans* nachgewiesen werden, dass hochdosiertes Fluvastatin durch die Inhibition der Proteinprenylierung diesen Prozess der Stressantwort hemmt und sich so negativ auf die mitochondriale Proteinhomöostase und Funktion auswirkt (Rauthan *et al.*, 2013, Oks *et al.*, 2018).

4.4 Die Statin-bedingte Lebensverlängerung in *C. elegans* beruht auf einer Mevalonat-Depletion

Kalorische Restriktion ist eine der effektivsten Interventionen, um die Lebensspanne in *C. elegans* zu verlängern (Houthoofd *et al.*, 2005, Piper & Bartke, 2008). Somit besteht die Möglichkeit, dass eine Substanz-abhängige Verlängerung der Lebensdauer durch eine Einschränkung der Nahrungsaufnahme vermittelt wird (Buchter *et al.*, 2013). Eine repulsive Wirkung von Lovastatin, welche zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme von *C. elegans* führen würde, konnte aber als Grund für die Resultate der Analysen in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, da Lovastatin einen neutralen chemotaktischen Index aufweist. Zusätzlich bewirkte die Behandlung mit Lovastatin eine spezifische mRNA Expression verschiedener CYPs. Aus diesem Grund kann davon

ausgegangen werden, dass die Substanz vom Tier aufgenommen und verstoffwechselt wird. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die pharyngeale Pumprate weder durch eine Vorbehandlung mit Lovastatin noch durch die Anwesenheit von Lovastatin während der Messung beeinflusst wurde. Dies spricht dafür, dass die Nahrungsaufnahme der behandelten Tiere nicht reduziert wurde. Einhergehend damit wurde bereits gezeigt, dass hochdosiertes Fluvastatin keinen Einfluss auf den Körperfettanteil in *C. elegans* hat (Mörck *et al.*, 2009). Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine postreproduktive Behandlung mit Lovastatin eine Lebensverlängerung bewirkte. Da die Pumprate bzw. die Nahrungsaufnahme in dieser Lebensphase sehr eingeschränkt ist, hätte eine induzierte kalorische Restriktion folglich kaum Einfluss auf die Lebensspanne (Zullo *et al.*, 2019). Zusammengenommen erlauben diese Erkenntnisse die Schlussfolgerung, dass die durch Lovastatin vermittelte Lebensverlängerung nicht durch eine reduzierte Nahrungsaufnahme bewirkt wurde.

Die Wirkung von Statinen im Menschen beruht auf der Inhibition der HMG-CoA-Reduktase (Tobert *et al.*, 1982). Um zu ermitteln, ob die hier beobachtete physiologische Verjüngung und die Lebensverlängerung von *C. elegans* durch die Behandlung mit Simva- oder Lovastatin ebenfalls auf der Inhibition der HMG-CoA-Reduktase, bzw. auf der Mevalonat-Depletion beruhen, wurden verschiedene Supplementationsexperimente mit Mevalonat durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die Lebensverlängerung als auch die reduzierte Akkumulation des Alterspigments durch die Lovastatin-Behandlung von der Mevalonat-Depletion abhängig waren. Dies traf ebenso für die durch Simvastatin-vermittelte verzögerte Abnahme der Körperbewegung zu. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass auch die Lebensverlängerung durch Simvastatin auf der Inhibition der HMG-CoA-Reduktase beruht. Abgesehen von dieser Arbeit wurde in *C. elegans* bisher nur einmal eine Statin (Fluvastatin) -vermittelte Verlängerung der Lebensspanne beschrieben (Andreux *et al.*, 2014). Auch in dieser Studie wurde der Effekt auf die Inhibition der HMG-CoA Reduktase zurückgeführt, aber ohne eine genaue Untersuchung der Ursache der Lebensverlängerung (Andreux *et al.*, 2014). Ansonsten wurde in *C. elegans* bisher nur mit hochdosiertem Fluvastatin gearbeitet, um adverse Wirkungen von Statinen zu untersuchen. Allerdings lassen sich diese Effekte, wie Sterilität, Entwicklungsarrest, Inhibition der Protein Prenylierung oder Aktivierung der UPR_{ER} allesamt mit der zusätzlichen Gabe von Mevalonat wieder umkehren (Mörck *et al.*, 2009). Besonders die komplette Umkehr des Statin-Effekts auf die Fertilität oder die Entwicklung, welches beides Endpunkte zur Untersuchung von genereller Toxizität sind, lassen vermuten, dass mögliche Off-Target Effekte von Statinen in *C. elegans* eine

untergeordnete Rolle spielen. Im Menschen konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass Statin-Laktone, welche die inaktive Form in Bezug auf eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase darstellen, als Inhibitoren des mitochondrialen Komplex III wirken können. Dabei kann die aktive Hydroxysäure-Form der Statine durch Uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferasen (UGTs) in die Lakton-Form umgewandelt werden (Schirris *et al.*, 2015). Die hier verwendeten Statine Simva- und Lovastatin sind beide Prodrugs, d.h. sie werden als inaktives Statin-Lakton verabreicht und müssen erst noch bioaktiviert werden. Für die Bioaktivierung sind Carboxylesterasen verantwortlich, von denen es in *C. elegans* 49 gibt (Oakeshott *et al.*, 1999). Zusätzlich können Statin-Laktone im Medium durch spontane Hydrolyse in ihre aktive Form überführt werden (Taha *et al.*, 2016). Natürlich besitzt *C. elegans* auch UGTs, daher ist eine erneute Umwandlung in die Lakton-Form möglich (Hasegawa *et al.*, 2010). Ob die hier gezeigten Effekte mitunter von einer Hemmung des mitochondrialen Komplex III abhängen, kann daher nicht völlig ausgeschlossen werden. Allerdings sind, wie bereits erwähnt, sowohl die Lebensverlängerung als auch die physiologische Verjüngung zumindest für Lovastatin vollständig Mevalonat-abhängig. Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine mögliche Hemmung des mitochondrialen Komplex III durch Statin-Laktone als Ursache der Resultate unserer Untersuchungen eher zu vernachlässigen ist.

Neben den Supplementationsexperimenten mit Mevalonat wurde zusätzlich überprüft, ob sich eine Protektion durch moderate Statin-Konzentrationen durch eine genetische Inhibition der HMG-CoA-Reduktase mittels RNAi imitieren lässt. Der *Knockdown* der HMG-CoA-Reduktase führte hierbei zu einer abnormalen Verteilung des fluoreszierenden Alterspigments im Nematoden. Diese Verteilung entsprach nicht der physiologischen Distribution der Pigmente, welche sich üblicherweise auf den Darm beschränkt. Es ist daher offensichtlich, dass ein solch starker *Knockdown* nicht vergleichbar mit einer moderaten Hemmung der HMG-CoA-Reduktase durch Statine ist, welche zu einer Reduktion der Akkumulation des Alterspigments führt. Einhergehend damit konnte bereits in einer anderen Studie gezeigt werden, dass der *Knockdown* der HMG-CoA-Reduktase zu einer Reihe von adversen Effekten (z. B. Sterilität und Entwicklungsarrest) führt, welche vergleichbar mit den Auswirkungen einer hochdosierten Statin-Behandlung sind (Mörck *et al.*, 2009). Daher wurden in den weiteren Experimenten dieser Arbeit die dsRNA-produzierenden Bakterien weiter verdünnt, um eine Stärke der Inhibition zu erreichen, welche der der protektiven Statin-Konzentrationen entspricht. Dass die RNAi-Wirkstärke auf diesem Wege in *C. elegans* titrierbar ist, wurde zuvor schon in anderen Studien gezeigt (Kamath *et al.*, 2001, Tischler *et al.*, 2006). Auch das hier gemessene mRNA-Level von *hmgr-1* nach 24-stündiger

Inkubation der Nematoden auf verschiedenen *E. coli*-Verdünnungen bestätigt dies. Mit Hilfe dieser Verdünnungen konnte eine physiologische Verjüngung vermittelt werden, indem die Akkumulation des Alterspigments in ähnlicher Weise wie durch eine Statin-Behandlung reduziert wurde. Dabei bewirkten gleich mehrere Verdünnungen (1:8, 1:16, 1:24 und 1:32) den gewünschten Effekt. Eine lebenslange Behandlung mit zwei dieser Verdünnungen (1:8 und 1:32) führte allerdings entgegen der Erwartungen zu einer verkürzten Lebensspanne. Eine mögliche Erklärung für dieses unerwartete Resultat könnte die durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP, engl. *RNA dependent RNA polymerase*) bedingte positive Rückkopplung und die damit verbundene Selbstverstärkung der RNAi in *C. elegans* sein. In Säugetieren scheint die RdRP keine Rolle bei der dsRNA vermittelten mRNA Degradation zu spielen (Stein *et al.*, 2003, Pinzon *et al.*, 2019). Hier bindet der *RNA-induced silencing complex* (RISC) -Komplex eine siRNA, welche RISC zur komplementären Ziel-mRNA leitet. Die Ziel-mRNA wird dann vom RISC-Komplex gebunden und degradiert. In *C. elegans* kann der RISC-Komplex zusätzlich die RdRP rekrutieren, welche die Ziel-mRNA als Template nutzt, um eine neue dsRNA zu amplifizieren. Diese dsRNA dient dann wiederum als Substrat für DICER (engl. *to dice*) und es entstehen sogenannte sekundäre siRNAs (Holoch & Moazed, 2015). Dadurch verliert die exogene Regulation der dsRNA, d.h. die Verdünnung der Bakterien mit zunehmender Behandlungsdauer, an Bedeutung. Passend dazu konnte gezeigt werden, dass sekundäre siRNAs fast hundertfach häufiger sind als ihre verwandten primären siRNAs. Damit sind sekundäre siRNAs die treibende Kraft für den *Knockdown* eines Gens (Feng & Guang, 2013). Demnach könnten die Verdünnungen, welche mittelfristig eine Protektion vermitteln konnten, innerhalb einer lebenslangen Behandlung aufgrund der zeitabhängigen Selbstverstärkung ab einem bestimmten Zeitpunkt einen zu starken *Knockdown* der HMG-CoA-Reduktase bewirken und dadurch die Lebensspanne verkürzen. Dass eine starke Mevalonat-Depletion eine enorme Auswirkung auf die Sterblichkeit in *C. elegans* hat, zeigen Versuche mit einer homozygoten *hmgr-1* Mutante. Die homozygote Mutante ist ohne Mevalonatsupplementation nicht lebensfähig. Eine auf Mevalonat aufgezogene L4 Larven Population dieser Mutante stirbt fast vollständig innerhalb eines Tages, von Tag 3 auf Tag 4 (Ranji *et al.*, 2014). Auch bei den hier getesteten Verdünnungen starb ein großer Teil der Population innerhalb eines Tages (Tag 14/Tag 15). Dies lässt vermuten, dass es auch hier zu einer kritischen Unterschreitung des Mevalonat-Levels gekommen ist. Die Selbstverstärkung der RNAi in *C. elegans* könnte also erklären, warum die Reduktion des Alterspigments in diesem Fall nicht prädiktiv für eine Lebensverlängerung ist. Weiterhin deuten die Befunde darauf hin, dass stärkere Verdünnungen als 1:32 eine Verlängerung der Lebensspanne bewirken könnten.

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der *anti-aging* Statin-Effekt teilweise durch eine genetische Inhibition der HMG-CoA-Reduktase imitierbar ist und bzgl. der Lebensverlängerung und Verjüngung durch eine Mevalonat-Supplementation vollständig revertierbar ist. Dass die Statin-Wirkung auf der kompetitiven Hemmung der HMG-CoA-Reduktase beruht, ist also sehr wahrscheinlich.

4.5 Zusammenhang zwischen den Mevalonat-abhängigen Prozessen und der Statin-bedingten Lebensverlängerung

Um zu überprüfen, welcher der Mevalonat-abhängigen Prozesse zur Statin-bedingten Lebensverlängerung beiträgt, wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedlichen Ansätzen gewählt. Zum einen wurden die an den Mevalonat-abhängigen Vorgängen beteiligten Enzyme jeweils mit Hilfe von RNAi herunterreguliert und die Akkumulation des Alterspigments gemessen. Zum anderen wurden Individuen mit Simvastatin und Vorstufen von Mevalonat-abhängigen Prozessen behandelt und der Einfluss auf die Abnahme der Körperbewegung untersucht. In beiden Fällen konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Protektion durch Statine und einem der Mevalonat-abhängigen Vorgänge festgestellt werden. Natürlich wäre es möglich, dass die Inhibition aller Prozesse die Lebensverlängerung durch Statine vermittelt. In diesem Fall hätte aber zumindest der *Knockdown* der FPP-Synthase (*fdps-1*) oder die zusätzliche Supplementation von FPP bei gleichzeitiger Statin-Gabe einen Einfluss auf den jeweilig untersuchten Altersmarker haben müssen. Grund hierfür ist, dass FPP als Substrat für die Farnesylierung und als Vorstufe für die Synthese von Dolicholphosphat, Ubichinon oder GGPP dient (Dhar *et al.*, 2013). Lediglich die Isopentenylierung von Adenosin ist nicht FPP-, aber Mevalonat-abhängig. Die Isopentenylierung von Adenosin ist eine wichtige post-transkriptionelle Modifikation von sec-tRNAs, welche für die Synthese von Selenoproteinen benötigt werden (Moosmann & Behl, 2004). In *C. elegans* ist bisher aber nur ein Selenoprotein bekannt (Taskov *et al.*, 2005). Zudem konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass ein *Knockout* dieses Selenoproteins, Thioredoxin Reduktase 2 (*trxr-2*), keinen Einfluss auf die Lebensspanne in *C. elegans* hat (Cacho-Valadez *et al.*, 2012). Darüber hinaus hatte auch der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte *Knockdown* der tRNA Isopentenyltransferase (*gro-1*) keinen Einfluss auf die Akkumulation des Alterspigments. Demnach ist es unwahrscheinlich, dass die Statin-vermittelte Protektion auf einer verminderten Synthese der Thioredoxin Reduktase 2 beruht. Es ist wahrscheinlicher, dass es vor allem bei den Supplementationanalysen mit FPP zu experimentellen Schwierigkeiten gekommen ist. Die verwendete Konzentration von 25 µM wurde anhand von Literaturdaten ausgewählt. In der dazu herangezogenen Studie wurde eine ähnliche Konzentration verwendet, um den Phänotyp eines *Knockdowns* der HMG-CoA-Reduktase mittels RNAi in *C. elegans* zu

