

**Chronische Effekte von Nanopartikeln im  
Nematoden *Caenorhabditis elegans*:  
Alterungsprozesse, Neurodegeneration und  
Signalwege**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Annette Jadwiga Limke geb. Piechulek**  
aus Cieszyn

Düsseldorf, September 2020

aus dem IUF - Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung gGmbH  
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. rer. nat. Anna von Mikecz

2. Prof. Dr. rer. nat. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.2021

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	III
Summary .....	V
1 Einleitung .....	2
1.1 Synthetisch hergestellte Nanopartikel .....	2
1.1.1 Anwendung und Verteilung in der Umwelt .....	2
1.1.2 Risiken in der Umwelt und beim Menschen .....	3
1.2 <i>C. elegans</i> als Modellorganismus für die Untersuchung von Nano-Bio- Interaktionen .....	4
1.2.1 Einführung des Modellorganismus <i>C. elegans</i> ins Labor .....	6
1.2.2 Aufbau und Funktion des Darms.....	6
1.2.3 Kommunikation zwischen Darm und Nervensystem .....	8
1.2.4 Aufbau des Nervensystems .....	9
1.2.5 Verhaltensphänotypen .....	10
1.3 Alterungsprozesse und Neurodegeneration .....	12
1.3.1 Die Proteostase und die Entstehung von Proteinaggregaten .....	12
1.3.2 Alterungsprozesse in <i>C. elegans</i> .....	14
1.4 Der Insulin/ IGF-1 Rezeptor (DAF-2) Signalweg .....	15
2 Zielsetzung der Arbeit .....	17
3 Ergebnisse .....	19
3.1 Publikation 1: Life span-resolved nanotoxicology enables identification of age-associated neuromuscular vulnerabilities in the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	19

3.2	Publikation 2: Aging by pollutants: introducing the aging dose (AD) <sub>50</sub> .....	21
3.3	Publikation 3: Silica nanoparticles disrupt OPT-2/PEP-2- dependent trafficking of nutrient peptides in the intestinal epithelium .....	23
4	Diskussion.....	25
4.1	Würmer im mittleren Lebensalter sind besonders vulnerabel gegenüber einer Exposition mit Nano Silber oder Nano Silika und zeigen neuromuskuläre Defekte	26
4.2	Nano Silika unterbinden den Peptidtransport in Darmzellen und führen zu einer reduzierten Körperlänge.....	30
4.3	Beurteilung der verwendeten NP-Konzentrationen .....	35
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen.....	37
5	Ausblick.....	42
	Literaturverzeichnis .....	VI
	Abkürzungsverzeichnis.....	XVI
	Abbildungsverzeichnis.....	XX
	Tabellenverzeichnis.....	XX
	Danksagung .....	XXI
	Eidesstattliche Erklärung .....	XXII

## Zusammenfassung

Jährlich steigt die Produktion und Anwendung von Nanopartikeln in der Industrie und deren Einsatz in Verbraucherprodukten. Während des Gebrauchs und Entsorgung dieser Produkte gelangen Nanopartikel in die Umwelt und akkumulieren in Umweltsenken, wie im Boden oder Sedimenten. In der Nanotoxikologie werden überwiegend Aufnahmewege und akute Effekte von Nanopartikel thematisiert. Langzeitwirkungen, die sich erst im Alter zeigen, sind jedoch noch nicht ausreichend erforscht. Auf Grund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften können Nanopartikel vom Menschen über das olfaktorische System aufgenommen werden und bis ins Gehirn gelangen. Besonders kritisch werden Nanopartikel auch in Lebensmitteln gesehen, da sie in den Darm gelangen können. Studien geben Hinweise darauf, dass Umweltschadstoffe pathologische Prozesse im Darm und dem olfaktorischen System auslösen, Alterungsprozesse beschleunigen und zu einer Prädisposition von neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Parkinson Erkrankung, führen.

Um chronische Auswirkungen von Nanopartikeln zu untersuchen, wurde der Modellorganismus *Caenorhabditis (C.) elegans* mit Nanopartikeln über seine komplette Lebensspanne exponiert und auf verfrühte Alterungs- und neurodegenerative Prozesse hin untersucht.

Beobachtungen von Bewegungsphänotypen während der gesamten Lebensspanne zeigten, dass Nano Silber und Nano Silika verfrüht altersabhängige Beeinträchtigungen der Bewegung induzieren, die normalerweise in alternden Würmern auftreten. Würmer im mittleren Lebensalter zeigen neuromuskuläre Defekte, die mit einer axonalen Proteinaggregation und Neurodegeneration in den serotonergen, sensorischen ADF Neuronen korrelieren. Die ADF Neuronen scheinen gegenüber einer Exposition mit Nano Silber besonders vulnerabel zu sein, da in GABAergen Neuronen keine Neurodegeneration unter denselben Bedingungen beobachtet wurde.

Zusätzlich zur Neurodegeneration inhibiert Nano Silika die Verteilung von Oligopeptiden in einzelnen Darmzellen. Peptide werden über den OPT-2/ PEP-2 Transporter in die Darmzelle transportiert und akkumulieren dort in Vesikeln, welche über die Zeit wachsen. Die Peptidvesikel kolokalisieren nicht mit bekannten

Organellen, wie den Lysosomen-assoziierten Organellen und bilden sich unabhängig vom Insulin/ IGF-1 Rezeptor (DAF-2) Signalweg. *Daf-2 loss of function* Mutanten zeigten eine spezifische Anordnung der Peptidvesikel entlang der apikalen Membran von einzelnen Darmzellen. Der Verschluss von Peptiden in Vesikeln führt zu einer reduzierten Körperlänge von *C. elegans*, die der Körperlänge von *pep-2* Mutanten ähnelt. Diese Mutanten enthalten eine Mutation im OPT-2/ PEP-2, welche ebenso zu einer reduzierten Aufnahme von Peptiden führt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei den Nano Silika-induzierten Peptidvesikeln um neue Kompartimente von eingeschlossenen Di- und Tripeptiden handelt, welche die weitere Hydrolyse und den Peptidmetabolismus inhibieren.

Altersabhängige Beobachtungen in *C. elegans* zeigten, dass bestimmte Nanopartikel Alterungsphänotypen von einer Beeinträchtigung der Bewegung bis hin zu der Bildung von amyloiden Proteinaggregaten und Neurodegeneration induzieren. Die Beschleunigung von altersabhängigen Phänotypen wird durch die Alterungsdosis  $AD_{50}$  definiert.  $AD_{50}$  bestimmt die Konzentration einer Umweltnoxe, die signifikant verfrüht einen Alterungsphänotyp in 50% der exponierten Population induziert. Diese Messhilfe kann in verschiedenen Modellorganismen verwendet werden, um Effekte von Umweltnoxen, wie Nanopartikeln, im Alter besser zu verstehen.

## Summary

The production and usage of nanoparticles is increasing steadily leading to a distribution and an accumulation of nanoparticles in environmental sinks, such as in the soil and in sediments. In nanotoxicology, uptake routes and acute effects of nanoparticles are predominately addressed. There is a lack of studies focusing on nano-bio-interactions that indicate long-term effects. Due to their chemical and physical properties, nanoparticles can be taken up by the olfactory system in the nose and reach the brain. Another concerning uptake route of nanoparticles is through the gut. An increasing number of investigations provide evidences that environmental pollutants accelerate pathological processes in the gut and the olfactory system, as well as aging processes and lead to a predisposition of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease.

In order to investigate the chronic effects of nanoparticles, the model organism *Caenorhabditis (C.) elegans* was exposed to nanoparticles over its entire lifespan and premature aging and neurodegenerative processes were observed.

Observations of locomotion phenotypes throughout the entire life span showed that nano silver and nano silica accelerate age-related impairments of locomotion that normally occur in old worms. Middle-aged worms show neuromuscular defects that correlate with axonal protein aggregation and neurodegeneration in the serotonergic sensory neurons ADF. Since no neurodegeneration was observed in GABAergic neurons under the same conditions, the ADF neuron represents a vulnerable target to nano silver.

In addition to neurodegeneration, nano silica impairs the distribution of oligopeptides in single, intestinal cells. Dipeptides are taken up via the OPT-2/ PEP-2 transporter into the intestinal cell and accumulate in aberrant vesicles which grow over time. The peptide vesicles do not colocalize with known organelles such as gut granules and form independently of the insulin /IGF-1 receptor (DAF-2) signaling pathway. *Daf-2* loss of function mutants showed distinct vesicle patterns along the apical membrane of single intestinal cells. The inclusion of di- and tripeptides leads to a reduced body length of *C. elegans*, which resembles the body length of OPT-2/PEP-2 transporter deficient mutants. The results suggest that the nano silica-induced peptide vesicles

are new compartments of di- and tripeptides leading to the inhibition of hydrolysis and peptide metabolism.