retten (Mörck *et al.*, 2009). Daher wurde angenommen, dass diese Konzentration auch ausreichend ist, um den hier gezeigten Statin-Effekt umzukehren. Dies ist jedoch nicht der Fall. Eine mögliche Erklärung wäre beispielsweise, dass in der genannten Studie die dsRNA-produzierenden Bakterien den Effekt in *C. elegans* bewirken, aber selbst nicht beeinflusst werden. In dem hier gezeigten Experiment wird dagegen die HMG-CoA-Reduktase in *C. elegans* und in den Bakterien durch die Statin-Behandlung gehemmt. Dadurch wurde das dazugegebene FPP auch von den Bakterien verbraucht. Demnach könnte die gewählte Konzentration in unserem Ansatz zu gering gewesen sein. Die Konzentrationen von GGPP oder Ubichinon wurden ebenso auf Grundlage der genannten Studie ausgewählt. Ob auch hier die Konzentration zu niedrig war oder der zu untersuchende Prozess keinen Einfluss auf die Statin-vermittelte Lebensverlängerung hatte, lässt sich nicht abschließend beurteilen. Auch der *Knockdown* der FPP-Synthase (*fdps-1*) hatte wider Erwarten keine Auswirkung auf die Akkumulation des Alterspigments. Im Gegensatz zum *Knockdown* der HMG-CoA-Reduktase war hier keine abnormale Verteilung des Alterspigments erkennbar. Diese wäre zu erwarten gewesen, da der *Knockdown* der Rab Geranylgeranyltransferase Typ 2 Untereinheit alpha (M57.2) eine ähnliche Verteilung wie der *Knockdown* der HMG-CoA-Reduktase bewirkte, womit dieser Phänotyp FPP abhängig ist. Da die hier gemessenen *Knockdown*-Effizienzen der HMG-CoA-Reduktase und der FPP-Synthase vergleichbar waren, spricht diese Beobachtung dafür, dass der *Knockdown* der FPP-Synthase einen schwächeren Einfluss auf die Verteilung des Alterspigments hat. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass die Umwandlung zu Mevalonat bekanntermaßen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Mevalonatweges ist (Goldstein & Brown, 1990). Demnach ist vorstellbar, dass immer noch ausreichend FPP für eine wildtypische Verteilung und Akkumulation des Alterspigments vorhanden ist, aber zu wenig für eine Reduktion der Akkumulation des Alterspigments. Ähnlich wie beim *Knockdown* der HMG-CoA-Reduktase wäre daher vorstellbar, dass auch hier eine Verdünnung der dsRNA-produzierenden Bakterien eine Reduktion der Akkumulation des Alterspigments bewirkt. Insgesamt scheint bei den RNAi-Versuchen, wie bereits im vorherigen Kapitel erläutert, die Stärke des *Knockdowns* ein Problem gewesen zu sein. Zusätzlich wird bei diesem Ansatz nur ein beteiligtes Enzym des zu untersuchenden Prozesses herunterreguliert, wobei eine Statin Behandlung durch die Depletion der Vorstufen den ganzen Prozess hemmt. Weiterhin ist es möglich, dass der Ausfall eines Enzyms durch andere Enzyme kompensiert wird.

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass die verringerte Abundanz eines Enzyms eines Mevalonat-abhängigen Prozesses nicht zwangsläufig einen hemmenden Einfluss auf

den gesamten Prozess haben muss. Dennoch konnten bereits über den einzelnen *Knockdown* dieser Enzyme Auswirkungen der Inhibition der HMG-CoA-Reduktase bestimmten Vorgängen zugeordnet werden (Mörck *et al.*, 2009). Der Versuch, diese Methode auch zur Klärung der Ursache der Statin-vermittelten Protektion zu verwenden, ist also durchaus berechtigt.

Die zuvor in der Literatur beschriebene Statin-bedingte Lebensverlängerung von *C. elegans* wird auf die dort beobachtete und für vorteilhaft befundene Reduktion der mitochondrialen Atmung zurückgeführt (Andreux *et al.*, 2014). Als mögliche Ursache für diese Reduktion wird die Hemmung der Ubichinon-Synthese genannt (Andreux *et al.*, 2014). Allerdings konnte schon gezeigt werden, dass Ubichinon über die Nahrung (*E. coli*) von *C. elegans* aufgenommen werden kann (Jonassen *et al.*, 2001, Hihi *et al.*, 2002). Zusätzlich sind bereits geringe endogene Mengen von Ubichinon ausreichend für einen wildtypischen Phänotyp auch ohne Bakterien als Ubichinon-Quelle (Branicky *et al.*, 2006). Daher ist es unwahrscheinlich, dass eine Hemmung der Ubichinon-Synthese die Lebensverlängerung durch Statine in *C. elegans* vermittelt. Zumal dies im ebenfalls Cholesterol-auxotrophen Modellorganismus *Drosophila melanogaster* als Grund für die Lebensverlängerung schon ausgeschlossen wurde. Hier wurde die Statin-bedingte Verlängerung des Lebens auf die Inhibition der Prenylierung von Proteinen zurückgeführt (Spindler *et al.*, 2012). Darüber hinaus wird auch im Menschen die Cholesterol-unabhängige, kardioprotektive Wirkung von Statinen der Inhibition der Prenylierung von kleinen GTPasen zugeschrieben (Laufs *et al.*, 2002, Oesterle *et al.*, 2017). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde für die protektiv wirkenden Konzentrationen von Lova- und Simvastatin mit Hilfe eines Reporterstammes eine verminderte Prenylierung nachgewiesen. Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erläutert, konnte diese aber nicht in direkten Zusammenhang mit der induzierten Lebensverlängerung gebracht werden. Allerdings wurde in einer Studie bereits gezeigt, dass hochdosiertes Statin zu einer Inhibition der Prenylierung führt, welche die mitochondriale Atmung in *C. elegans* reduziert (Rauthan *et al.*, 2013). Daher müssen sich die in der Literatur jeweils identifizierten Mechanismen für eine Cholesterol-unabhängige Lebensverlängerung durch Statine nicht zwangsläufig widersprechen. Denn die hier gezeigte moderate Inhibition der Prenylierung durch Statine könnte die mitochondriale Atmung in einer Weise reduzieren, welche im Endeffekt vorteilhaft für das Überleben ist. Dass eine reduzierte mitochondriale Funktion die Lebensspanne in *C. elegans* verlängern kann, wurde zuvor schon gezeigt (Trifunovic & Ventura, 2014).

Zusammenfassend kann auf Grundlage der hier generierten Daten keine genaue Aussage über die Abhängigkeit der Protektion durch Statine von einem der Mevalonat-abhängigen Prozessen getroffen werden. In Anbetracht der Literaturdaten wäre sowohl eine Inhibition der Prenylierung als auch eine (daraus resultierende) Reduktion der mitochondrialen Funktion als Grund für die Lebensverlängerung denkbar.

4.6 Die Statin-bedingte Lebensverlängerung wird über JNK-1 und DAF-16 vermittelt

In dieser Arbeit konnte eine vollständige Abhängigkeit des Statin-Effekts vom Transkriptionsfaktor DAF-16 festgestellt werden. Dagegen scheint SKN-1, ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor in Bezug auf die Langlebigkeit, keine Rolle zu spielen. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass die Behandlung mit Lovastatin lediglich zu einer erhöhten nukleären Translokation von DAF-16 führte, jedoch nicht von SKN-1, wobei die mRNA Expression beider Transkriptionsfaktoren nicht beeinflusst wurde. Dagegen bewirkte der *Knockdown* der HMG-CoA-Reduktase mittels der protektiven Verdünnungen der dsRNA-produzierenden Bakterien bzgl. der Akkumulation des Alterspigments in dieser Arbeit keine Translokation von DAF-16. Grund dafür könnte wiederum der zuvor beschriebene Wirkmechanismus der RNAi in *C. elegans* sein, wodurch nach 24 h der RNAi Effekt noch nicht stark genug ausgeprägt ist. Zusätzlich zur verstärkten Translokation nach Lovastatin-Behandlung konnte gezeigt werden, dass diese auch zu einer erhöhten Aktivität von DAF-16 führte bzw. die Expression von DAF-16 Zielgenen modulierte. Dabei wurden *hsp-16.1* und *hsp-16.2* verstärkt und *vit-5* und *nuc-1* vermindert exprimiert. Es ist bekannt, dass die zwei vermehrt exprimierten Zielgene (*hsp-16.1* und *hsp-16.2*) mit einer Lebensverlängerung assoziiert werden und die beiden reduziert exprimierten Zielgene (*vit-5* und *nuc-1*) mit einer verkürzten Lebensspanne (Murphy *et al.*, 2003). In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass eine Lovastatin-Behandlung in einer DAF-16 Nullmutante weder eine Lebensverlängerung noch eine physiologische Verjüngung bzw. eine Reduktion der Akkumulation des Alterspigments bewirkt. Zusätzlich war auch die Simvastatin-bedingte physiologische Verjüngung von DAF-16 abhängig. Es ist daher wahrscheinlich, dass dies ebenso für die Lebensverlängerung durch Simvastatin zutrifft. In humanen oder murinen Zellen kann Simvastatin sowohl eine erhöhte Translokation von FOXO3 (Säugetierhomolog von DAF-16) als auch ein verstärktes Sirt1/FOXO3 *Signaling* bewirken (Kok *et al.*, 2013, Bonifacio *et al.*, 2016). Ähnlich wie bei *C. elegans* ist auch im Menschen eine erhöhte Aktivität von FOXO3 mit einer erhöhten Lebenserwartung assoziiert (Kuningas *et al.*, 2007, Flachsbar *et al.*, 2009, Joshi *et al.*, 2017). Besonders das G-Allel des FOXO3 Einzelnukleotid-Polymorphismus rs2802292, welcher mit einer erhöhten FOXO3-Aktivität und

Langlebigkeit in Verbindung gebracht wird, senkt das Risiko der durch koronare Herzkrankheiten bedingten Sterblichkeit um 26 % (Willcox *et al.*, 2016, Flachsbar *et al.*, 2017). Wie bereits erwähnt, können auch Statine, unabhängig des gesenkten LDL-Cholesterols, kardioprotektiv wirken (Oesterle *et al.*, 2017). Es wäre also denkbar, dass diese Kardioprotektion auch über eine erhöhte Aktivität von FOXO3 vermittelt wird.

Im Menschen, genauso wie in *C. elegans*, wird FOXO/DAF-16 hauptsächlich über den IGF1/DAF-2 Rezeptor reguliert, wobei eine Aktivierung des Rezeptors die Aktivität von FOXO/DAF-16 hemmt (Christensen *et al.*, 2006). In *in-vitro*-Versuchen mit humanen Zellen führt eine Behandlung mit Statinen zu einer Reduktion der N-Glykosylierung des IGF1-Rezeptors, wodurch seine Abundanz an der Zellmembran und seine Aktivität reduziert werden (Carlberg *et al.*, 1996, Forbes *et al.*, 2015). Der DAF-2 Rezeptor von *C. elegans* besitzt ebenfalls verschiedene N-Glykosylierungsstellen (Kaji *et al.*, 2007). Daher wäre ein ähnlicher Effekt von Statinen auch in *C. elegans* vorstellbar. In den hier gezeigten Experimenten führte eine Behandlung mit Lovastatin zu einer leicht erhöhten Lebensspanne in einer *daf-2* Mutante. Im Vergleich zum Wildtyp fiel die Statin-bedingte Lebensverlängerung in der *daf-2* Mutante geringer aus, was allerdings auch daraus resultieren könnte, dass diese Mutante, verglichen mit dem Wildtyp, grundsätzlich länger lebt (Lin *et al.*, 1997). Die Akkumulation des Alterspigments wurde in der *daf-2* Mutante durch die Behandlung mit Lovastatin nicht reduziert, wodurch dieses Ergebnis im Kontrast zur Lebensverlängerung steht. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die Akkumulation des Alterspigments in dieser langlebigen Mutante ohnehin schon reduziert ist (Gerstbrein *et al.*, 2005). Insgesamt deutet vor allem die Lebensverlängerung in der *daf-2* Mutante darauf hin, dass die Statin-induzierte Kernlokalisierung von DAF-16 zumindest durch einen weiteren zusätzlichen Faktor vermittelt wird. Dies wäre auch bei der hier verwendeten *daf-2* Mutante möglich, bei welcher dauerhaft ca. 70 % von DAF-16 kernlokalisiert sind (Narasimhan *et al.*, 2011). Demnach könnten die restlichen 30 % immer noch durch eine Statin-Behandlung moduliert werden, wodurch die Lebensverlängerung in der *daf-2* Mutante erklärbar wäre.

Für die Suche nach anderen DAF-16 Regulatoren, welche durch Lovastatin beeinflusst werden könnten, wurde die Expression von vier bekannten DAF-16 Aktivatoren untersucht, wobei lediglich die mRNA Expression von *jnk-1* (JNK) und *aak-2* (AMPK) erhöht war. Die MAPK JNK-1 wird in *C. elegans* vor allem bei thermalem, aber auch bei oxidativem Stress aktiviert (Oh *et al.*, 2005, Wolf *et al.*, 2008). Eine erhöhte thermale Stressresistenz wurde sowohl in der eigenen Masterarbeit^{1(S.37)} durch die Behandlung mit Lovastatin als auch in dieser Arbeit mit Simvastatin vermittelt (Jahn *et al.*, 2020).

Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Lovastatin in einer *jnk-1* Mutante weder zu einer Lebensverlängerung noch zu einer physiologischen Verjüngung führte. Dies deutet darauf hin, dass die Lebensverlängerung neben DAF-16 auch maßgeblich von JNK-1 abhängig ist. Dass eine erhöhte Expression von JNK-1 ausreicht, um eine erhöhte Kernlokalisierung von DAF-16 zu vermitteln, konnte in *C. elegans* bereits gezeigt werden (Oh *et al.*, 2005). Dafür ist jedoch die Anwesenheit der MAP2K JKK-1 nötig, welche JNK-1 reguliert. In einer *jkk-1* Mutante hat die Überexpression von JNK-1 keinen Einfluss mehr auf die Lokalisation von DAF-16 (Oh *et al.*, 2005). Inwiefern Lovastatin die Aktivität von JKK-1 beeinflusst, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Allerdings konnte hier gezeigt werden, dass Lovastatin in einer *jnk-1* Mutante keine Translokation von DAF-16 in den Nukleus mehr bewirkte, was für eine JNK-1 und damit auch JKK-1 vermittelte Kernlokalisierung von DAF-16 spricht. Neben *jnk-1* war auch die Expression von *aak-2* nach Behandlung mit Lovastatin erhöht. Ob auch AAK-2 einen Einfluss auf die DAF-16 vermittelte Lebensverlängerung durch Lovastatin hat, muss in zukünftigen Analysen noch untersucht werden. Gegen einen Einfluss von AAK-2 spricht, dass eine AAK-2-vermittelte Aktivierung zu keiner erhöhten Kernlokalisierung von DAF-16 führt, welche in der vorliegenden Arbeit jedoch beobachtet werden konnte (Greer *et al.*, 2007). In Kardiomyozyten aus der Maus konnte allerdings von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Simvastatin die mitochondriale Funktion einschränkt, wodurch AMPK phosphoryliert wird, was wiederum zur Aktivierung von FOXO3 führt (Bonifacio *et al.*, 2016). Eine mögliche Einschränkung der mitochondrialen Funktion durch Statine könnte auch in dieser Arbeit eine Erklärung für die erhöhte Expression von AAK-2 sein. Grundsätzlich fungiert AMPK bzw. AAK-2 als Energie-Anzeiger der Zelle und spielt in *C. elegans* bei einer Lebensverlängerung durch kalorische Restriktion eine wichtige Rolle, wobei eine erhöhte AMPK-Aktivität mit einer hohen Lebenserwartung assoziiert ist (Canto & Auwerx, 2011). Kalorische Restriktion konnte in dieser Arbeit aber als Ursache für die Resultate ausgeschlossen werden, wie bereits in Kapitel 4.4 erklärt wurde. Weiterhin kann AMPK auch in Säugetieren durch Phosphorylierung die HMG-CoA-Reduktase inhibieren (Burg & Espenshade, 2011). Inwieweit dies auf *C. elegans* zutrifft, ist noch nicht bekannt. Ob AAK-2 hier über eine Einschränkung der mitochondrialen Funktion durch die Statin-Behandlung hochreguliert wurde, die Aktivität von DAF-16 beeinflusste, zusätzlich zur Statin-Behandlung noch die HMG-CoA-Reduktase inhibiert und letztendlich auch zur Lebensverlängerung und Verjüngung durch Statine beiträgt, muss noch genauer untersucht werden.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die hier gezeigte erhöhte Translokation und Aktivität von DAF-16, welche über JNK-1 vermittelt wird, vermutlich verantwortlich für die Lovastatin bedingte Lebensverlängerung und Verjüngung in *C. elegans* ist.

4.7 Arbeitsmodell der Verzögerung der Alterung durch Statine

Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit wird folgendes Arbeitsmodell (Abb. 27) für die Verzögerung der Alterung durch Statine in *C. elegans* aufgestellt: Statine hemmen die Synthese von Mevalonat durch die kompetitive Hemmung der HMG-CoA Reduktase. Dies führt zu einer Mevalonat Depletion, sodass alle Mevalonat-abhängigen Prozesse gehemmt werden. Dadurch wird vermehrt JNK-1 exprimiert, welches eine erhöhte Kernlokalisation von DAF-16 vermittelt.

In Anbetracht der Literaturdaten wäre auch denkbar, dass die hier mit Hilfe eines Reporterstammes beobachtete reduzierte Prenylierung durch die Statin-Behandlung eine moderate Verminderung der mitochondrialen Funktion bewirkt, welche wiederum die Aktivierung von JNK-1 und/oder AAK-2 nach sich zieht, wodurch schlussendlich DAF-16 aktiviert wird.

Die Aktivierung von DAF-16 führt zur vermehrten Transkription von Genen wie zum Beispiel *hsp-16.1* und *hsp-16.2*, welche eine verlängerte Lebensspanne, eine physiologische Verjüngung und auch eine erhöhte thermale Stressresistenz vermitteln. Eventuell ist dieser Mechanismus auch für die Statin-bedingte reduzierte Aggregation von PolyQs in *C. elegans* verantwortlich.

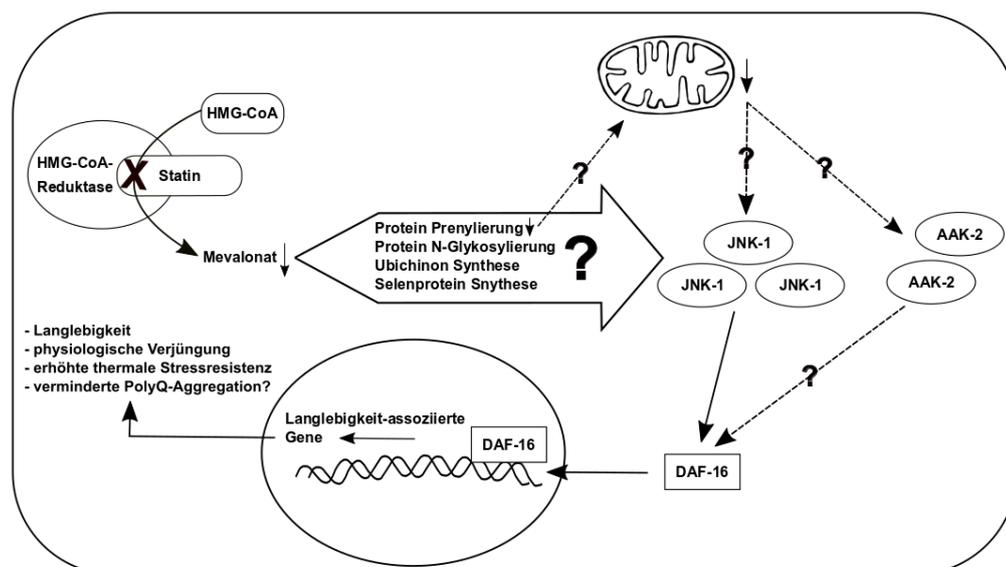


Abbildung 27: vorgeschlagenes Modell der Verzögerung der Alterung durch Statine in *C. elegans*.

Die kompetitive Hemmung der HMG-CoA-Reduktase durch Statine unterbindet die Umsetzung von HMG-CoA zu Mevalonat. Aufgrund dieser Mevalonat-Depletion, werden alle Mevalonat-abhängigen Prozesse gehemmt. Inwiefern die Hemmung welcher oder welches Prozesse/s

verantwortlich sind/ist für die erhöhte Expression von JNK-1 konnte nicht aufgeklärt werden. Literaturdaten lassen vermuten, dass möglicherweise eine reduzierte Protein Prenylierung zu einer verminderten mitochondrialen Funktion führen könnte, wodurch die Expression von JNK-1 stimuliert werden könnte. Denkbar wäre zudem auch, dass die Expression von AAK-2 sowie nachfolgend die Aktivität von DAF-16 durch die verminderte mitochondriale Funktion beeinflusst wird. Die erhöhte Expression von JNK-1 führt zu einer erhöhten Kernlokalisierung von DAF-16, wodurch Langlebigkeits-assoziierte Gene transkribiert werden und Effekte wie Langlebigkeit und eine physiologische Verjüngung vermittelt werden.

4.8 Ausblick

In fortführenden Arbeiten sollte versucht werden die Frage zu klären, welche bzw. welcher der Mevalonat-abhängigen Prozesse die Statin-bedingte Lebensverlängerung bewirken bzw. bewirkt. Hierzu bieten sich weitere Supplementationsexperimente mit höheren Konzentrationen der einzelnen Vorstufen (insbesondere FPP und GGPP) basierend auf den hier durchgeführten Vorversuchen an. Zusätzlich bieten auch Inhibitoren einzelner Prozesse wie zum Beispiel Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTI), Geranylgeranyltransferase-Inhibitoren (GGTI) oder Glykosylierungsinhibitoren die Möglichkeit, mehr über die Zusammenhänge einer verminderten Aktivität einzelner Prozesse und den beobachteten *anti-aging* Statin-Phänotyp zu erfahren. Mit Hilfe der während dieser Doktorarbeit etablierten *Lifespan-Machine* könnte mit beiden genannten Versuchsansätzen die Abhängigkeit der Lebensverlängerung durch Statine von einem der Mevalonat-abhängigen Prozesse untersucht werden. Durch die Verwendung der *Lifespan-Machine* ist es möglich, verschiedene Bedingungen im Hochdurchsatzverfahren parallel und mit hohen Tierzahlen zu testen. Dadurch kann der Einfluss der Supplementation einer Vorstufe bei simultaner Gabe eines Statins oder der Einfluss eines Inhibitors gleichzeitig zum Beispiel im Wildtyp, in einer *daf-2*, *daf-16* und einer *jnk-1* Mutante getestet werden.

Um die Frage zu klären, ob die Behandlung mit protektiven Statin-Konzentrationen die mitochondriale Funktion vermindert, könnte man zum einen das ATP-Level und zum anderen die mitochondriale Atmung mit Hilfe eines *Seahorse* Analysegeräts messen. Diese Experimente könnten mit FTIs und GGTI wiederholt werden, um festzustellen, ob die mögliche Verminderung der mitochondrialen Atmung durch Statine aus der in dieser Arbeit gemessenen Hemmung der Protein Prenylierung resultiert.

JKK-1 ist laut Literatur notwendig, um die JNK-1 bedingte Aktivierung von DAF-16 zu vermitteln. Inwiefern Statine einen Einfluss auf die Aktivität von JKK-1 haben, könnte überprüft werden, indem der Phosphorylierungsstatus von JNK-1 mittels *Western Blot* und einem Phospho-SAPK/JNK Antikörper analysiert wird. Zusätzlich sollte auch die mRNA Expression von JKK-1 mit Hilfe einer RT-qPCR gemessen werden, sowie die

Lebensspanne oder die Akkumulation des Alterspigments nach Statin-Gabe in einer *jkk-1* Mutante.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Statin-Effekts von AAK-2 würde es sich anbieten, die Lebensspanne und die Akkumulation des Alterspigments in einer *aak-2* Mutante zu analysieren. Da AAK-2 in *C. elegans* keinen Einfluss auf die Lokalisation von DAF-16 hat, könnte die Expression von DAF-16-Zielgenen nach Statin-Gabe in einer *aak-2* Mutante analysiert werden. Unabhängig von AAK-2 sollte zudem die Expression von weiteren DAF-16-Zielgenen, welche mit einer Lebensverlängerung assoziiert sind (zum Bsp. SOD-3), untersucht werden. Die daraus resultierenden möglichen Kandidatengene sollten wie die bereits gefundenen Gene (*hsp-16.1* und *hsp-16.2*) hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Verzögerung der Alterung durch Statine überprüft werden, indem der Einfluss von Statinen auf die Lebensspanne in den entsprechenden Mutanten überprüft wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aggregation der PolyQ-Proteine nach Behandlung mit Statinen reduziert wurde. Um herauszufinden, ob auch diese Protektion von der Mevalonat-Depletion sowie von DAF-16 abhängig ist, sollte die Aggregation der PolyQ-Proteine bei gleichzeitiger Gabe eines Statins und Mevalonat im Wildtyp, als auch nur nach Statin-Behandlung in einer *daf-16* Mutante untersucht werden. Um eine schwache Induktion der UPR auszuschließen, welche mit dem in dieser Arbeit verwendeten Reporterstamm nicht sichtbar ist, würde es sich anbieten, die Expression der Marker (*hsp-4* und *hsp-60*) mit Hilfe einer RT-qPCR und/oder *Western Blotting* zu überprüfen. Um zu klären, ob Statine bei verschiedenen Proteinfehlfaltungserkrankungen, wie zum Beispiel Alzheimer oder Parkinson, die Aggregation der krankheitsverursachenden Proteine vermindern kann, könnten weitere *C. elegans* Aggregationsstämme (z. B. Alzheimer: GRU102 [*myo-2p::YFP* + *unc-119p::Abeta1-42*] oder Parkinson: NL5901 [*unc-54p::alphasynuclein::YFP* + *unc-119(+)*]) eingesetzt werden.

Abschließend können natürlich auch noch weitere Statine auf eine mögliche Lebensverlängerung getestet werden, um die Vermutung eines generellen Statin-Effekts zu untermauern.

5 Zusammenfassung

Statine werden in der Klinik seit 1987 als Cholesterolsenker eingesetzt, wobei ihre Wirkung auf der kompetitiven Hemmung der HMG-CoA-Reduktase beruht. Diese Hemmung führt zu einer Depletion von Mevalonat, wodurch neben der Cholesterolsynthese zusätzlich weitere Mevalonat-abhängige aber Cholesterol-unabhängige Prozesse beeinträchtigt werden. Dadurch können eine Reihe von weiteren protektiven Effekten von Statinen, sogenannte pleiotrope Effekte, ausgelöst werden. Insbesondere die Statin-bedingte Hemmung der Prenylierung von kleinen GTPasen wird für viele dieser Cholesterol-unabhängigen und vorteilhaften Statin-Wirkungen verantwortlich gemacht. Mit Blick auf die Alterung konnte kürzlich in einer Kohortenstudie gezeigt werden, dass eine Statin-Behandlung zu einer verringerten Sterblichkeitsrate bei Menschen zwischen 70 und 90 Jahren führt, welche jedoch unabhängig vom Cholesterolspiegel ist. Da *C. elegans* den Mevalonatweg beherbergt, aber nicht fähig ist, Cholesterol zu synthetisieren (Cholesterol-auxotroph), ist er ein sehr gut geeigneter Modellorganismus, um die Cholesterol-unabhängigen Wirkungen von Statinen zu untersuchen. Zusätzlich ist *C. elegans* ein sehr etablierter Modellorganismus in der Altersforschung, mit dessen Hilfe bereits viele Ursachen für eine beschleunigte oder verlangsamte Alterung aufgeklärt werden konnten.

Insgesamt leitet sich daraus die Arbeitshypothese ab, dass Statine in *C. elegans* über die Hemmung der Mevalonat-Synthese Einfluss auf Alters-assoziierte Signalwege nehmen und dadurch den Alterungsprozess verlangsamen.

Um dies zu untersuchen, wurde die Lebensspanne und das physiologische Alter anhand von Biomarkern (Akkumulation der Alterspigmente, Abnahme der Beweglichkeit) sowohl im Wildtyp als auch in verschiedenen Alters-assoziierten Mutanten analysiert. Zusätzlich wurde der Einfluss von Statinen auf bestimmte Faktoren mit Hilfe von Reporterstämmen oder *Real Time*-RT-PCR überprüft. Die Abhängigkeit des Statin-Effekts von einer Mevalonat-Depletion oder einem der Mevalonat-abhängigen-Prozesse wurde mittels *Knockdown*- und Supplementationsexperimenten untersucht.