Age-related toxicology in *C. elegans* showed that certain nanoparticles induce aging phenotypes from impaired locomotion to the formation of amyloid protein aggregates and neurodegeneration. In order to measure the acceleration of age-dependent phenotypes we defined the aging dose  $AD_{50}$ .  $AD_{50}$  determines the concentration of an environmental noxae that significantly accelerate an age-related defect in 50% of the exposed population. This measuring aid can be applied in various model organisms to better understand the effects of environmental noxae such as nanoparticles in aging.

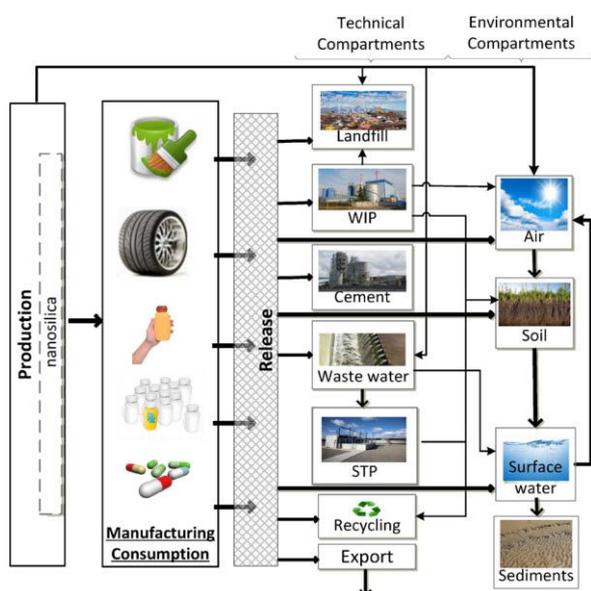
# 1 Einleitung

## 1.1 Synthetisch hergestellte Nanopartikel

### 1.1.1 Anwendung und Verteilung in der Umwelt

Synthetisch hergestellte Nanopartikel (NP) sind Partikel mit einem Durchmesser von 100 nm oder weniger (Oberdörster et al., 2005). Sie werden auf Grund ihrer einzigartigen, physikalischen und chemischen Eigenschaften vermehrt bei der Herstellung von Verbraucherprodukten verwendet. So finden sich NP beispielsweise in Kosmetik- und Haushaltsartikeln, in Kleidung, in Farben und Lacke, in Reifen oder Katalysatoren, und sogar als Additiv in Lebensmitteln und Medikamenten (Cassee et al., 2011; Piccinno et al., 2012; Hansen et al., 2016; <http://nanodb.dk>). Weltweit werden bis zu 10.000 t NP pro Jahr hergestellt, wobei  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$  und  $\text{SiO}_2$  NP am häufigsten produziert werden (Piccinno et al., 2012).

NP können über drei Emissionsszenarien in die Umwelt gelangen. Die Freisetzung kann (i) während der Produktion von NP und NP-enthaltenden Produkten erfolgen, (ii) während des Gebrauchs von Produkten und (iii) nach der Entsorgung von NP-enthaltenden Produkten. NP können direkt oder indirekt über so genannte technische Kompartimente, wie z.B. Abfallverbrennungsanlagen, Deponien oder Kläranlagen in alle Umweltkompartimente (Luft, Erde, Oberflächenwasser, Sediment) gelangen. In vielen Ländern wird Klärschlamm als Düngemittel verwendet, was zu einer direkten Exposition von Pflanzen und Bodenorganismen führt (Abb. 1; Wang et al., 2016).



**Abb. 1. Verteilung von Nanopartikel in der Umwelt am Beispiel von Nano Silika.**

Nano Silika wird in verschiedenen Verbraucherprodukten eingesetzt, wie z.B. in Farben und Reifen, als Additiv für Nahrungsergänzungsmittel oder Medikamente. Während der Produktion und des Gebrauchs der Produkte wird Nano Silika in verschiedene technische (Umwelt-) Kompartimente freigesetzt. Zu den technischen Kompartimenten zählen Deponien, Abfallverbrennungsanlagen, Zement und Kläranlagen. Ein Teil der Nanopartikel wird wiederum recycelt oder exportiert. In der Umwelt verteilen sich Nano Silika besonders in der Luft und im Oberflächenwasser und können im Boden sowie im Sediment akkumulieren (übernommen aus Wang et al., 2016)

Anhand von Material-Fluss-Analysen (MFA) wird der Lebenszyklus von NP modelliert, um Senken für NP in der Umwelt zu identifizieren und Konzentrationen abzuschätzen. In 2010 berechneten Keller et al. (2013) global 80.400 t NP im Boden, 29.200 t NP im Wasser, 4.800 t NP in der Luft bzw. Atmosphäre und 203.900 t NP in Deponien, wobei  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Fe und ZnO NP den höchsten Anteil ausmachen. Die Konzentrationen von Nano Ag in der Umwelt werden noch als relativ gering eingeschätzt. Hier beträgt die Konzentration im Sediment 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  und in Oberflächengewässern 1,5  $\text{ng}/\text{L}$  (Sun et al., 2016). Im Vergleich dazu sind die Konzentrationen von Nano Silika höher. Hier werden die Konzentrationen im Sediment mit einem jährlichen Anstieg von 6,7  $\text{mg}/\text{kg}$  modelliert. Felder mit Klärschlamm sind besonders stark belastet. Diese haben nach Wang et al. (2016) einen jährlichen Anstieg von 6300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Nano Silika.

### **1.1.2 Risiken in der Umwelt und beim Menschen**

NP können in der Umwelt akkumulieren und mit ihrer Umwelt interagieren. Die chemische Zusammensetzung ihrer Oberfläche beeinflusst die Interaktion mit anderen Molekülen, Proteinen und Membranen. Diese Interaktionen führen zu einer Bildung einer Proteinkorona, welche das toxische Potential von NP beeinflusst, indem sie die intrazelluläre Aufnahme begünstigen und schädliche Auswirkungen auf die Zellen haben können (Nel et al., 2009). Bestimmte NP, wie z.B. Nano Ag, sind anfällig für die Freisetzung von Ionen, welche wiederum toxisch für terrestrische Mikroorganismen sind (Doolette et al., 2016). Viele Studien zeigen zudem, dass die Translokation von NP in Pflanzen zu einem veränderten Metabolismus und einem reduzierten Wachstum führt (Thwala et al., 2016). Cao et al. (2017) haben festgestellt, dass Nano  $\text{CeO}_2$  bei einer Langzeitexposition die Photosyntheseleistung in Sojabohnen reduziert.

Mit der Translokation von NP in die Flora und Fauna gelangen sie somit auch in Kontakt mit den Menschen. Besonders kritisch wird die Translokation von NP im Gehirn angesehen. Maher et al., (2016) fanden magnetische NP zusammen mit Metall-NP im Gehirn. Durch Verbrennungsprozesse werden magnetische NP in die Luft freigesetzt. Eingeatmete NP können über die Lunge oder das olfaktorische System in das zentrale Nervensystem und somit ins Gehirn gelangen (Oberdörster et al., 2009). Zusätzlich können NP aus Lebensmitteln in den Magen-Darm-Trakt

gelangen und über den Blutkreislauf, den lymphatischen und den neuralen Transport in verschiedene Organe translozieren, wo sie mit dem umliegenden Gewebe interagieren und in Zellen akkumulieren können (Oberdörster et al., 2005; Bencsik et al., 2018).