Es konnte beobachtet werden, dass niedrig dosierte Statine (Lova- und Simvastatin) das Leben von *C. elegans* verlängern. Mit Hilfe von Biomarkern für das physiologische Alter konnte zudem gezeigt werden, dass die behandelten Individuen nicht nur länger lebten, sondern auch physiologisch jünger waren als die unbehandelten Nematoden. Daneben führte die Behandlung mit Simvastatin zu einer Reduktion der altersabhängigen Polyglutamin (PolyQ) Aggregation (Huntington Erkrankung) eines transgenen *C. elegans* Reporterstammes.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass sowohl die Lebensverlängerung durch Lovastatin als auch die physiologische Verjüngung durch Lova- oder Simvastatin von der Mevalonat-Depletion abhängig waren. Diese physiologische Verjüngung konnte mit Hilfe eines moderaten RNAi-*Knockdowns* der HMG-CoA-Reduktase (HMGR-1), welcher über eine Verdünnung der dsRNA produzierenden Bakterien herbeigeführt wurde, imitiert werden. In Hinblick auf die Lebensspanne führte solch ein *Knockdown* jedoch zu einer Lebensverkürzung, wofür der selbstverstärkende Mechanismus der RNAi-Maschinerie in *C. elegans* ursächlich sein könnte. Die Frage, welche/r der Mevalonat-abhängigen Prozesse verantwortlich für die Verzögerung der Alterung durch Statine sind/ist, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Unabhängig des Alterungsprozesses wurde allerdings mit Hilfe eines Prenylierungs-Reporterstamms gezeigt, dass die protektiven Konzentrationen von Lova- oder Simvastatin die Prenylierung hemmen.

Auf molekularer Ebene konnte hier gezeigt werden, dass Lovastatin die Translokation des Transkriptionsfaktors DAF-16 (menschliches Homolog: FOXO3) in den Nukleus bewirkt und die Expression von DAF-16 Zielgenen DAF-16 spezifisch beeinflusst. Weiterhin führte Lovastatin in Abwesenheit von DAF-16 weder zu einer Lebensverlängerung noch zu einer physiologischen Verjüngung in *C. elegans*. Auch die physiologische Verjüngung durch Simvastatin war DAF-16 abhängig. Für die Verzögerung der Alterung durch Lovastatin wird neben DAF-16 auch noch der bekannte DAF-16 Aktivator JNK-1 (menschliches Homolog: JNK) benötigt. Dabei wurde JNK-1 durch die Lovastatin-Behandlung vermehrt exprimiert. In Abwesenheit von JNK-1 konnte Lovastatin die Alterung nicht mehr verzögern. Der Hauptregulator von DAF-16, DAF-2 (menschliches Homolog: IGF1R), scheint bei der Statin-bedingten Protektion keine Rolle zu spielen. Neben JNK-1 wurde auch die Expression von AAK-2 (AMPK), einem weiteren Aktivator von DAF-16, durch die Behandlung mit Lovastatin erhöht. Ob auch AAK-2 einen Einfluss auf die Lebensverlängerung und Verjüngung durch Statine hat, muss noch untersucht werden.

Zusammenfassend legen die hier generierten Daten die Vermutung nahe, dass FOXO3 (DAF-16) ein Schlüsselmolekül für die Regulation von weiteren molekularen Mechanismen ist, welche der Cholesterol-unabhängigen aber Mevalonat-abhängigen *anti-aging* Wirkung von Statinen beim Menschen zugrunde liegen.

6 Summary

Statins have been used in the clinic to lower cholesterol since 1987. Their competitive inhibition of the HMG-CoA reductase leads to a depletion of mevalonate. The depletion of mevalonate impairs, in addition to cholesterol biosynthesis, other mevalonate-dependent but cholesterol-independent processes. Thereby a number of further protective effects of statins (pleiotropic effects) can be triggered. In particular, the statin-related inhibition of the prenylation of small GTPases is held responsible for many of these cholesterol-independent and beneficial effects. With regard to aging, a cohort study recently showed that a decreased mortality rate in humans between age 78 – 90 correlates with statin treatment, but is independent of cholesterol levels. Since *C. elegans* harbours the mevalonate pathway, but the branch that leads to cholesterol synthesis is missing (cholesterol auxotrophic), it is a well-suited model organism for studying the cholesterol-independent effects of statins. In addition, *C. elegans* is a very established model organism in aging research, with the help of which many causes for accelerated or slowed aging have already been elucidated.

This leads to the working hypothesis that statins influence aging-associated signaling pathways by inhibiting mevalonate synthesis and thereby slow down the aging process in *C. elegans*.

To investigate this, the lifespan and physiological age (accumulation of age pigments, decrease in motility) of *C. elegans* were analyzed in the wild type and in various aging-associated mutants. In addition, the influence of statins on certain factors was checked using reporter strains or real-time RT-PCR. The dependence of the statin effect on a mevalonate depletion or one of the mevalonate-dependent processes was investigated using knockdown and supplementation experiments.

Here we show that low-dose statins prolong the lifespan in *C. elegans*. In the present study a lifespan-prolonging effect for Lova- and Simva-statin could be demonstrated. With the help of Biomarkers for physiological age it was also shown that the treated individuals not only live longer, but are also physiologically younger than the untreated nematodes. In addition, treatment with simvastatin reduced the age-dependent polyglutamine (PolyQ) aggregation (Huntington's disease) of a transgenic *C. elegans* reporter strain.

Furthermore, it could be shown here that the life extension by lovastatin and the physiological rejuvenation by Lova- or Simvastatin depend on the mevalonate depletion. This physiological rejuvenation could be imitated with the help of a moderate RNAi knockdown of HMG-CoA reductase (HMGR-1). This moderate Knockdown was

accomplished by a dilution of the bacteria producing the dsRNA. In terms of lifespan, however, such a knockdown led to a shortening of life, which could be due to the self-reinforcing mechanism of the RNAi machinery in *C. elegans*. The question which of the mevalonate-dependent processes is/are responsible for delayed aging phenotype by statin treatment could not be conclusively answered in this work. But regardless of the aging process, it was shown here with the help of a prenylation reporter strain, that the protective concentrations of Lova- or Simvastatin inhibit prenylation.

At a molecular level, it was shown that lovastatin causes a translocation of the transcription factor DAF-16 (human homolog: FOXO3) into the nucleus and influences the expression of DAF-16 target genes in a DAF-16 dependent manner. Furthermore, in the absence of DAF-16, lovastatin neither prolongs the lifespan nor leads to a physiologically rejuvenation in *C. elegans*. The physiological rejuvenation caused by simvastatin was also dependent on DAF-16. In addition to DAF-16, the well-known DAF-16 activator JNK-1 (human homolog: JNK) was required for the delayed aging process caused by lovastatin. Here, JNK-1 is increasingly expressed by lovastatin treatment. In the absence of JNK-1, lovastatin can no longer delay the aging-process. The main regulator of DAF-16, DAF-2 (human homolog: IGF1R) seems not to be important for the statin-related protection. In addition to JNK-1, the expression of AAK-2 (AMPK), another activator of DAF-16, was increased by treatment with lovastatin. Whether AAK-2 also has an impact on the life extension and rejuvenation by statins has still to be investigated.

In conclusion, FOXO3 (DAF-16) is suggested to be a key molecule for the regulation of further molecular mechanisms underlying the cholesterol-independent but mevalonate-dependent anti aging effect of statins in humans.

7 Literaturverzeichnis

Albertson, D. G. and J. N. Thomson (1976). "The pharynx of *Caenorhabditis elegans*." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **275**(938): 299-325.

Ali, F. Y., P. C. Armstrong, A. R. Dhanji, A. T. Tucker, M. J. Paul-Clark, J. A. Mitchell and T. D. Warner (2009). "Antiplatelet actions of statins and fibrates are mediated by PPARs." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(5): 706-711.

Altun, Z. F. and D. H. Hall (2009). "Alimentary system, intestine." WormAtlas doi:10.3908/wormatlas.1.4.

Altun, Z. F. and D. H. Hall (2009). "Introduction to *C. elegans* Anatomy." WormAtlas doi:10.3908/wormatlas.1.1.

Altun, Z. F. and D. H. Hall (2011). "Nervous system, general description." WormAtlas doi:10.3908/wormatlas.1.18.

Anderson, J. L., L. T. Morran and P. C. Phillips (2010). "Outcrossing and the maintenance of males within *C. elegans* populations." Journal of heredity **101**(suppl_1): S62-S74.

Andreux, P. A., L. Mouchiroud, X. Wang, V. Jovaisaite, A. Mottis, S. Bichet, N. Moullan, R. H. Houtkooper and J. Auwerx (2014). "A method to identify and validate mitochondrial modulators using mammalian cells and the worm *C. elegans*." Sci Rep **4**: 5285.

Apfeld, J., G. O'Connor, T. McDonagh, P. S. DiStefano and R. Curtis (2004). "The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*." Genes Dev **18**(24): 3004-3009.

Avery, L. and H. R. Horvitz (1987). "A cell that dies during wild-type *C. elegans* development can function as a neuron in a *ced-3* mutant." Cell **51**(6): 1071-1078.

Avery, L. and J. H. Thomas (1997). Feeding and Defecation. *C. elegans II*. ed, D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess. Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Avery, L. and Y. J. You (2012). "*C. elegans* feeding." WormBook: 1-23.

Bar-On, P., L. Crews, A. O. Koob, H. Mizuno, A. Adame, B. Spencer and E. Masliah (2008). "Statins reduce neuronal alpha-synuclein aggregation in in vitro models of Parkinson's disease." J Neurochem **105**(5): 1656-1667.

Beaird, S. L. (2000). "HMG-CoA reductase inhibitors: assessing differences in drug interactions and safety profiles." J Am Pharm Assoc (Wash) **40**(5): 637-644.

Bogsrud, M. P., G. Langslet, L. Ose, K. E. Arnesen, M. C. Sm Stuen, U. F. Malt, B. Woldseth and K. Retterstol (2013). "No effect of combined coenzyme Q10 and

selenium supplementation on atorvastatin-induced myopathy." Scand Cardiovasc J **47**(2): 80-87.

Bolanowski, M. A., R. L. Russell and L. A. Jacobson (1981). "Quantitative measures of aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Population and longitudinal studies of two behavioral parameters." Mech Ageing Dev **15**(3): 279-295.

Bonifacio, A., P. J. Mullen, I. S. Mityko, L. C. Navegantes, J. Bouitbir and S. Krahenbuhl (2016). "Simvastatin induces mitochondrial dysfunction and increased atrogin-1 expression in H9c2 cardiomyocytes and mice in vivo." Arch Toxicol **90**(1): 203-215.

Braeckman, B. P., K. Houthoofd, A. De Vreese and J. R. Vanfleteren (2002). "Assaying metabolic activity in ageing *Caenorhabditis elegans*." Mech Ageing Dev **123**(2-3): 105-119.

Branicky, R., P. A. Nguyen and S. Hekimi (2006). "Uncoupling the pleiotropic phenotypes of *clk-1* with tRNA missense suppressors in *Caenorhabditis elegans*." Mol Cell Biol **26**(10): 3976-3985.

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

Buchter, C., D. Ackermann, S. Havermann, S. Honnen, Y. Chovolou, G. Fritz, A. Kampkotter and W. Watjen (2013). "Myricetin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by DAF-16." Int J Mol Sci **14**(6): 11895-11914.

Buhaescu, I. and H. Izzedine (2007). "Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications." Clin Biochem **40**(9-10): 575-584.

Burda, P. and M. Aebi (1999). "The dolichol pathway of N-linked glycosylation." Biochim Biophys Acta **1426**(2): 239-257.

Burg, J. S. and P. J. Espenshade (2011). "Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast." Prog Lipid Res **50**(4): 403-410.

Cacho-Valadez, B., F. Munoz-Lobato, J. R. Pedrajas, J. Cabello, J. C. Fierro-Gonzalez, P. Navas, P. Swoboda, C. D. Link and A. Miranda-Vizueté (2012). "The characterization of the *Caenorhabditis elegans* mitochondrial thioredoxin system uncovers an unexpected protective role of thioredoxin reductase 2 in beta-amyloid peptide toxicity." Antioxid Redox Signal **16**(12): 1384-1400.

Calabrese, E. J., K. A. Bachmann, A. J. Bailer, P. M. Bolger, J. Borak, L. Cai, N. Cedergreen, M. G. Cherian, C. C. Chiueh, T. W. Clarkson, R. R. Cook, D. M. Diamond, D. J. Doolittle, M. A. Dorato, S. O. Duke, L. Feinendegen, D. E. Gardner, R. W. Hart, K. L. Hastings, A. W. Hayes, G. R. Hoffmann, J. A. Ives, Z. Jaworowski, T. E. Johnson, W. B. Jonas, N. E. Kaminski, J. G. Keller, J. E. Klaunig, T. B. Knudsen, W. J. Kozumbo, T. Lettieri, S. Z. Liu, A. Maisseu, K. I. Maynard, E. J. Masoro, R. O. McClellan, H. M. Mehendale, C. Mothersill, D. B.

- Newlin, H. N. Nigg, F. W. Oehme, R. F. Phalen, M. A. Philbert, S. I. Rattan, J. E. Riviere, J. Rodricks, R. M. Sapolsky, B. R. Scott, C. Seymour, D. A. Sinclair, J. Smith-Sonneborn, E. T. Snow, L. Spear, D. E. Stevenson, Y. Thomas, M. Tubiana, G. M. Williams and M. P. Mattson (2007). "Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework." Toxicol Appl Pharmacol **222**(1): 122-128.
- Canto, C. and J. Auwerx (2011). "Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector?" Physiology (Bethesda) **26**(4): 214-224.
- Carlberg, M., A. Dricu, H. Blegen, M. Wang, M. Hjertman, P. Zickert, A. Hoog and O. Larsson (1996). "Mevalonic acid is limiting for N-linked glycosylation and translocation of the insulin-like growth factor-1 receptor to the cell surface. Evidence for a new link between 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase and cell growth." J Biol Chem **271**(29): 17453-17462.
- Chakrapani, B. P., S. Kumar and J. R. Subramaniam (2008). "Development and evaluation of an in vivo assay in *Caenorhabditis elegans* for screening of compounds for their effect on cytochrome P450 expression." J Biosci **33**(2): 269-277.
- Chandrasekar, B., S. Mummidi, L. Mahimainathan, D. N. Patel, S. R. Bailey, S. Z. Imam, W. C. Greene and A. J. Valente (2006). "Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-kappaB- and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin." J Biol Chem **281**(22): 15099-15109.
- Chinetti-Gbaguidi, G., S. Colin and B. Staels (2015). "Macrophage subsets in atherosclerosis." Nature Reviews Cardiology **12**(1): 10-17.
- Christensen, K., T. E. Johnson and J. W. Vaupel (2006). "The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights." Nat Rev Genet **7**(6): 436-448.
- Chu, C. S., P. T. Tseng, B. Stubbs, T. Y. Chen, C. H. Tang, D. J. Li, W. C. Yang, Y. W. Chen, C. K. Wu, N. Veronese, A. F. Carvalho, B. S. Fernandes, N. Herrmann and P. Y. Lin (2018). "Use of statins and the risk of dementia and mild cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis." Sci Rep **8**(1): 5804.
- Coburn, C., E. Allman, P. Mahanti, A. Benedetto, F. Cabreiro, Z. Pincus, F. Matthijssens, C. Araiz, A. Mandel, M. Vlachos, S. A. Edwards, G. Fischer, A. Davidson, R. E. Pryor, A. Stevens, F. J. Slack, N. Tavernarakis, B. P. Braeckman, F. C. Schroeder, K. Nehrke and D. Gems (2013). "Anthranilate fluorescence marks a calcium-propagated necrotic wave that promotes organismal death in *C. elegans*." PLoS Biol **11**(7): e1001613.
- Coburn, C. and D. Gems (2013). "The mysterious case of the *C. elegans* gut granule: death fluorescence, anthranilic acid and the kynurenine pathway." Front Genet **4**: 151.

- Collins, J. J., C. Huang, S. Hughes and K. Kornfeld (2008). "The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*." WormBook: 1-21.
- Colman, R. J., R. M. Anderson, S. C. Johnson, E. K. Kastman, K. J. Kosmatka, T. M. Beasley, D. B. Allison, C. Cruzen, H. A. Simmons, J. W. Kemnitz and R. Weindruch (2009). "Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys." Science **325**(5937): 201-204.
- Cooper, J. F., D. J. Dues, K. K. Spielbauer, E. Machiela, M. M. Senchuk and J. M. Van Raamsdonk (2015). "Delaying aging is neuroprotective in Parkinson's disease: a genetic analysis in *C. elegans* models." NPJ Parkinsons Dis **1**: 15022.
- Crane, F. L., Y. Hatefi, R. L. Lester and C. Widmer (1957). "Isolation of a quinone from beef heart mitochondria." Biochim Biophys Acta **25**(1): 220-221.
- Cypser, J. R., P. Tedesco and T. E. Johnson (2006). "Hormesis and aging in *Caenorhabditis elegans*." Exp Gerontol **41**(10): 935-939.
- Davis, B. O., Jr., G. L. Anderson and D. B. Dusenbery (1982). "Total luminescence spectroscopy of fluorescence changes during aging in *Caenorhabditis elegans*." Biochemistry **21**(17): 4089-4095.
- Dhar, M. K., A. Koul and S. Kaul (2013). "Farnesyl pyrophosphate synthase: a key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug development." N Biotechnol **30**(2): 114-123.
- Dichtl, W., J. Dulak, M. Frick, H. F. Alber, S. P. Schwarzacher, M. P. Ares, J. Nilsson, O. Pachinger and F. Weidinger (2003). "HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(1): 58-63.
- Driscoll, M. (1995). Methods for the study of cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Methods in cell biology, Elsevier. **46**: 323-353.
- Duennwald, M. L. and S. Lindquist (2008). "Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity." Genes Dev **22**(23): 3308-3319.
- Ekhart, C., L. de Jong, L. Gross-Martirosyan and F. van Hunsel (2016). "Muscle rupture associated with statin use." British journal of clinical pharmacology **82**(2): 473-477.
- Endo, A., M. Kuroda and K. Tanzawa (1976). "Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity." FEBS Lett **72**(2): 323-326.
- Espenshade, P. J. and A. L. Hughes (2007). "Regulation of sterol synthesis in eukaryotes." Annu Rev Genet **41**: 401-427.

- Ewbank, J. J. (2006). "Signaling in the immune response." WormBook: 1-12.
- Felix-Redondo, F. J., M. Grau and D. Fernandez-Berges (2013). "Cholesterol and cardiovascular disease in the elderly. Facts and gaps." Aging Dis **4**(3): 154-169.
- Feng, X. and S. Guang (2013). "Small RNAs, RNAi and the inheritance of gene silencing in *Caenorhabditis elegans*." J Genet Genomics **40**(4): 153-160.
- Flachsbart, F., A. Caliebe, R. Kleindorp, H. Blanche, H. von Eller-Eberstein, S. Nikolaus, S. Schreiber and A. Nebel (2009). "Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2700-2705.
- Flachsbart, F., J. Dose, L. Gentschew, C. Geismann, A. Caliebe, C. Knecht, M. Nygaard, N. Badarinarayan, A. ElSharawy, S. May, A. Luzius, G. G. Torres, M. Jentzsch, M. Forster, R. Hasler, K. Pallauf, W. Lieb, C. Derbois, P. Galan, D. Drichel, A. Arlt, A. Till, B. Krause-Kyora, G. Rimbach, H. Blanche, J. F. Deleuze, L. Christiansen, K. Christensen, M. Nothnagel, P. Rosenstiel, S. Schreiber, A. Franke, S. Sebens and A. Nebel (2017). "Identification and characterization of two functional variants in the human longevity gene FOXO3." Nat Commun **8**(1): 2063.
- Forbes, K., V. K. Shah, K. Siddals, J. M. Gibson, J. D. Aplin and M. Westwood (2015). "Statins inhibit insulin-like growth factor action in first trimester placenta by altering insulin-like growth factor 1 receptor glycosylation." Mol Hum Reprod **21**(1): 105-114.
- Friesen, J. A. and V. W. Rodwell (2004). "The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases." Genome Biol **5**(11): 248.
- Garigan, D., A. L. Hsu, A. G. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer and C. Kenyon (2002). "Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation." Genetics **161**(3): 1101-1112.
- Gerstbrein, B., G. Stamatas, N. Kollias and M. Driscoll (2005). "In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*." Aging Cell **4**(3): 127-137.
- Gilbert, R., A. Al-Janabi, O. Tomkins-Netzer and S. Lightman (2017). "Statins as anti-inflammatory agents: A potential therapeutic role in sight-threatening non-infectious uveitis." Porto Biomedical Journal **2**(2): 33-39.
- Glynn, R. J., E. Danielson, F. A. Fonseca, J. Genest, A. M. Gotto Jr, J. J. Kastelein, W. Koenig, P. Libby, A. J. Lorenzatti and J. G. MacFadyen (2009). "A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism." New England Journal of Medicine **360**(18): 1851-1861.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1990). "Regulation of the mevalonate pathway." Nature **343**(6257): 425-430.

- Golomb, B. A. and M. A. Evans (2008). "Statin adverse effects : a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism." Am J Cardiovasc Drugs **8**(6): 373-418.
- Govindan, S., M. Amirthalingam, K. Duraisamy, T. Govindhan, N. Sundararaj and S. Palanisamy (2018). "Phytochemicals-induced hormesis protects *Caenorhabditis elegans* against α -synuclein protein aggregation and stress through modulating HSF-1 and SKN-1/Nrf2 signaling pathways." Biomed Pharmacother **102**: 812-822.
- Greer, E. L., D. Dowlatshahi, M. R. Banko, J. Villen, K. Hoang, D. Blanchard, S. P. Gygi and A. Brunet (2007). "An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*." Curr Biol **17**(19): 1646-1656.
- Grundy, S. M. (1978). "Cholesterol metabolism in man." West J Med **128**(1): 13-25.
- Guengerich, F. P. (2003). "Cytochromes P450, drugs, and diseases." Mol Interv **3**(4): 194-204.
- Hajar, R. (2011). "Statins: past and present." Heart Views **12**(3): 121-127.
- Harada, S., T. Hashizume, K. Nemoto, Z. Shao, N. Higashitani, T. Etheridge, N. J. Szewczyk, K. Fukui, A. Higashibata and A. Higashitani (2016). "Fluid dynamics alter *Caenorhabditis elegans* body length via TGF-beta/DBL-1 neuromuscular signaling." NPJ Microgravity **2**: 16006.
- Haramaki, N., H. Ikeda, K. Takenaka, A. Katoh, R. Sugano, S. Yamagishi, H. Matsuoka and T. Imaizumi (2007). "Fluvastatin alters platelet aggregability in patients with hypercholesterolemia: possible improvement of intraplatelet redox imbalance via HMG-CoA reductase." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(6): 1471-1477.
- Hasegawa, K., S. Miwa, K. Tsutsumiuchi and J. Miwa (2010). "Allyl isothiocyanate that induces GST and UGT expression confers oxidative stress resistance on *C. elegans*, as demonstrated by nematode biosensor." PLoS One **5**(2): e9267.
- Hedgecock, E. M. and J. G. White (1985). "Polyploid tissues in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **107**(1): 128-133.
- Herndon, L. A., P. J. Schmeissner, J. M. Dudaronek, P. A. Brown, K. M. Listner, Y. Sakano, M. C. Paupard, D. H. Hall and M. Driscoll (2002). "Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*." Nature **419**(6909): 808-814.
- Hihi, A. K., Y. Gao and S. Hekimi (2002). "Ubiquinone is necessary for *Caenorhabditis elegans* development at mitochondrial and non-mitochondrial sites." J Biol Chem **277**(3): 2202-2206.

- Hillers, K. J., V. Jantsch, E. Martinez-Perez and J. L. Yanowitz (2017). "Meiosis." WormBook **2017**: 1-43.
- Hinson, D. D., K. L. Chambliss, M. J. Toth, R. D. Tanaka and K. M. Gibson (1997). "Post-translational regulation of mevalonate kinase by intermediates of the cholesterol and nonsterol isoprene biosynthetic pathways." J Lipid Res **38**(11): 2216-2223.
- Hirsh, D., D. Oppenheim and M. Klass (1976). "Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **49**(1): 200-219.
- Hodgkin, J. (2005). "Karyotype, ploidy, and gene dosage." WormBook: 1-9.
- Hodgkin, J. and T. Doniach (1997). "Natural variation and copulatory plug formation in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **146**(1): 149-164.
- Holoch, D. and D. Moazed (2015). "RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression." Nat Rev Genet **16**(2): 71-84.
- Hosokawa, H., N. Ishii, H. Ishida, K. Ichimori, H. Nakazawa and K. Suzuki (1994). "Rapid accumulation of fluorescent material with aging in an oxygen-sensitive mutant *mev-1* of *Caenorhabditis elegans*." Mech Ageing Dev **74**(3): 161-170.
- Houthoofd, K., T. E. Johnson and J. R. Vanfleteren (2005). "Dietary restriction in the nematode *Caenorhabditis elegans*." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **60**(9): 1125-1131.
- Hu, P. J. (2007). "Dauer." WormBook: 1-19.
- Huang, C., C. Xiong and K. Kornfeld (2004). "Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 8084-8089.
- Jacobs, J. M., A. Cohen, E. Ein-Mor and J. Stessman (2013). "Cholesterol, statins, and longevity from age 70 to 90 years." J Am Med Dir Assoc **14**(12): 883-888.
- Jacquet, L., A. Neueder, G. Foldes, P. Karagiannis, C. Hobbs, N. Jolinon, M. Mioulane, T. Sakai, S. E. Harding and D. Ilic (2015). "Three Huntington's Disease Specific Mutation-Carrying Human Embryonic Stem Cell Lines Have Stable Number of CAG Repeats upon In Vitro Differentiation into Cardiomyocytes." PLoS One **10**(5): e0126860.
- Jahn, A., B. Scherer, G. Fritz and S. Honnen (2020). "Statins Induce a DAF-16/Foxo-dependent Longevity Phenotype via JNK-1 through Mevalonate Depletion in *C. elegans*." Aging Dis **11**(1): 60-72.
- James, A. M., R. A. Smith and M. P. Murphy (2004). "Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q." Arch Biochem Biophys **423**(1): 47-56.

- Jo, Y. and R. A. Debose-Boyd (2010). "Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase." Crit Rev Biochem Mol Biol **45**(3): 185-198.
- Johnson, T. E. (2003). "Advantages and disadvantages of *Caenorhabditis elegans* for aging research." Exp Gerontol **38**(11-12): 1329-1332.
- Johnstone, I. L. (1994). "The cuticle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: a complex collagen structure." Bioessays **16**(3): 171-178.
- Jonassen, T., P. L. Larsen and C. F. Clarke (2001). "A dietary source of coenzyme Q is essential for growth of long-lived *Caenorhabditis elegans* clk-1 mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(2): 421-426.
- Joshi, P. K., N. Pirastu, K. A. Kentistou, K. Fischer, E. Hofer, K. E. Schraut, D. W. Clark, T. Nutile, C. L. K. Barnes, P. Timmers, X. Shen, I. Gandin, A. F. McDaid, T. F. Hansen, S. D. Gordon, F. Giulianini, T. S. Boutin, A. Abdellaoui, W. Zhao, C. Medina-Gomez, T. M. Bartz, S. Trompet, L. A. Lange, L. Raffield, A. van der Spek, T. E. Galesloot, P. Proitsi, L. R. Yanek, L. F. Bielak, A. Payton, F. Murgia, M. P. Concas, G. Biino, S. M. Tajuddin, I. Seppala, N. Amin, E. Boerwinkle, A. D. Borglum, A. Campbell, E. W. Demerath, I. Demuth, J. D. Faul, I. Ford, A. Gialluisi, M. Gogele, M. Graff, A. Hingorani, J. J. Hottenga, D. M. Hougaard, M. A. Hurme, M. A. Ikram, M. Jylha, D. Kuh, L. Ligthart, C. M. Lill, U. Lindenberg, T. Lumley, R. Magi, P. Marques-Vidal, S. E. Medland, L. Milani, R. Nagy, W. E. R. Ollier, P. A. Peyser, P. P. Pramstaller, P. M. Ridker, F. Rivadeneira, D. Ruggiero, Y. Saba, R. Schmidt, H. Schmidt, P. E. Slagboom, B. H. Smith, J. A. Smith, N. Sotoodehnia, E. Steinhagen-Thiessen, F. J. A. van Rooij, A. L. Verbeek, S. H. Vermeulen, P. Vollenweider, Y. Wang, T. Werge, J. B. Whitfield, A. B. Zonderman, T. Lehtimaki, M. K. Evans, M. Pirastu, C. Fuchsberger, L. Bertram, N. Pendleton, S. L. R. Kardia, M. Ciullo, D. M. Becker, A. Wong, B. M. Psaty, C. M. van Duijn, J. G. Wilson, J. W. Jukema, L. Kiemeny, A. G. Uitterlinden, N. Franceschini, K. E. North, D. R. Weir, A. Metspalu, D. I. Boomsma, C. Hayward, D. Chasman, N. G. Martin, N. Sattar, H. Campbell, T. Esko, Z. Kutalik and J. F. Wilson (2017). "Genome-wide meta-analysis associates HLA-DQA1/DRB1 and LPA and lifestyle factors with human longevity." Nat Commun **8**(1): 910.
- Jougasaki, M., T. Ichiki, Y. Takenoshita and M. Setoguchi (2010). "Statins suppress interleukin-6-induced monocyte chemo-attractant protein-1 by inhibiting Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathways in human vascular endothelial cells." Br J Pharmacol **159**(6): 1294-1303.
- Jung, T., N. Bader and T. Grune (2007). "Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences." Ann N Y Acad Sci **1119**: 97-111.
- Kagami, S., T. Owada, H. Kanari, Y. Saito, A. Suto, K. Ikeda, K. Hirose, N. Watanabe, I. Iwamoto and H. Nakajima (2009). "Protein geranylgeranylation regulates the balance between Th17 cells and Foxp3+ regulatory T cells." Int Immunol **21**(6): 679-689.
- Kaji, H., J. Kamiie, H. Kawakami, K. Kido, Y. Yamauchi, T. Shinkawa, M. Taoka, N. Takahashi and T. Isobe (2007). "Proteomics reveals N-linked glycoprotein