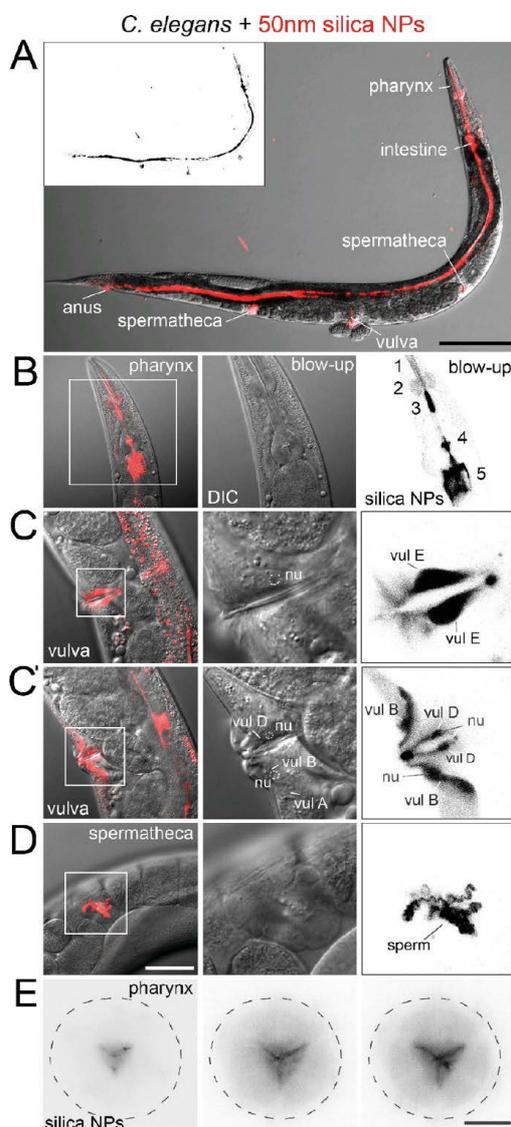
NP können beispielweise über Endocytose von Zellen aufgenommen werden (Canton und Battaglia, 2012; Zhang et al., 2015). Hemmerich und von Mikecz (2013) zeigten, dass Nano Polystyren und Nano Silika von humanen Epithelzellen einer Karzinomzelllinie (Hep-2-Zellen) innerhalb von Sekunden über einen Dynamin-abhängigen Transport aufgenommen werden. In lebenden Zellen verteilen sich NP im Cytoplasma oder translozieren über Diffusion oder aktiven Transport in den Zellkern (Hemmerich und von Mikecz, 2013). Dort angekommen führt Nano Silika zu einer abnormalen Umverteilung von Transkriptions- und Spleißfaktoren, sowie Komponenten aus der Proteinhomöostase bzw. der Proteostase, wie das 20S Proteasom in nuklearen Inklusionen. Diese Inklusionen ähneln den Inklusionen in neurodegenerativen Erkrankungen (Chen und von Mikecz, 2005).

Um die chronischen Effekte von NP im lebenden Organismus zu untersuchen, wurde der Modellorganismus *Caenorhabditis (C.) elegans* verwendet.

## **1.2 *C. elegans* als Modellorganismus für die Untersuchung von Nano-Bio-Interaktionen**

*C. elegans* ist ein 1 mm langer Nematode, der ubiquitär im fest-flüssigen Milieu des Bodens lebt, wo er sich von Bakterien auf verrottenden Pflanzenresten ernährt. In dieser mikrobenreichen Umwelt ist er Teil eines komplexen Interaktionsnetzwerks mit anderen Mikroben und Spezies. Diese können *C. elegans* als Nahrung oder Vektor dienen oder als Konkurrenten auftreten. Ebenso können Nematoden mit Fressfeinden, Pathogenen oder sogar Parasiten konfrontiert werden (Schulenburg und Félix, 2017). Durch die Interaktion mit anderen terrestrischen Bewohnern und als Teil der Nahrungskette ist *C. elegans* am ökologischen Gleichgewicht des Nährstoff- und Zersetzungskreislaufes beteiligt, was ihn als idealen Stressindikator für die Identifikation von Bodenkontaminationen und dem ökologischen Ungleichgewicht macht (Neher, 2001; Schulenburg und Félix, 2017).

Als Bewohner des terrestrischen Ökosystems kommt *C. elegans* mit NP in Kontakt, die z.B. über Kläranlagen in den Klärschlamm gelangen und auf Feldern verteilt werden (Wang et al., 2016). In *C. elegans* werden NP über zwei Haupttrouten aufgenommen. Über die Mundöffnung und dem sich anschließenden Pharynx werden NP zusammen mit Bakterien in den Darmtrakt weitergeleitet und über die Vulvaöffnung gelangen sie in den Reproduktionsapparat (Abb. 2). Die Translokation von Nano Silika in einzelnen Vulvazellen oder dem Pharynxgewebe korreliert mit einer Beeinträchtigung der jeweiligen Organfunktion (Pluskota et al., 2009; Scharf et al., 2013).



**Abb. 2** Aufnahmerouten von Nano Silika im Nematoden *C. elegans*.

Die Mikrographien zeigen 2-Tage alte, adulte *C. elegans* Hermaphroditen, die für 24 Stunden mit 2,5 mg/ mL Rhodamin-markierten Nano Silika (rot) behandelt wurden. (A) Mit Rhodamin-markierte 50 nm große Nano Silika werden vom Pharynx des Nematoden aufgenommen, in den Darmtrakt weitergeleitet und über den Anus ausgeschieden. Ein weiterer Aufnahmeweg ist über die Vulva in die Spermatheken. Die Vergrößerungen zeigen die Lokalisation der Nanopartikel in Graustufen. Skala, 100  $\mu$ m (B) Nano Silika transloziert in alle Bereiche des Pharynx: in den (1) Prokorpus, (2) Metakorpus, (3) Isthmus, (4) den terminalen Bulbus und (5) den anterioren Darm. (C, C') Die seitliche Aufnahme der Vulva zeigt die Translokation von Nano Silika in das Cytoplasma und in den Zellkern (nu) von einzelnen Vulvazellen, wie der Vul B, Vul D und Vul E Zellen. (D) Nano Silika translozieren in die Spermatheken. (E) Querschnitte entlang der dorsal-ventralen Achse des Pharynx zeigen die Verteilung von Nano Silika im Pharynxgewebe. Skala, 10  $\mu$ m; DIC, Differential-Interferenz-Kontrast (übernommen aus Scharf et al., 2013)

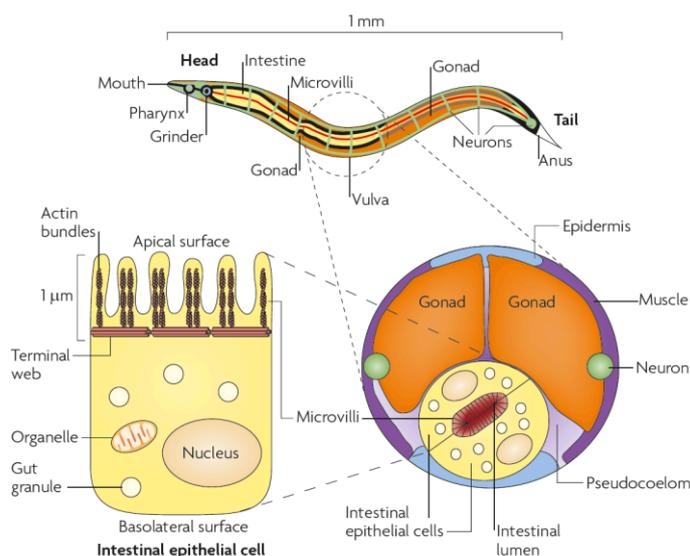
### **1.2.1 Einführung des Modellorganismus *C. elegans* ins Labor**

Vor ca. 70 Jahren wurde *C. elegans* von Sydney Brenner isoliert, ins Labor eingeführt und als Modellorganismus vorgestellt (Brenner, 1974; Corsi et al., 2015). Im Labor wird der Wurm auf Agarplatten oder im Flüssigmedium mit *Escherichia (E.) coli* als Nahrungsquelle kultiviert (Stiernagle, 1999). *C. elegans* besitzt zwei Geschlechter: Hermaphroditen (XX) oder Männchen (XO). Männchen machen jedoch nur 0,1-0,2 % der Population im Labor aus, da sie durch eine Fehlsegregation der homologen Chromosomen entstehen. Hermaphroditen besitzen sowohl Oozyten als auch Spermien, so dass sie sich über Selbstbefruchtung oder durch die Paarung mit einem Männchen fortpflanzen können. Die Generationszeit ist temperatur- und nahrungsabhängig und beträgt nach der Befruchtung bei optimalen Bedingungen (20°C) ca. 3 Tage. Dabei durchläuft ein Hermaphrodit die Embryogenese und vier aufeinanderfolgende Larvenstadien (L1-L4). Adulte Würmer haben eine kurze Lebensspanne von 2-3 Wochen und produzieren ca. 300 Nachkommen, was eine schnelle Kultivierung ermöglicht und den Nematoden für Langzeitexperimente qualifiziert (Brenner, 1974; Corsi et al., 2015). Durch die Transparenz der Cuticula können Organe, wie der Pharynx, der Darm, der Reproduktionsapparat sowie die Gonaden und die Verteilung von stabil ins Genom integrierten Fluoreszenzproteinen im Mikroskop beobachtet werden. Das Genom von *C. elegans* ist komplett sequenziert, wobei sich herausstellte, dass 60-80 % der Gene von *C. elegans* mit dem menschlichen Genom homolog sind. Viele molekulare Signalwege, wie Stressantworten sind zwischen den Spezies konserviert und vergleichbar. Somit wird der Nematode in vielen Forschungsgebieten, wie der Entwicklungs-, Zell-, Molekular-, Neurobiologie, sowie in der Genetik, der Alterungsforschung und Toxikologie, verwendet (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Corsi et al., 2015).