- diversity in *Caenorhabditis elegans* and suggests an atypical translocation mechanism for integral membrane proteins." Mol Cell Proteomics **6**(12): 2100-2109.
- Kalathur, R., A. Kamesh and M. E. Futschik (2012). "The Unfolded Protein Response and its potential role in Huntington's disease." Nature Precedings **10**.
- Kalathur, R. K., J. Giner-Lamia, S. Machado, T. Barata, K. R. Ayasolla and M. E. Futschik (2015). "The unfolded protein response and its potential role in Huntington's disease elucidated by a systems biology approach." F1000Res **4**: 103.
- Kamath, R. S., M. Martinez-Campos, P. Zipperlen, A. G. Fraser and J. Ahringer (2001). "Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Genome Biol **2**(1): Research0002.
- Kenyon, C., J. Chang, E. Gensch, A. Rudner and R. Tabtiang (1993). "A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type." Nature **366**(6454): 461-464.
- Kenyon, C. J. (2010). "The genetics of ageing." Nature **464**(7288): 504-512.
- Kim, Y. C., K. K. Kim and E. M. Shevach (2010). "Simvastatin induces Foxp3+ T regulatory cells by modulation of transforming growth factor-beta signal transduction." Immunology **130**(4): 484-493.
- Kimble, J. and S. Ward (1988). Germ-line development and fertilization, pp. 191–213 in *The Nematode Caenorhabditis elegans*, edited by Wood WB, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- Klass, M., B. Dow and M. Herndon (1982). "Cell-specific transcriptional regulation of the major sperm protein in *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **93**(1): 152-164.
- Klass, M. R. (1977). "Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span." Mech Ageing Dev **6**(6): 413-429.
- Kok, S. H., L. D. Lin, K. L. Hou, C. Y. Hong, C. C. Chang, M. Hsiao, J. H. Wang, E. H. Lai and S. K. Lin (2013). "Simvastatin inhibits cysteine-rich protein 61 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the regulation of sirtuin-1/FoxO3a signaling." Arthritis Rheum **65**(3): 639-649.
- Korani, S., S. Bahrami, M. Korani, M. Banach, T. P. Johnston and A. Sahebkar (2019). "Parenteral systems for statin delivery: a review." Lipids Health Dis **18**(1): 193.
- Kumar, A., N. Sharma, J. Mishra and H. Kalonia (2013). "Synergistical neuroprotection of rofecoxib and statins against malonic acid induced Huntington's disease like symptoms and related cognitive dysfunction in rats." Eur J Pharmacol **709**(1-3): 1-12.

- Kuningas, M., R. Magi, R. G. Westendorp, P. E. Slagboom, M. Remm and D. van Heemst (2007). "Haplotypes in the human Foxo1a and Foxo3a genes; impact on disease and mortality at old age." Eur J Hum Genet **15**(3): 294-301.
- L'Hernault, S. W. (2006). "Spermatogenesis." WormBook: 1-14.
- Lakowski, B. and S. Hekimi (1998). "The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 13091-13096.
- Laufs, U., H. Kilter, C. Konkol, S. Wassmann, M. Bohm and G. Nickenig (2002). "Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart." Cardiovasc Res **53**(4): 911-920.
- Leung, B., G. J. Hermann and J. R. Priess (1999). "Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* intestine." Dev Biol **216**(1): 114-134.
- Liao, J. K. (2004). "Statin therapy for cardiac hypertrophy and heart failure." J Investig Med **52**(4): 248-253.
- Liao, J. K. and U. Laufs (2005). "Pleiotropic effects of statins." Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **45**: 89-118.
- Lin, K., J. B. Dorman, A. Rodan and C. Kenyon (1997). "daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*." Science **278**(5341): 1319-1322.
- Lints, R. and D. Hall (2009). "Reproductive system, germ line." WormAtlas doi:10.3908/wormatlas.1.23 **10**.
- Liscum, L., R. D. Cummings, R. G. Anderson, G. N. DeMartino, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1983). "3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase: a transmembrane glycoprotein of the endoplasmic reticulum with N-linked "high-mannose" oligosaccharides." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(23): 7165-7169.
- Lopez-Otin, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano and G. Kroemer (2013). "The hallmarks of aging." Cell **153**(6): 1194-1217.
- Malhotra, P., R. K. Gill, P. K. Dudeja and W. A. Alrefai (2016). Diabetes Mellitus and Intestinal Niemann-Pick C1-Like 1 Gene Expression. Molecular Nutrition and Diabetes, Elsevier: 277-290.
- Manu, P. and L. Rogozea (2016). "The Discovery of Statins." Am J Ther **23**(4): e980-981.
- Maroo, B. P., C. J. Lavie and R. V. Milani (2008). "Secondary prevention of coronary heart disease in elderly patients following myocardial infarction: are all HMG-CoA reductase inhibitors alike?" Drugs Aging **25**(8): 649-664.
- Masana, L., J. Girona, D. Ibarretxe, R. Rodriguez-Calvo, R. Rosales, J. C. Vallve, C. Rodriguez-Borjabad, M. Guardiola, M. Rodriguez, S. Guaita-Esteruelas, I. Oliva, N. Martinez-Micaelo, M. Heras, R. Ferre, J. Ribalta and N. Plana (2018).

"Clinical and pathophysiological evidence supporting the safety of extremely low LDL levels-The zero-LDL hypothesis." J Clin Lipidol **12**(2): 292-299.e293.

Masoro, E. J. (2006). "Role of hormesis in life extension by caloric restriction." Dose Response **5**(2): 163-173.

Masse, I., L. Molin, L. Mouchiroud, P. Vanhems, F. Palladino, M. Billaud and F. Solari (2008). "A novel role for the SMG-1 kinase in lifespan and oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans*." PLoS One **3**(10): e3354.

Mattson, M. P. (2008). "Hormesis defined." Ageing Res Rev **7**(1): 1-7.

Minniti, A. N., R. Cataldo, C. Trigo, L. Vasquez, P. Mujica, F. Leighton, N. C. Inestrosa and R. Aldunate (2009). "Methionine sulfoxide reductase A expression is regulated by the DAF-16/FOXO pathway in *Caenorhabditis elegans*." Aging Cell **8**(6): 690-705.

Miziorko, H. M. (2011). "Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis." Arch Biochem Biophys **505**(2): 131-143.

Moosmann, B. and C. Behl (2004). "Selenoprotein synthesis and side-effects of statins." Lancet **363**(9412): 892-894.

Mörck, C., L. Olsen, C. Kurth, A. Persson, N. J. Storm, E. Svensson, J.-O. Jansson, M. Hellqvist, A. Enejder and N. J. Faergeman (2009). "Statins inhibit protein lipidation and induce the unfolded protein response in the non-sterol producing nematode *Caenorhabditis elegans*." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(43): 18285-18290.

Morley, J. F., H. R. Brignull, J. J. Weyers and R. I. Morimoto (2002). "The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10417-10422.

Mulcahy, B., L. Holden-Dye and V. O'Connor (2013). "Pharmacological assays reveal age-related changes in synaptic transmission at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction that are modified by reduced insulin signalling." J Exp Biol **216**(Pt 3): 492-501.

Murphy, C. T. and P. J. Hu (2013). "Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*." WormBook: 1-43.

Murphy, C. T., S. A. McCarroll, C. I. Bargmann, A. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer, H. Li and C. Kenyon (2003). "Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*." Nature **424**(6946): 277-283.

Narasimhan, S. D., K. Yen, A. Bansal, E. S. Kwon, S. Padmanabhan and H. A. Tissenbaum (2011). "PDP-1 links the TGF-beta and IIS pathways to regulate longevity, development, and metabolism." PLoS Genet **7**(4): e1001377.

- Nussbaum-Krammer, C. I., M. F. Neto, R. M. Brielmann, J. S. Pedersen and R. I. Morimoto (2015). "Investigating the spreading and toxicity of prion-like proteins using the metazoan model organism *C. elegans*." J Vis Exp(95): 52321.
- Oakeshott, J. G., C. Claudianos, R. J. Russell and G. C. Robin (1999). "Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family." Bioessays **21**(12): 1031-1042.
- Oesterle, A., U. Laufs and J. K. Liao (2017). "Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System." Circ Res **120**(1): 229-243.
- Oesterle, A. and J. K. Liao (2019). "The Pleiotropic Effects of Statins - From Coronary Artery Disease and Stroke to Atrial Fibrillation and Ventricular Tachyarrhythmia." Curr Vasc Pharmacol **17**(3): 222-232.
- Ogg, S., S. Paradis, S. Gottlieb, G. I. Patterson, L. Lee, H. A. Tissenbaum and G. Ruvkun (1997). "The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*." Nature **389**(6654): 994-999.
- Oh, S. W., A. Mukhopadhyay, N. Svrzikapa, F. Jiang, R. J. Davis and H. A. Tissenbaum (2005). "JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(12): 4494-4499.
- Oks, O., S. Lewin, I. L. Goncalves and A. Sapir (2018). "The UPR(mt) Protects *Caenorhabditis elegans* from Mitochondrial Dysfunction by Upregulating Specific Enzymes of the Mevalonate Pathway." Genetics **209**(2): 457-473.
- Orr, H. T. and H. Y. Zoghbi (2007). "Trinucleotide repeat disorders." Annu. Rev. Neurosci. **30**: 575-621.
- Papp, L. V., J. Lu, A. Holmgren and K. K. Khanna (2007). "From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health." Antioxid Redox Signal **9**(7): 775-806.
- Patel, M., A. Tekade, S. Gattani and S. Surana (2008). "Solubility enhancement of lovastatin by modified locust bean gum using solid dispersion techniques." AAPS PharmSciTech **9**(4): 1262-1269.
- Pignatelli, P., R. Carnevale, D. Pastori, R. Cangemi, L. Napoleone, S. Bartimoccia, C. Nocella, S. Basili and F. Violi (2012). "Immediate antioxidant and antiplatelet effect of atorvastatin via inhibition of Nox2." Circulation **126**(1): 92-103.
- Pilon, M. (2014). "Developmental genetics of the *Caenorhabditis elegans* pharynx." Wiley Interdiscip Rev Dev Biol **3**(4): 263-280.
- Pinzon, N., S. Bertrand, L. Subirana, I. Busseau, H. Escriva and H. Seitz (2019). "Functional lability of RNA-dependent RNA polymerases in animals." PLoS Genet **15**(2): e1007915.

- Piper, M. D. and A. Bartke (2008). "Diet and aging." Cell Metab **8**(2): 99-104.
- Rafieian-Kopaei, M., M. Setorki, M. Douidi, A. Baradaran and H. Nasri (2014). "Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes." Int J Prev Med **5**(8): 927-946.
- Ranji, P., M. Rauthan, C. Pitot and M. Pilon (2014). "Loss of HMG-CoA reductase in *C. elegans* causes defects in protein prenylation and muscle mitochondria." PLoS One **9**(2): e100033.
- Rauthan, M. and M. Pilon (2011). "The mevalonate pathway in *C. elegans*." Lipids in health and disease **10**(1): 243.
- Rauthan, M., P. Ranji, N. Aguilera Pradenas, C. Pitot and M. Pilon (2013). "The mitochondrial unfolded protein response activator ATFS-1 protects cells from inhibition of the mevalonate pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(15): 5981-5986.
- Rezaie-Majd, A., T. Maca, R. A. Bucek, P. Valent, M. R. Muller, P. Husslein, A. Kashanipour, E. Minar and M. Baghestanian (2002). "Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(7): 1194-1199.
- Ristow, M. and K. Schmeisser (2014). "Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS)." Dose Response **12**(2): 288-341.
- Roitelman, J., E. H. Olender, S. Bar-Nun, W. A. Dunn, Jr. and R. D. Simoni (1992). "Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **117**(5): 959-973.
- Roy, A. and K. Pahan (2011). "Prospects of statins in Parkinson disease." Neuroscientist **17**(3): 244-255.
- Ruijter, J., S. Van Der Velden and A. Ilgun (2009). "LinRegPCR: Analysis of quantitative RT-PCR data [computer program]. Version 11.0." Amsterdam, the Netherlands: Heart Failure Research Center, Academic Medical Centre.
- Saraswathy, N. and P. Ramalingam (2011). 16 - Glycoproteomics. Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics. N. Saraswathy and P. Ramalingam, Woodhead Publishing: 213-218.
- Scaffidi, P. and T. Misteli (2008). "Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing." Nat Cell Biol **10**(4): 452-459.
- Schachter, M. (2005). "Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update." Fundam Clin Pharmacol **19**(1): 117-125.