### **1.2.2 Aufbau und Funktion des Darms**

*C. elegans* nimmt seine Nahrung anterior über die Mundöffnung in den Pharynx auf, wo sie erst im Metacorpus gesammelt und nach jeder vierten Pumpbewegung des Pharynx in den terminalen Bulbus weitergeleitet wird. Dort werden Bakterien mit Hilfe eines Mahlwerks zerbrochen und gelangen anschließend über die Pharynx-Darm-Klappe in den Darm (Avery und Thomas, 1997).

Der adulte Darm erstreckt sich über den gesamten Körper von *C. elegans*. Er beginnt am anterior liegenden Pharynx und zieht sich bis zum posterior liegenden Anus. Der Darm besteht aus 20 Epithelzellen, die in bilateral symmetrischen Paaren angeordnet sind und über adhärennten Verbindungen zusammengehalten werden (Labousse, 2006). Somit bilden die Epithelzellen ein Art Rohr, in dem sich mittig das Lumen befindet (Avery und Thomas, 1997). Die Darmepithelzellen, auch Enterozyten genannt, ähneln den menschlichen Darmzellen. Sie sind bipolar und bestehen aus einer apikalen und basolateralen Domäne (Abb. 3; McGhee, 2007; Irazoqui et al., 2010). An der apikalen Domäne befinden sich die Mikrovilli, die von der Glykokalyx umgeben sind (Lehane, 1997). Das Netzwerk von Glykoproteinen schützt die Mikrovilli vor mechanischen Verletzungen und vor Pathogenen. Weiterhin fungiert die Glykokalyx als Filter, so dass nur Verdauungsprodukte die apikale Membran erreichen können und absorbiert werden. Das Netzwerk fördert die Freisetzung und Verteilung von Verdauungsenzymen in das Darmlumen (McGhee, 2007).



**Abb. 3 Der Aufbau des Darms in *C. elegans*.**

Der Darm von *C. elegans* beginnt nach dem Pharynx und endet im Anus. Er durchzieht den kompletten Wurm und ist umgeben von den Gonaden, Muskeln, dem Pseudocoelom und der Epidermis. Eine Darmzelle ist bipolar und hat eine apikale und basolaterale Domäne. Die apikale Domäne bildet den Bürstensaum mit der Mikrovilli, die aus Aktinbündeln bestehen, und zum Darmlumen gewandt ist (übernommen aus Irazoqui et al., 2010).

Sobald Bakterien in den Darm gelangen, wird zunächst deren Bakterienwand mit Hilfe von Lysozymen aufgelöst. Das Abwehrsystem von *C. elegans* tötet somit pathogene Bakterien ab und gewährleistet, dass Nährstoffe mittels Hydrolasen weiter verdaut werden können (Mallo et al., 2002; McGhee, 2007; McGhee et al., 2007). Die Nährstoffe liegen danach als Peptide im Darmlumen vor. Di- und Tripeptide werden überwiegend über den OPT-2/PEP-2 (Oligopeptid-/ Peptid-) Transporter an der apikalen Domäne in die Darmzelle transportiert. Im Cytoplasma werden Di- und

Tripeptide über Hydrolasen in Aminosäuren abgebaut und für die Proteinbiosynthese verwendet oder über Aminosäuretransporter an der basalen Domäne in den restlichen Körper von *C. elegans* transportiert (Meissner et al., 2004; Daniel et al., 2006).

Neben den Peptiden werden auch vermehrt Lipide vom Darm aufgenommen und als Energievorrat für den Energiemetabolismus angelegt. Lipide werden in Vesikeln im Darm gespeichert, die mittels Fluoreszenzfarbstoffen, wie Oil-Red-O oder BODIPY (Bor-Dipyrrromethen), in lebenden Würmern beobachtet werden können (Zhang et al., 2010). Weitere Organellen sind u.a. Endosomen, Autophagosomen und autofluoreszierende *gut* (Darm) *granules* (GG), die auch Lysosomen-assoziierten Organellen genannt werden (Hermann et al., 2005).

Über die Körperwandmuskulbewegung werden Bakterien zum Anus transportiert und ausgeschieden. In jungen Würmern werden Bakterien innerhalb von 2 Minuten ausgeschieden (Avery und Shtonda, 2003; McGhee, 2007).

### **1.2.3 Kommunikation zwischen Darm und Nervensystem**

Da der Darm von *C. elegans* nicht innerviert ist, kommunizieren der Darm und das Nervensystem über Neuropeptide und Neurotransmitter miteinander und modulieren verschiedene Verhaltensweisen, wie die Bewegung, die Eiablage und die Mechano- sowie die Chemosensorik (Li und Kim, 2008).

Neuropeptide werden sowohl in Neuronen, wie in sensorischen Neuronen, Interneuronen und Motorneuronen, als auch in den Gonaden, dem Darm und der Hypodermis der Vulva exprimiert. Neuropeptide werden in drei Familien eingeteilt: (i) Insulin-ähnliche Peptide (Pierce et al., 2001; Li et al., 2003), (ii) FMRFamid (Phe-Met- Arg - Phe- NH<sub>2</sub>)- ähnliche Peptide (FLP) (Li et al., 1998) und (iii) Neuropeptid-ähnliche Proteine (NLP) (Nathoo et al., 2001). Sie bestehen aus kurzen Aminosäuresequenzen und modulieren direkt oder indirekt die synaptische Aktivität und regulieren somit das Verhalten von *C. elegans* (Li und Kim, 2008). In Neuronen liegen Neuropeptide in dichten Kernvesikeln (*dense core vesicle*, DCV) diffus am terminalen Ende verteilt vor und wandern erst bei einem Anstieg von Calcium zur Synapse und werden dort in den synaptischen Spalt freigesetzt (Salio et al., 2006; Li und Kim, 2008).

Toxische Umweltfaktoren und pathogene Mikroben zu erkennen und zu meiden, ist für den Wurm überlebenswichtig. Dabei spielt der Darm eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, indem er über die Expression und Sekretion von Neuropeptiden Signalwege induziert und das Nervensystem benachrichtigt (Lee und Mylonakis, 2017). Lee und Mylonakis (2017) zeigten, dass nach einer Exposition mit dem Pathogenen *Pseudomonas (P.) aeruginosa* das Neuropeptid INS-11 vom Darm sekretiert wird und somit das Ausweichverhalten über die sensorischen Neuronen ADF und ASI im Wurm induziert.

Im Gegensatz zu Neuropeptiden werden Neurotransmitter überwiegend in Neuronen exprimiert, die an Rezeptoren in Darm binden und Signalwege induzieren können (Chase und Koelle, 2007; Zhang et al., 2018). Sensorische Neurone nehmen Umweltfaktoren wahr und exprimieren Neurotransmitter, wie Serotonin, und Insulin-ähnlichen Peptide, um Signalwege direkt oder indirekt über Interneurone im Darm zu induzieren und Verhaltensweisen zu modulieren. Der erste, schädliche Kontakt zu *P. aeruginosa* führt anschließend zu einem aversiven, olfaktorischen Lernverhalten, welches ebenso auf die sensorischen Neuronen ADF und ASI basiert (Zhang und Bargmann, 2005; Zhang et al., 2018).