- Schiavi, A., A. Torgovnick, A. Kell, E. Megalou, N. Castelein, I. Guccini, L. Marzocchella, S. Gelino, M. Hansen, F. Malisan, I. Condò, R. Bei, S. L. Rea, B. P. Braeckman, N. Tavernarakis, R. Testi and N. Ventura (2013). "Autophagy induction extends lifespan and reduces lipid content in response to frataxin silencing in *C. elegans*." Exp Gerontol **48**(2): 191-201.
- Schirris, T. J., G. H. Renkema, T. Ritschel, N. C. Voermans, A. Bilos, B. G. van Engelen, U. Brandt, W. J. Koopman, J. D. Beyrath, R. J. Rodenburg, P. H. Willems, J. A. Smeitink and F. G. Russel (2015). "Statin-Induced Myopathy Is Associated with Mitochondrial Complex III Inhibition." Cell Metab **22**(3): 399-407.
- Schultz, J. L., P. C. Nopoulos, A. Killoran and J. A. Kamholz (2019). "Statin use and delayed onset of Huntington's disease." Mov Disord **34**(2): 281-285.
- Schumacher, M. M., R. Elsbroudy, J. Seemann, Y. Jo and R. A. DeBose-Boyd (2015). "The prenyltransferase UBIAD1 is the target of geranylgeraniol in degradation of HMG CoA reductase." Elife **4**.
- Schwabe, U., D. Paffrath, W.-D. Ludwig and J. Klauber (2018). Arzneiverordnungs-report 2018, Springer.
- Shacham, T., N. Sharma and G. Z. Lederkremer (2019). "Protein Misfolding and ER Stress in Huntington's Disease." Front Mol Biosci **6**: 20.
- Shen, X., R. E. Ellis, K. Lee, C.-Y. Liu, K. Yang, A. Solomon, H. Yoshida, R. Morimoto, D. M. Kurnit and K. Mori (2001). "Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development." Cell **107**(7): 893-903.
- Shi, Z. and G. Ruvkun (2012). "The mevalonate pathway regulates microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(12): 4568-4573.
- Sin, O., H. Michels and E. A. Nollen (2014). "Genetic screens in *Caenorhabditis elegans* models for neurodegenerative diseases." Biochim Biophys Acta **1842**(10): 1951-1959.
- Smolentseva, O., I. Gusarov, L. Gautier, I. Shamovsky, A. S. DeFrancesco, R. Losick and E. Nudler (2017). "Mechanism of biofilm-mediated stress resistance and lifespan extension in *C. elegans*." Sci Rep **7**(1): 7137.
- Solinas, G. and B. Becattini (2017). "JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response." Mol Metab **6**(2): 174-184.
- Son, H. G., O. Altintas, E. J. E. Kim, S. Kwon and S. V. Lee (2019). "Age-dependent changes and biomarkers of aging in *Caenorhabditis elegans*." Aging Cell **18**(2): e12853.
- Song, S., W. Cong, S. Zhou, Y. Shi, W. Dai, H. Zhang, X. Wang, B. He and Q. Zhang (2019). "Small GTPases: Structure, biological function and its interaction with nanoparticles." Asian J Pharm Sci **14**(1): 30-39.

- Spindler, S. R., R. Li, J. M. Dhahbi, A. Yamakawa, P. Mote, R. Bodmer, K. Ocorr, R. T. Williams, Y. Wang and K. P. Ablao (2012). "Statin treatment increases lifespan and improves cardiac health in *Drosophila* by decreasing specific protein prenylation." *PLoS One* **7**(6): e39581.
- Stancu, C. and A. Sima (2001). "Statins: mechanism of action and effects." *J Cell Mol Med* **5**(4): 378-387.
- Stein, P., P. Svoboda, M. Anger and R. M. Schultz (2003). "RNAi: mammalian oocytes do it without RNA-dependent RNA polymerase." *Rna* **9**(2): 187-192.
- Stroustrup, N., B. E. Ulmschneider, Z. M. Nash, I. F. Lopez-Moyado, J. Apfeld and W. Fontana (2013). "The *Caenorhabditis elegans* Lifespan Machine." *Nat Methods* **10**(7): 665-670.
- Sulston, J. E. and S. Brenner (1974). "The DNA of *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* **77**(1): 95-104.
- Taha, D. A., C. H. De Moor, D. A. Barrett, J. B. Lee, R. D. Gandhi, C. W. Hoo and P. Gershkovich (2016). "The role of acid-base imbalance in statin-induced myotoxicity." *Transl Res* **174**: 140-160.e114.
- Taormina, G., F. Ferrante, S. Vieni, N. Grassi, A. Russo and M. G. Mirisola (2019). "Longevity: Lesson from Model Organisms." *Genes (Basel)* **10**(7).
- Taskov, K., C. Chapple, G. V. Kryukov, S. Castellano, A. V. Lobanov, K. V. Korotkov, R. Guigo and V. N. Gladyshev (2005). "Nematode selenoproteome: the use of the selenocysteine insertion system to decode one codon in an animal genome?" *Nucleic Acids Res* **33**(7): 2227-2238.
- Tischler, J., B. Lehner, N. Chen and A. G. Fraser (2006). "Combinatorial RNA interference in *Caenorhabditis elegans* reveals that redundancy between gene duplicates can be maintained for more than 80 million years of evolution." *Genome Biol* **7**(8): R69.
- Tobert, J. A., G. Hitzenberger, W. R. Kukovetz, I. B. Holmes and K. H. Jones (1982). "Rapid and substantial lowering of human serum cholesterol by mevinnolin (MK-803), an inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase." *Atherosclerosis* **41**(1): 61-65.
- Torgovnick, A., A. Schiavi, S. Maglioni and N. Ventura (2013). "Healthy aging: what can we learn from *Caenorhabditis elegans*?" *Z Gerontol Geriatr* **46**(7): 623-628.
- Toth, P. P. and M. Banach (2019). "Statins: Then and Now." *Methodist Debakey Cardiovasc J* **15**(1): 23-31.
- Tousoulis, D., C. Psarros, M. Demosthenous, R. Patel, C. Antoniadis and C. Stefanadis (2014). "Innate and adaptive inflammation as a therapeutic target in

- vascular disease: the emerging role of statins." J Am Coll Cardiol **63**(23): 2491-2502.
- Trifunovic, A. and N. Ventura (2014). "Mitochondria and metabolic control of the aging process." Exp Gerontol **56**: 1-2.
- Troemel, E. R., M. A. Felix, N. K. Whiteman, A. Barriere and F. M. Ausubel (2008). "Microsporidia are natural intracellular parasites of the nematode *Caenorhabditis elegans*." PLoS Biol **6**(12): 2736-2752.
- Tullet, J. M. (2015). "DAF-16 target identification in *C. elegans*: past, present and future." Biogerontology **16**(2): 221-234.
- Turner, B. J., C. S. Hollenbeak, M. Weiner and S. S. Tang (2011). "A retrospective cohort study of the potency of lipid-lowering therapy and race-gender differences in LDL cholesterol control." BMC Cardiovasc Disord **11**: 58.
- Ulrich, P. and A. Cerami (2001). "Protein glycation, diabetes, and aging." Recent Prog Horm Res **56**: 1-21.
- Uno, M. and E. Nishida (2016). "Lifespan-regulating genes in *C. elegans*." NPJ Aging Mech Dis **2**: 16010.
- van Heemst, D. (2010). "Insulin, IGF-1 and longevity." Aging Dis **1**(2): 147-157.
- Varela, I., S. Pereira, A. P. Ugalde, C. L. Navarro, M. F. Suarez, P. Cau, J. Cadinanos, F. G. Osorio, N. Foray, J. Cobo, F. de Carlos, N. Levy, J. M. Freije and C. Lopez-Otin (2008). "Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging." Nat Med **14**(7): 767-772.
- White, J. (1988). The anatomy. In "The Nematode *Caenorhabditis elegans*" (WB Wood, Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson and S. Brenner (1986). "The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **314**(1165): 1-340.
- Willcox, B. J., G. J. Tranah, R. Chen, B. J. Morris, K. H. Masaki, Q. He, D. C. Willcox, R. C. Allsopp, S. Moisyadi, L. W. Poon, B. Rodriguez, A. B. Newman, T. B. Harris, S. R. Cummings, Y. Liu, N. Parimi, D. S. Evans, P. Davy, M. Gerschenson and T. A. Donlon (2016). "The FoxO3 gene and cause-specific mortality." Aging Cell **15**(4): 617-624.
- Wolf, M., F. Nunes, A. Henkel, A. Heinick and R. J. Paul (2008). "The MAP kinase JNK-1 of *Caenorhabditis elegans*: location, activation, and influences over temperature-dependent insulin-like signaling, stress responses, and fitness." J Cell Physiol **214**(3): 721-729.

Zhang, B., R. Xiao, E. A. Ronan, Y. He, A. L. Hsu, J. Liu and X. Z. Xu (2015). "Environmental Temperature Differentially Modulates *C. elegans* Longevity through a Thermosensitive TRP Channel." Cell Rep **11**(9): 1414-1424.

Zhang, Y. and W. B. Mair (2017). Dietary Restriction in *C. elegans*. in Ageing: Lessons from *C. elegans*. Healthy Ageing and Longevity., A. Olsen and M. Gill, Editors., Springer, Cham.

Zheng, S., H. Chiu, J. Boudreau, T. Papanicolaou, W. Bendena and I. Chin-Sang (2018). "A functional study of all 40 *Caenorhabditis elegans* insulin-like peptides." J Biol Chem **293**(43): 16912-16922.

Zhou, Q. and J. K. Liao (2010). "Pleiotropic effects of statins." Circulation Journal **74**(5): 818-826.

Zullo, J. M., D. Drake, L. Aron, P. O'Hern, S. C. Dhamne, N. Davidsohn, C. A. Mao, W. H. Klein, A. Rotenberg, D. A. Bennett, G. M. Church, M. P. Colaiacovo and B. A. Yankner (2019). "Regulation of lifespan by neural excitation and REST." Nature **574**(7778): 359-364.

8 Anhang

8.1 weitere Abbildungen

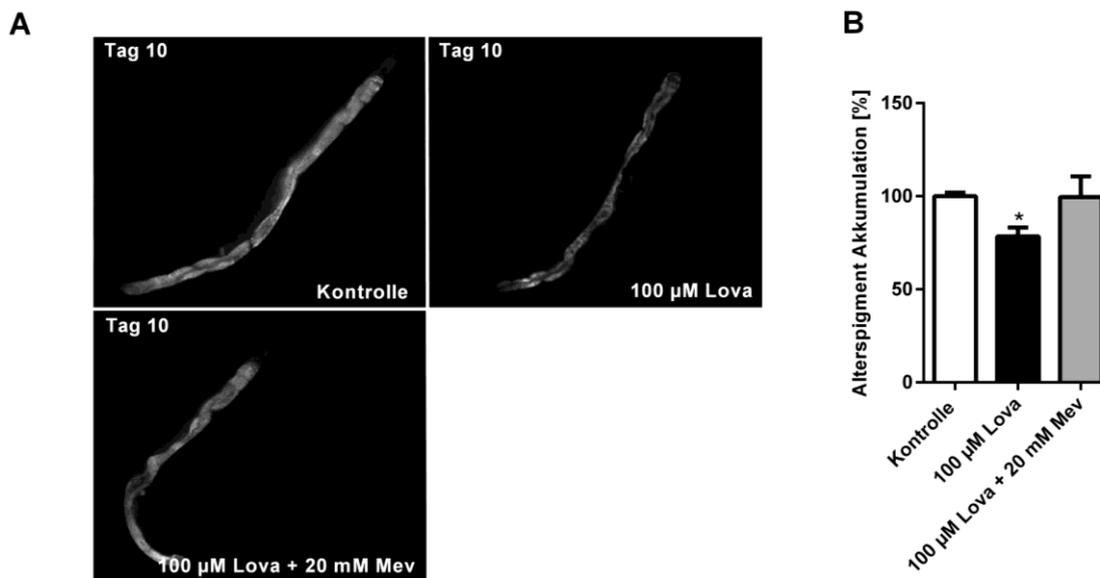


Abbildung 28: Akkumulation des Alterspigments nach Lovastatin-Behandlung und zusätzlicher Mevalonat Supplementation.

(A) Übersichtsaufnahmen der Akkumulation des Alterspigments an Tag 10 der adulten Lebensphase nach Behandlung mit 100 µM Lovastatin. Es war eine Reduktion der Akkumulation des Alterspigments durch Lovastatin erkennbar. Diese Reduktion wurde durch die zusätzliche Supplementation mit 20 mM Mevalonat wieder aufgehoben **(B)** Quantifizierung der Akkumulation des Alterspigments nach Behandlung mit 100 µM Lovastatin und zusätzlicher Supplementation mit 20 mM Mevalonat. Wildtypische und Alters-synchrone L4 Larven wurden bei 20°C in S-Medium_K mit 0,2 % DMSO (Kontrolle), 100 µM Lovastatin oder 100 µM Lovastatin und 20 mM Mevalonat behandelt und an Tag 10 der adulten Lebensphase wurde die Akkumulation des autofluoreszenten Alterspigments bestimmt (Extinktion: 360-370 nm; Emission: 420-460 nm). Gezeigt ist die relative Akkumulation bezogen auf die Kontrolle (100 %) aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert ± SD, n=3, N ≥ 45). Durch die Behandlung mit 100 µM Lovastatin reduzierte sich die Akkumulation des Alterspigments um ca 22 %. Durch die zusätzliche Supplementation mit 20 mM Mevalonat wurde diese Reduktion wieder aufgehoben. Statistischer Test: One-Way ANOVA, *p ≤ 0,05 vs. Kontrolle (0,2 % DMSO). Dieses Experiment wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit von Bo Scherer^{2(S. 41)} durchgeführt.

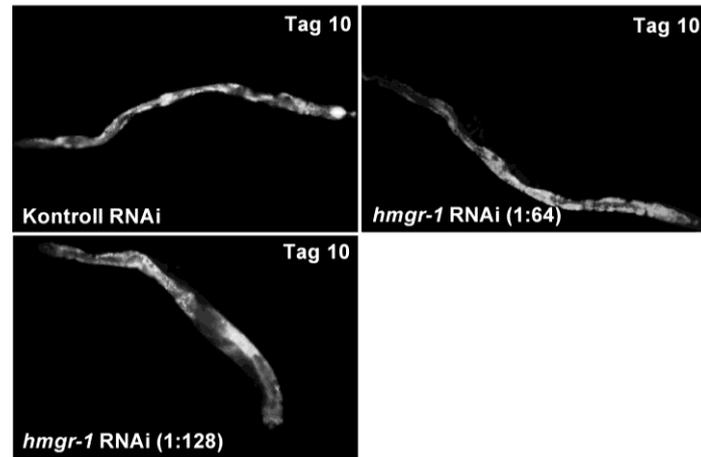


Abbildung 29: Akkumulation des Alterspigments nach Inkubation auf stark verdünnten *hmgr-1* dsRNA produzierenden Bakterien.

Übersichtsaufnahmen der Akkumulation des Alterspigments an Tag 10 der adulten Lebensphase nach Inkubation auf 1:64 oder 1:128 stark verdünnten *hmgr-1* dsRNA produzierenden Bakterien. Zwischen Kontrolle und *hmgr-1* Knockdown war kein Unterschied in der Akkumulation des Alterspigments erkennbar.