#### **1.2.4 Aufbau des Nervensystems**

Das Nervensystem von *C. elegans* besteht aus dem Nervenring, welches den Pharynx umgibt, die ventral liegende Nervenketten, die dorsal liegende Nervenketten und dem Neurophil im Schwanz (Corsi et al., 2015). Die neurale unveränderliche Struktur und Position im adulten Wurm ermöglichen die Identifikation und Kartierung jedes, einzelnen Neurons. Insgesamt besitzt der Wurm 302 Neurone (White et al., 1986; Allen et al., 2015). Die neuronalen Zellkörper sind als Ganglien überwiegend im Kopf, entlang der ventral liegenden Nervenketten und im Schwanz von *C. elegans* arrangiert (Corsi et al., 2015). Zusätzlich besitzt *C. elegans* 56 Glia-ähnliche Zellen, die vor allem sensorische Zellen umgeben (Oikonomou und Shaham, 2011). Das Nervensystem besitzt 6393 chemische Synapsen, 890 Zellkontakte (*gap junctions*) und 1410 neuromuskuläre Verbindungen (*thight junctions*) (White et al., 1986; Varshney et al., 2011), durch die Neurone über Neurotransmitter oder Neuropeptide kommunizieren. Neurotransmitter, wie Acetylcholin (ACh), Serotonin, Dopamin und  $\gamma$ -

Aminobuttersäure (GABA), werden über synaptische Vesikel freigesetzt (Bargmann, 1998; Edwards, 1998).

Umwelttoxine und Pathogene können von *C. elegans* über 60 sensorische Neurone wahrgenommen werden, die entweder chemosensorische, olfaktorische und gustatorische oder mechanosensorische, thermosensorische Reize wahrnehmen und Signale über Interneurone oder direkt an Motorneurone weiterleiten (Zhang und Bargmann, 2005; Melo und Ruvkun, 2012; Allen et al., 2015). Von den 60 sensorischen Neuronen befinden sich 12 Paare der Amphidneuronen (ADF, ADL, AFD, ASE, ASG, ASH, ASI, ASJ, ASK, AWA, AWB, AWC) im Pharynx des Wurms, die indirekten oder direkten Kontakt zur Umwelt haben. Sie erstrecken sich von der Mundhöhle entlang des Pharynx bis hin zum Nervenring und sind die größten chemosensorischen Organe der Nematoden (Altun und Hall, 2010). Motorneurone stimulieren die Körperwandmuskelzellen über ACh und inhibieren diese mittels GABA. Die Pharynxmuskeln werden ebenso über ACh angeregt, aber über Glutamat inhibiert (Bargmann, 1998). Durch die Signalweiterleitung versuchen die Würmer die Toxine oder Pathogene zu umgehen (Zhang und Bargmann, 2005; Melo und Ruvkun, 2012).

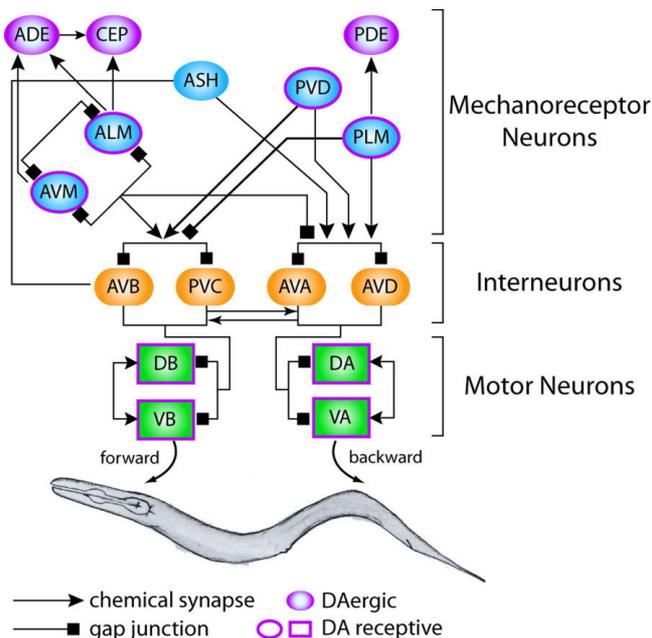
### **1.2.5 Verhaltensphänotypen**

Das im Vergleich zu Vertebraten einfache Nervensystem ermöglicht Analysen von Verhaltensphänotypen des Nematoden, wie Eiablage, Pumpfrequenz, Bewegung, Defäkation und Chemosensorik. Bestimmte Verhaltensfunktionen werden in *C. elegans* von einzelnen Neuronen gesteuert anstatt wie in Vertebraten durch mehrere Neuronen. Diese Verhaltensphänotypen geben wiederum Aufschluss über die Funktionsfähigkeit der neuralen Signaltransmission (Corsi et al., 2015).

Die Eiablage wird vom Motorneuron HSN (*hermaphrodite-specific neuron*) reguliert. Eine Ablation des HSN Neurons führt zu einer Unterbindung der Kontraktion der Vulvamuskel und somit der Eiablage. Das führt wiederum zum Schlüpfen der Larven im Uterus des parentalen Wurms. Dieser Phänotyp wird auch als *bag-of-worms* (BOW) beschrieben und führt zum frühzeitigen Tod des parentalen Wurms (Schafer, 2006; Zhang et al., 2008). Scharf et al. (2016) zeigten, dass auch die Exposition mit Nano Silika zu einer Induktion des BOW-Phänotypen führte, welcher auf einer

Proteinaggregation im HSN Neuron und einer Inhibierung der serotonergen Neurotransmission zurückzuführen ist.

Andere Verhaltensphänotypen wie die Kriech- und Schwimmbewegung werden von neuronalen Schaltkreisen reguliert, die aus sensorischen Neuronen, Interneuronen und Motorneuronen bestehen (Goodmann, 2006). Im Boden leben Würmer in einem fest-flüssigem Milieu und müssen je nach der Viskosität der Umgebung zwischen zwei Bewegungsarten wechseln. Auf einem festen Untergrund bewegt sich *C. elegans* durch die abwechselnde Kontraktion und Relaxation von dorsalen und ventralen Körperwandmuskelzellen in einer sinusoidalen Kriechbewegung (S-Form) fort (Gray und Lissman, 1964). Sobald die Würmer in ein flüssiges Milieu gelangen, detektieren sensorische Neurone die Beschaffenheit der Umgebung und induzieren über den Neurotransmitter Serotonin die C-förmige Schwimmbewegung. Die Kriechbewegung auf festem Untergrund wird ebenso von sensorischen Neuronen erkannt und über den Neurotransmitter Dopamin induziert (Abb.4; Goodmann, 2006; Vidal-Gadea et al., 2011).



**Abb. 4 Verschaltung von sensorischen Neuronen, Interneuronen und Motorneuronen moduliert die Bewegung in *C. elegans*.**

Die Textur der Umgebung wird vom Wurm über mechanosensorische Neurone wahrgenommen. Diese leiten Signale über die Interneurone an die Motorneurone weiter, die anschließend Vorwärts- oder Rückwärtskriechbewegungen induzieren. Die Kriechbewegung wird über den Neurotransmitter Dopamin eingeleitet (übernommen aus Goodmann, 2006).

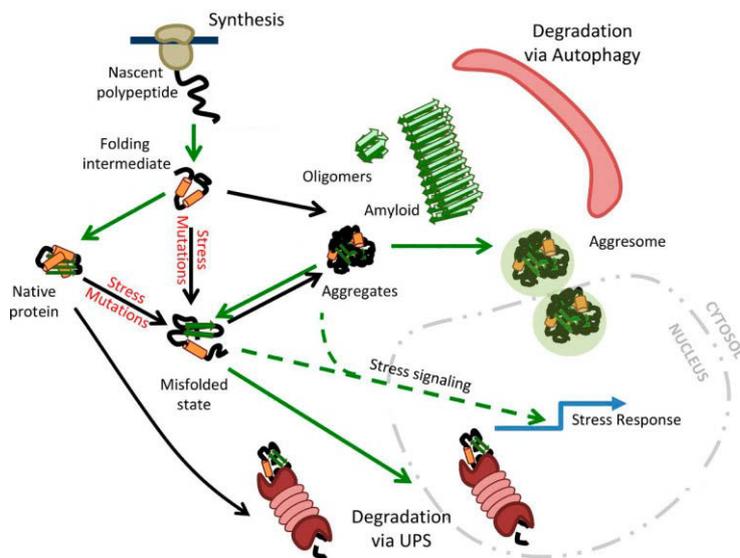
### **1.3 Alterungsprozesse und Neurodegeneration**

Alterungsprozesse sind durch einen fortschreitenden Verlust der physiologischen Funktion und Organintegrität gekennzeichnet, die zu einer erhöhten Vulnerabilität mit Funktionsstörungen bis zu einem frühzeitigen Tod führen können. Die Alterungsrate wird durch genetische und biochemische Prozesse kontrolliert, welche in der Evolution konserviert sind. Kennzeichen von Alterungsprozessen sind u.a. der Verlust der Proteostase und die Akkumulation von Proteinaggregaten (López-Otín et al., 2013).

#### **1.3.1 Die Proteostase und die Entstehung von Proteinaggregaten**

Die Proteostase umfasst die globale Regulation von Transkription und Translation, die Proteinfaltung und die Proteindegradation (Douglas und Dillin, 2010; López-Otín et al., 2013). Dabei agieren molekulare Chaperone und deren regulatorische Faktoren als Verbindungen zwischen den Prozessen (Klaips et al., 2018).

Endogene und exogene Stressfaktoren verursachen fehlerhaft gefaltete Proteine oder stören die Faltung der Proteine während der Proteinbiosynthese (López-Otín et al., 2013). Um die Proteostase Aufrecht zu erhalten, werden verschiedene Chaperone und Protein-Qualitätskontrollfaktoren aktiv, die mit Degradationsmaschinerien der Zelle verknüpft sind. Dieses Netzwerk von Proteinen ist das Netzwerk der Proteostase (Abb. 5; Balch et al., 2008; Klaips et al., 2018).



**Abb. 5 Das Netzwerk der Proteostase.**

Das Netzwerk der Proteostase besteht überwiegend aus Chaperonen (grüne Pfeile) und Protein-Qualitätsfaktoren, um die Proteostase im Gleichgewicht zu halten. Neu synthetisierte Proteine werden mit Hilfe von Chaperonen gefaltet. Nicht mehr benötigte Proteine werden über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) im Cytoplasma oder im Nucleus degradiert. In Stresssituationen kann die Kapazität des Proteostasenetzwerks über Stresssignalwege erhöht werden, um die Akkumulation von Proteinaggregaten zu reduzieren. In alten oder kranken Zellen kommt es zu einer generellen fehlerhaften Proteinfaltung und Aggregation, die mit einer Abnahme des Proteostasenetzwerks einhergeht. Fehlerhaft gefaltete Proteine aggregieren und werden in Aggregosomen eingeschlossen oder über die Autophagosomen entfernt. Proteinaggregate können aber auch amyloide Strukturen bilden, die mit zellulären Prozessen interferieren und diese behindern (übernommen und modifiziert aus Klaips et al., 2018).

Fehlerhaft gefaltete Proteine werden normalerweise von Chaperonen, wie den *Heat-Shock* Proteinen (HSP), wieder richtig gefaltet (López-Otín et al., 2013). Ansonsten werden löslich, fehlerhaft gefaltete Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) degradiert. Das UPS ist von den drei Enzymen E1, E2 und E3 Ligase abhängig, die für die Ubiquitinierung der Proteine zuständig sind. Das ubiquitinierte Protein wird mittels Chaperonen zum Proteasom transportiert, wo es anschließend in einzelne (Poly-)Peptide degradiert wird (Ciechanover et al., 2000; von Mikecz, 2006; Stroh et al., 2017). Fehlerhaft gefaltete Proteine können auch über die Chaperonen-vermittelte Autophagie in Lysosomen von lysosomalen Hydrolasen in Aminosäuren degradiert werden (Kiffin et al., 2004). Große Aggregate oder Membran-assoziiierende Proteine werden hingegen über Autophasomen entfernt (Menziés et al., 2015; Ciechanover und Kwon, 2017). Diese Qualitätskontrollen der Zelle erhalten die Stabilität und Funktionalität des Proteoms (Hartl et al., 2011; Koga et al., 2011). Fehler beim *Refolding* oder der Degradation führen zur Akkumulation der fehlerhaft gefalteten Proteine und zur Proteinaggregation, die einen proteotoxischen Effekt hat.

Die Akkumulation von Proteinaggregaten kann zur Entwicklung von altersabhängigen Pathologien und neurodegenerativen Erkrankungen führen, wie z.B. der Alzheimer Erkrankung (*Alzheimer's disease*, AD) und der Parkinson Erkrankung (*Parkinson's disease*, PD) (Powers et al., 2009; Klaips et al., 2018).

Viele Zelltypen zeigen eine Abnahme der UPS Aktivität und der Autophagie während der Alterung (Hamer et al., 2010; Rubinsztein et al., 2011; Cuervo und Wong, 2014). Es wird vermutet, dass diese der Grund für eine generelle Proteinaggregation in postmitotischen Zellen, wie Muskeln und Neuronen, in *C. elegans* ist und zu einer Prädisposition von neurodegenerativen Erkrankungen führt (David et al., 2010; Hamer et al., 2010; Walther et al., 2015; Huang et al., 2019).

### **1.3.2 Alterungsprozesse in *C. elegans***

Alterungsprozesse in *C. elegans* können anhand von veränderten Verhaltens- und Alterungsphänotypen beobachtet werden. Während des Alterns zeigen die Würmer drei unterschiedliche Verhaltensphänotypen in der Kriechbewegung. Die sinusoidale Kriechbewegung nimmt mit dem Alter ab und die unkoordinierte Kriechbewegung nimmt zu. Der dritte Phänotyp zeigt keine Kriechbewegung mehr, sondern lediglich eine Kopf-/ Schwanzbewegung (Herndon et al., 2002).

Ebenso können Neurone unterschiedliche Alterungsphänotypen zeigen, die anhand von Fluoreszenzproteinen sichtbar gemacht werden können. (i) Vom Zellsoma oder vom Axon können sich neue Verzweigungen (*neural branching*) bilden, (ii) entlang des Axons können sich Verdickungen (*neural blebs*) bilden und (iii) Unterbrechungen in Form einer Perlenkette können am Axon (*axonal beading*) auftreten (Pan et al., 2011; Tank et al., 2011; Toth et al., 2012; Chew et al., 2013). Tank et al. 2011 zeigten, dass das Auftreten von Verzweigungen in mechanosensorischen Neuronen mit einem Abfall der Mobilität korreliert.

Zu den Alterungsphänotypen des Darms zählen der Verlust von Nuclei, die Degradation der Mikrovilli und Veränderungen der Größe, der Form und der cytoplasmatischen Zusammensetzung des Darms (McGee et al., 2011; Herndon et al., 2017). In älteren Würmern werden vermehrt Lipidtropfen und Vakuolen in einzelnen Darmzellen beobachtet, die in jungen Würmern nicht vorkommen (Herndon et al., 2002; McGee et al., 2011). Auf Grund von einer Abnahme der

Pumpfrequenz akkumulieren Bakterien im Pharynx und/ oder im Bereich des Darms (Collins et al., 2008; McGee et al., 2011).

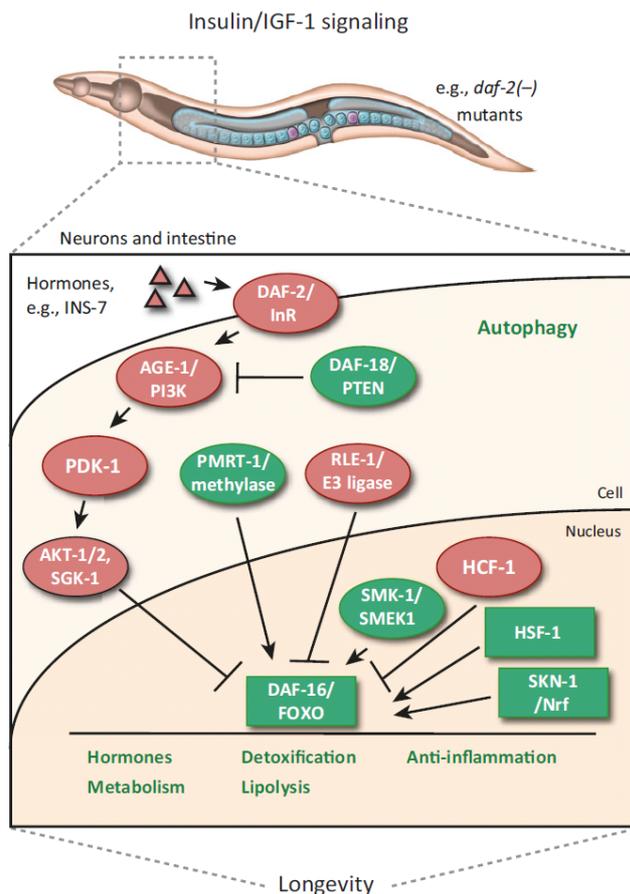
Manche Alterungsphänotypen können jedoch von NP frühzeitig induziert werden. Eine globale Proteinaggregation sowie eine Induktion des Eiablagedefekts BOW und die Abnahme der Pumpfrequenz werden von Nano Silika frühzeitig induziert (Scharf et al., 2013; Scharf et al., 2016). Viele Alterungsphänotypen sowie die Lebensspanne sind von Signalwegen, wie dem Insulin/ IGF-1 Rezeptor (DAF-2; *abnormal dauer formation*) Signalweg (IIS) abhängig. Die neuronalen Alterungsphänotypen treten weniger häufig und später auf, wenn der IIS inhibiert ist (Pan et al., 2011; Tank et al., 2011).