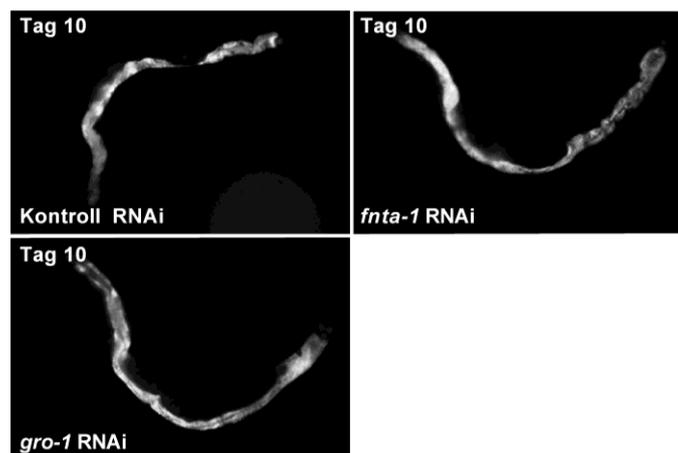


Abbildung 30: Akkumulation des Alterspigments nach Knockdown von *fnta-1* oder *gro-1*.

Übersichtsaufnahmen der Akkumulation des Alterspigments an Tag 10 der adulten Lebensphase nach Knockdown mittels RNAi von *fnta-1* oder *gro-1*. In beiden Fällen war kein Unterschied zur Kontroll RNAi erkennbar.

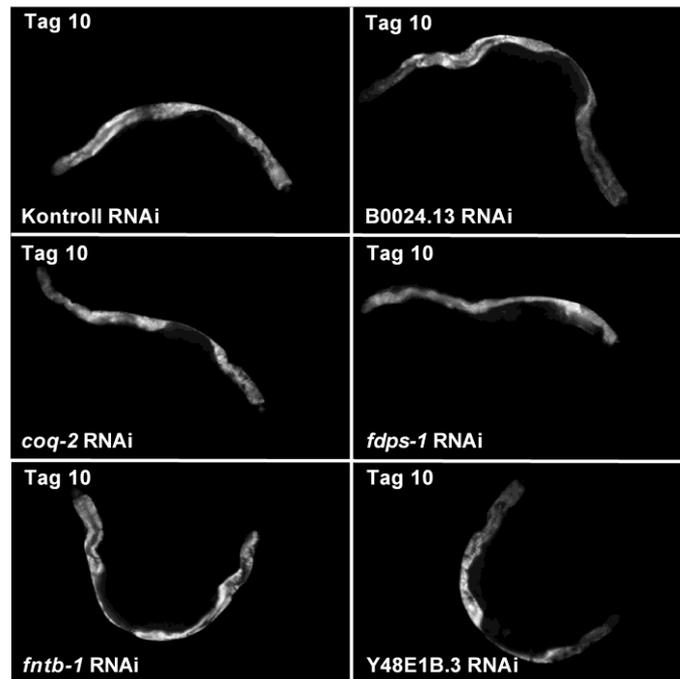


Abbildung 31: Akkumulation des Alterspigments nach *Knockdown* von B0024.13, *coq-2*, *fdps-1*, *fntb-1* oder Y48E1B.3.

Übersichtsaufnahmen der Akkumulation des Alterspigments an Tag 10 der adulten Lebensphase nach *Knockdown* mittels RNAi von B0024.13, *coq-2*, *fdps-1*, *fntb-1* oder Y48E1B.3. In allen Fällen war kein Unterschied zur Kontroll RNAi erkennbar.

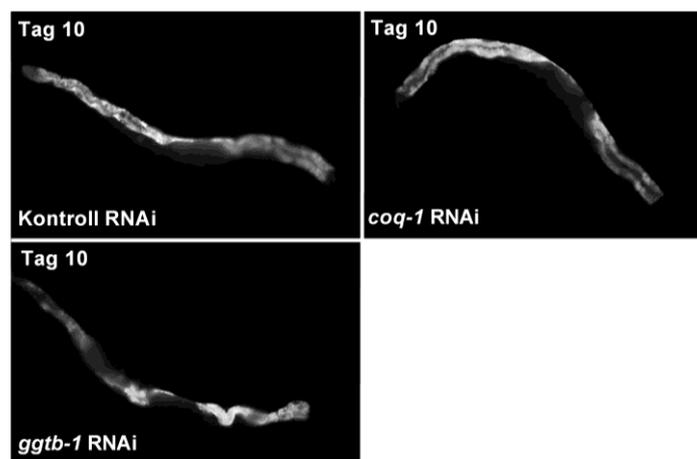


Abbildung 32: Akkumulation des Alterspigments nach *Knockdown* von *coq-1* oder *ggfb-1*.

Übersichtsaufnahmen der Akkumulation des Alterspigments an Tag 10 der adulten Lebensphase nach *Knockdown* mittels RNAi von *coq-1* oder *ggfb-1*. In beiden Fällen war kein Unterschied zur Kontroll RNAi erkennbar.

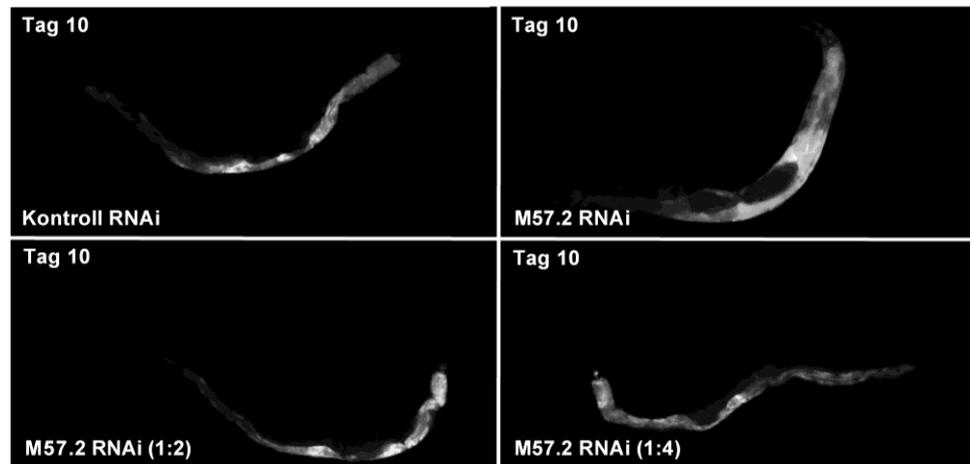


Abbildung 33: Akkumulation des Alterspigments nach Inkubation auf unverdünnten bzw. leicht verdünnten M57.2 dsRNA produzierenden Bakterien.

Übersichtsaufnahmen der Akkumulation des Alterspigments an Tag 10 der adulten Lebensphase nach Inkubation auf unverdünnten, 1:2 oder 1:4 verdünnten M57.2 dsRNA produzierenden Bakterien. Es war kein Unterschied in der Akkumulation des Alterspigments im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

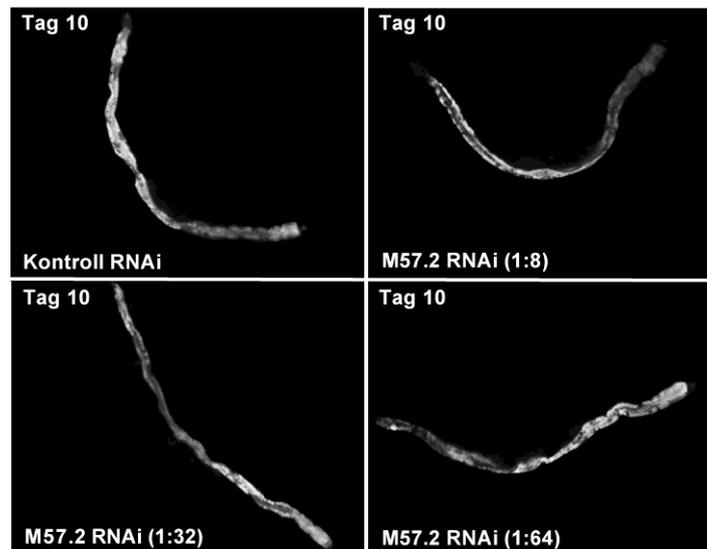


Abbildung 34: Akkumulation des Alterspigments nach Inkubation auf stark verdünnten M57.2 dsRNA produzierenden Bakterien.

Übersichtsaufnahmen der Akkumulation des Alterspigments an Tag 10 der adulten Lebensphase nach Inkubation auf 1:8, 1:32 oder 1:64 verdünnten M57.2 dsRNA produzierenden Bakterien. Es war kein Unterschied in der Akkumulation des Alterspigments im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

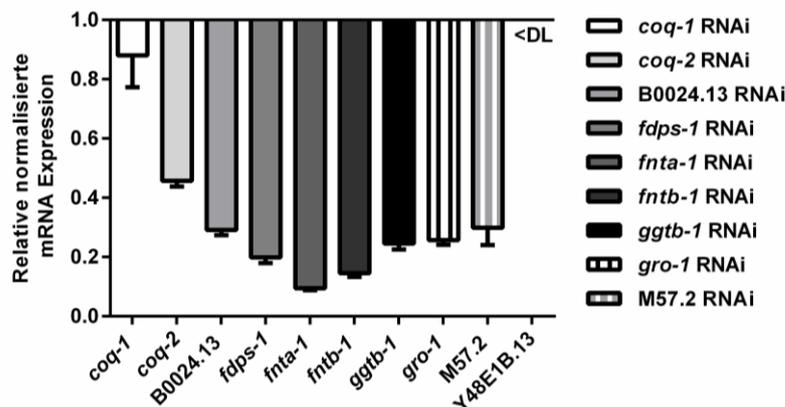


Abbildung 35: Knockdown Effizienz der eingesetzten siRNAs.

Dargestellt ist die mRNA Expression des jeweiligen Gens nach *Knockdown* mit der entsprechenden siRNA nach 24 Stunden (Mittelwert \pm SEM, $n=1$, drei technische Replikate). Bei 8 von 10 Genen war die Expression um mindestens 50 % reduziert im Vergleich zur Kontrolle. Lediglich die *Knockdown* Effizienz von *coq-1* war mit ca 10 % deutlich zu niedrig. Die mRNA Expression von Y48E1B.13 konnte nicht bestimmt werden, da die Expression unter dem Detektionslevel lag (<DL).

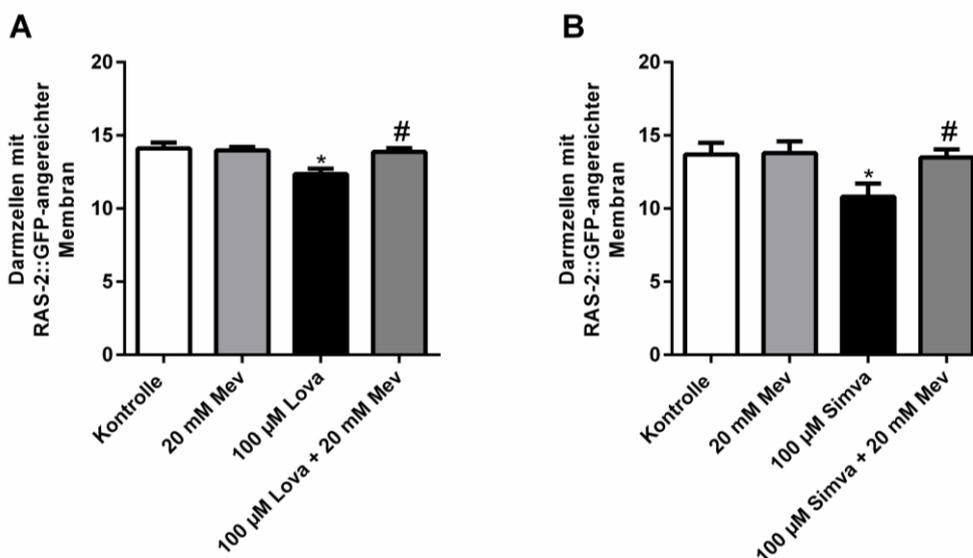


Abbildung 36: RAS-2::GFP Isoprenylierung nach Behandlung mit Simva- oder Lovastatin.

Dargestellt ist die mittlere Anzahl an Darmzellen, bei denen RAS-2::GFP an der Zellmembran angereichert ist, aus drei unabhängigen Durchführungen (Mittelwert \pm SD, $n=3$, $N \geq 40$). (**A und B**) Die Behandlung mit Lova- oder Simvastatin reduzierte die Anzahl an Darmzellen mit RAS-2::GFP angereicherter Zellmembran. Durch die zusätzliche Gabe von Mevalonat wurde dieser Effekt aufgehoben. Statistischer Test: One-Way ANOVA, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (0,2 % DMSO), # $p \leq 0,05$ vs. Lova- bzw. Simvastatin. Dieses Experiment wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit von Bo Scherer^{2(S. 41)} durchgeführt.

8.2 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert.

Jahn, A., B. Scherer, G. Fritz and S. Honnen (2020). "Statins Induce a DAF-16/Foxo-dependent Longevity Phenotype via JNK-1 through Mevalonate Depletion in *C. elegans*." *Aging Dis* 11(1): 60-72.

Auflistung des Eigenanteils an der Publikation mit dem Titel:

Jahn, A., B. Scherer, G. Fritz and S. Honnen (2020). "Statins Induce a DAF-16/Foxo-dependent Longevity Phenotype via JNK-1 through Mevalonate Depletion in *C. elegans*." *Aging Dis* 11(1): 60-72.

Verfassen der Einleitung, des Material- und Methodenteils, sowie Mitarbeit bei der Abfassung des Ergebnis- und Diskussionsteils. Durchführung sämtlicher Versuche, sowie Auswertung der Ergebnisse und Erstellung der Abbildungen.

Zusatzdaten (Supplementary Data): Durchführung der zu den Abbildungen (1-8, außer 5) und Tabellen (1-3) zugehörigen Versuche, sowie Auswertung aller Ergebnisse und Erstellung aller Abbildungen.

8.3 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei der Jürgen Manchot-Stiftung für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion bedanken.

Darüber hinaus gilt folgenden Personen mein besonderer Dank:

Prof. Dr. Gerhard Fritz für die Möglichkeit meine Arbeit am Institut für Toxikologie anfertigen zu dürfen sowie für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit und die Finanzierung meiner Promotion nach Ablauf meines Promotionsstipendiums.

Jun. -Prof. Dr. Mathias Beller für die Bereitschaft das Zweitgutachten meiner Doktorarbeit zu übernehmen.

Dr. Sebastian Honnen für die interessante Themenstellung und die gute Betreuung meiner Doktorarbeit.

Anna, Bo, Christian, Jana, Kathrin, Lea, Lena, Nicole, Nirina, Sarah, Vanessa, und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie.

Meiner Familie, meinen Freunden und Christina

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation, in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht wurde.

Ich habe keine vorherigen erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 22.06.2020

Andreas Jahn