#### **1.4 Der Insulin/ IGF-1 Rezeptor (DAF-2) Signalweg**

Änderungen in Alterungsprozessen und der Lebensspanne von *C. elegans* wurden in Mutationen von Genen entdeckt, die im IIS involviert sind. Mutationen im Gen für die Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K/ *age-1*; *ageing alteration*), ein Effektor des IIS, oder für den Insulin/ IGF-1 Transmembranrezeptor (*daf-2*) reprimieren den IIS und verlängern die Lebensspanne (Friedman und Johnson, 1988; Kenyon et al., 1993).

Der IIS ist ein endokriner und Nährstoff-abhängiger Signalweg, der in verschiedenen Phyla konserviert ist. Im Hermaphroditen *C. elegans* moduliert er den Metabolismus, das Wachstum, die Entwicklung sowie das Verhalten und hat somit Einfluss auf die Lebensspanne. Umwelteinflüsse oder Pathogene können über sensorische Neurone aber auch von Darmzellen wahrgenommen werden und den IIS aktivieren (Lapierre und Hansen, 2012; Murphy und Hu, 2013; Zhang et al., 2018). Dabei werden Insulin-ähnliche Neuropeptide exprimiert, welche an dem Insulin/ IGF-1 Transmembranrezeptor DAF-2 binden und somit die Tyrosinkinase des Rezeptors aktivieren. Über Phosphorylierungsschritte wird eine Signaltransduktionskaskade aktiviert, die aus den Kinasen Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K/ AGE-1), 3-Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK-1), AKT Serin/Threonin Kinase 1/ -2 (AKT-1/ -2) und Serum-/ Glucocorticoide-regulatorische Kinase 1 (SGK-1) bestehen. AKT und SGK-1 phosphorylieren und inaktivieren direkt den FOXO (*forkhead box protein O*) Transkriptionsfaktor DAF-16 und verhindern somit die Translokation in den Zellkern. Mutationen in dem DAF-2 Rezeptor (*daf-2*) oder in der Signaltransduktionskaskade (z.B. *age-1* oder *pdk-1*) resultieren in einer verringerten

Aktivität des IIS und führen zur Aktivierung und Translokation von DAF-16 in den Zellkern. Dort induziert DAF-16 die Transkription von Genen und somit die Translation von Proteinen, die für die molekulare Stressantwort, die Verlängerung der Lebensspanne oder den Abwehrmechanismus gegenüber Pathogenen verantwortlich ist (Abb. 6; Lapierre und Hansen, 2012; Murphy und Hu, 2013; Riera et al., 2016).



**Abb. 6 Der Insulin/ IGF-1 Signalweg im Nematoden *C. elegans*.**

In *C. elegans* sekretieren Neurone Insulin-ähnliche Peptide, wie INS-7, die anschließend an den DAF-2 Rezeptor in Darmzellen binden und über eine Signalkaskade den Transkriptionsfaktor DAF-16 daran hindern in den Nucleus zu translozieren. Weitere Proteine, die DAF-16 regulieren, sind RLE-1 (*regulation of longevity by E3 ubiquitin ligase*) / E3 Ligase durch Ubiquitinierung und PRMT-1 (*protein arginine methyltransferase*) / Methylase durch Methylierung. In *daf-2* Mutante ist die Signalkaskade reduziert und DAF-16 kann in den Zellkern translozieren. Dort werden Gene exprimiert, die für die Synthese von Hormonen, von Proteinen für den Metabolismus, für die Detoxifizierung, für die Lipolyse und für die Stressantwort verantwortlich sind und zu einer verlängerten Lebensspanne führen. Transloziertes DAF-16 im Zellkern wird durch SMK-1/ SMEK1 (*suppressor of MEK*), HSF-1 (*heat shock factor-1*) und SKN-1/ Nrf (Transkriptionsfaktor von Nrf) stimuliert und durch HCF-1 (*host cell factor-1*) inhibiert (übernommen und modifiziert aus Lapierre und Hansen, 2012).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Umwelttoxinen, wie Nanopartikel, stellen für die Umwelt und den Menschen ein Risiko dar, da sie beim Menschen über das olfaktorische System oder den Darm aufgenommen werden, wo sie anschließend in den umliegenden Zellen akkumulieren und sogar ins Gehirn gelangen können. Langzeitauswirkungen sind noch nicht ausreichend erforscht. Im Modellorganismus *Caenorhabditis (C.) elegans* wurde eine Korrelation zwischen der Translokation von Nano Silika in einzelnen Zellen und einer Störung der jeweiligen Organfunktion beobachtet. Es zeigte sich, dass es sich bei den gestörten Organfunktionen um frühzeitige Alterungsphänotypen handelt, die durch die Exposition von Nano Silika schon in jungen Würmern auftreten. Diese Alterungsphänotypen reichen von einer generellen Proteinaggregation bis hin zu einer axonalen Proteinaggregation in serotonergen Neuronen, welche die Eiablage im Wurm inhibiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Nanopartikel-Bio-Interaktionen von umweltrelevanten Nanopartikeln, wie Ag, CeO<sub>2</sub>, ZnO, Polystyren und Silika, in *C. elegans* untersucht werden. Das Ziel der Arbeit ist die Würmer über die komplette Lebensspanne mit Nanopartikeln zu exponieren, um Alterungsprozesse und Neurodegeneration zu identifizieren und betroffene Signalwege zu untersuchen.

Dafür soll beobachtet werden, ob Alterungsphänotypen, wie die Abnahme der Schwimmbewegung, von Nanopartikel frühzeitig induziert werden und mit einer Neurodegeneration einhergehen. Durch die Beobachtung von Nano-Bio-Interaktionen über die gesamte Lebensspanne werden diese Alterungsphänotypen sichtbar und die vulnerablen Gruppen und Zeitpunkte können identifiziert werden. Zu den Analysen der neuralen Verhaltensphänotypen soll auch die Darmfunktion untersucht werden, bei der die Peptidaufnahme und -verteilung in einzelnen Darmzellen beobachtet wird. Im weiteren Verlauf werden langlebige *daf-2* und kurzlebige *daf-16* Würmer analysiert, um zu schauen, ob Nanopartikel-induzierte Alterungsprozesse vom Insulin/ IGF-1 Rezeptor (DAF-2) Signalweg abhängen und bei einer Mutation im *daf-2* Gen verzögert werden können.

Die Titration der Nanopartikel soll toxische Konzentrationen bestimmen und die Frage klären, ob vorzeitige Alterungsphänotypen messbar sind. Anschließend

werden eingesetzten Nanopartikelkonzentrationen mit den Konzentrationen in der Umwelt verglichen, um abzuschätzen, ob die kalkulierten Konzentrationen in der Umwelt schon negative Auswirkungen auf das Ökosystem haben könnten.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Publikation 1: Life span-resolved nanotoxicology enables identification of age-associated neuromuscular vulnerabilities in the nematode *Caenorhabditis elegans*

Annette Piechulek und Anna von Mikecz

Publiziert in: *Environmental Pollution*

Datum: 02.2018

Impact Factor: 5,714 (2018)

Eigenanteil an der Publikation:

Experimente: 100%

DLS der Partikel; Durchführung und Auswertung aller Experimente; Erstellung der Abbildungen

Manuskript: 20%

Material- und Methodenteil

Die Rechte dieser Publikation liegen beim Journal *Environmental Pollution*.

Die Originalarbeit kann über die National Library of Medicine <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> oder den Link des Herausgebers <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749117321462?via%3Dihub> eingesehen und heruntergeladen werden.

## Highlights des Papers:

- *C. elegans* stellt als Bodenorganismus einen realistischen Zielorganismus für die Exposition von Nanopartikeln dar;
- die etablierte Flüssigkultur in 96-Well Platten zeigt ein soziales Fressverhalten, welches ebenso in wilden Nematoden beobachtet wird;
- die Bedingungen im Flüssigmedium verlängern die Lebensspanne von Würmern im Vergleich zu der Lebensspanne von Würmern auf Agarplatten;
- das etablierte System ermöglicht Analysen der Effekte von umweltrelevanten Nanopartikeln über die gesamte Lebensspanne;
- Würmer im mittleren Lebensalter sind besonders vulnerabel gegenüber Nano Silber, da sie neuromuskuläre Defekte entwickeln und eine beeinträchtigte und unkoordinierte Schwimmbewegung zeigen;
- die unkoordinierte Bewegung korreliert mit der Proteinaggregation im serotonergen Amphidneuron ADF;
- im Vergleich dazu sind GABAerge Neurone nicht betroffen, welche für die Inhibierung der Körperwandmuskelzellen während der Schwimmbewegung verantwortlich sind.

### 3.2 Publikation 2: Aging by pollutants: introducing the aging dose (AD)<sub>50</sub>

Annette Piechulek und Anna von Mikecz

Publiziert in: *Environmental Sciences Europe*

Datum: 04.2019

Impact Factor: 5.878 (2018/ 19)

Eigenanteil an der Publikation: 20%

Experimente: 50%

Durchführung von Verhaltensexperimenten, Langzeitbeobachtung der Neurodegeneration

Die Rechte dieser Publikation liegen beim Journal *Environmental Sciences Europe*.

Die Originalarbeit kann über den Link des Herausgebers <https://enveurope.springeropen.com/articles/10.1186/s12302-019-0205-1> eingesehen und heruntergeladen werden.

## Highlights des Kommentars:

- Definition der Alterungsdosis (AD)<sub>50</sub>: AD<sub>50</sub> bestimmt die Konzentration einer Umwelttoxine (z.B. NP), bei der 50% der untersuchten Population einen Alterungsphänotyp zeigen;
- als Beispiel wird die Schwimmbewegung von *C. elegans* genannt, die durch eine Exposition von Nano Silika (1250 µg/ mL) reduziert wird: 50 % der exponierten Würmer zeigen bereits an Tag 5 eine reduzierte Schwimmbewegung, die normalerweise erst in 15-Tage alten Würmern auftritt;
- Nano Silika beschleunigen somit Alterungsprozesse im Wurm, wie die Veränderung der Darmmorphologie (*intestinal ballooning*, Ballonphänotyp der Darmzellen), die globale Proteinaggregation, Neurodegeneration des Ampiidneuron ADF und eine reduzierte Schwimmbewegung;
- die Neurotoxizität von Nano Silika wird am Beispiel der Eiablage in *C. elegans* an einem Schema veranschaulicht und vorherige Studien zusammengefasst: Nano Silika translozieren in einzelne Vulvazellen und inhibieren dort deren Funktion. Nano Silika induzierten Proteinaggregate in den HSN Neuronen, welche die Eiablage regulieren. Durch die Proteinaggregation kommt es zu einer Störung des axonalen Transports und einer reduzierten Neurotransmission von Serotonin, was folglich zu einer gestörten Eiablage führt.

### **3.3 Publikation 3: Silica nanoparticles disrupt OPT-2/PEP-2- dependent trafficking of nutrient peptides in the intestinal epithelium**

Annette Piechulek, Lutz C. Berwanger & Anna von Mikecz

Publiziert in: *Nanotoxicology*

Datum: 07.2019

Impact Factor: 5.955 (2018)

#### Eigenanteil an der Publikation:

Experimente: 70%

DLS der Partikel; Mikroskopie der Peptidaufnahme in den Darm und Quantifizierung der Peptidvesikel; Untersuchung der veränderten Darmmorphologie mit unterschiedlichen Partikeln, Mutanten und Reporterwürmern (Supplemental); Bestimmung des LOAELS für Nano Silika Effekte; Messung und Quantifizierung der Körperlänge von Würmern; Auswertung und Statistik

Manuskript: 20%

Material- und Methodenteil

Abbildungen: 3-5; S1-S8

Die Rechte dieser Publikation liegen beim Journal *Nanotoxicology*.

Die Originalarbeit kann über die National Library of Medicine <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> oder den Link des Herausgebers <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17435390.2019.1643048> eingesehen und heruntergeladen werden.

## Highlights des Papers:

- Nano Silika beschleunigen einen Alterungsphänotyp im Darm (*intestinal ballooning*, Ballonphänotyp);
- über die Hartlen-Synthese hergestellte Nano Silika translozieren über den OPT-2/ PEP-2 Transporter in *gut granules* von einzelnen Darmzellen im Gegensatz zu anders synthetisierten Nano Silika, z.B. Stoeber Synthese;
- Nano Silika induzieren Peptidvesikel in Darmzellen, die das fluoreszierende Di-Peptidderivat  $\beta$ -Ala-Lys-AMCA aufnehmen;
- die beobachteten Peptidvesikel wachsen über die Zeit und nehmen eine durchschnittliche Größe von 6  $\mu$ m an;
- Peptidvesikel bilden sich unabhängig von *gut granules* und kolokalisieren nicht mit den aufgenommenen NP;
- gleichzeitig führt die Exposition von Nano Silika zu einer Reduktion der Körperlänge von *C. elegans*;
- Peptidvesikel bilden sich unabhängig vom IIS und ordnen sich in *daf-2 (e1370)* Mutanten an der apikalen Plasmamembran an;
- die reduzierte Körperlänge ist nicht signifikant unterschiedlich zu der Körperlänge von *pep-2* Mutanten, die eine Mutation im OPT-2/ PEP-2 Transporter haben und somit nicht in der Lage sind Peptide in den Darm aufzunehmen.

## 4 Diskussion

Trotz des weltweiten Einsatzes von NP in der Industrie und in Verbraucherprodukten, sind deren Wirkungsweisen auf das Ökosystem und den Menschen nicht ausreichend erforscht. Viele Studien konzentrieren sich auf akute Analysen von NP-Bio-Interaktionen. Chronische Effekte auf die Umwelt und den Menschen werden jedoch immer relevanter (Wang et al., 2018). Um altersabhängige NP-Bio-Interaktionen auf das Nervensystem und den Darm zu untersuchen, wurde der Modellorganismus *C. elegans* verwendet. Der Nematode ist ein Teil des terrestrischen Ökosystems und somit ebenfalls ein potentieller Zielorganismus von NP-Expositionen (Neher, 2001; Schulenburg und Félix, 2017).

In vorherigen Studien wurde beobachtet, dass *C. elegans* Hermaphroditen NP über den Pharynx und die Vulvaöffnung aufnehmen, wo sie anschließend ins Pharynxgewebe und in einzelne Vulvazellen translozieren. Die Translokation von Nano Silika korrelieren mit einer verfrühten Abnahme der Pumpfrequenz und einem verfrühten Auftreten des BOW-Phänotyps (Pluskota et al., 2009; Scharf et al., 2013). Weiterhin induzieren Nano Silika amyloide Strukturen im Nucleus bzw. im Nucleolus von einzelnen Darmzellen. Im gesamten Wurm führt die Exposition von Nano Silika zu verfrühten Alterungsprozessen, Neurodegeneration und zur Proteinaggregation und Inhibierung der Signaltransmission in einzelnen serotonergen Neuronen (Scharf et al., 2013; Scharf et al., 2016).

Im Rahmen der Doktorarbeit wird untersucht, inwiefern umweltrelevante NP frühzeitige Alterungsprozesse und Neurodegeneration induzieren und die Darmfunktion in *C. elegans* stören. Die Exposition von NP und die Analyse der Effekte erfolgt dabei über die gesamte Lebensspanne in 96-Well Mikrotiterplatten, die Flüssigmedium und Bakterien als Nahrungsquelle beinhalten.

Die Kultivierung der Würmer in 96-Well Mikrotiterplatten induziert beim Wildtyp Stamm ein untypisches soziales Fressverhalten, welches normalerweise bei wilden Nematoden beobachtet wird (De Bono und Bargmann, 1998). In den 96-Well Mikrotiterplatten sedimentieren die Bakterien auf den Boden des Probenlochs, was die Umweltbedingungen von wilden Nematoden nachahmt, wenn Bakterien auf verrottenden Pflanzenresten wachsen (Félix und Braendle, 2010). Diese

Bedingungen induzieren die Interaktion der Würmer miteinander und scheinen eine positive Wirkung auf die Nematoden zu haben, da sie die Lebensspanne der Würmer im Vergleich zu Würmern auf Agarplatten um 10 Tage verlängern, was 1/3 der Gesamtlebensspanne von *C. elegans* entspricht (Petrascheck et al., 2007; Piechulek und von Mikecz, 2018).

Das etablierte System mit den optimalen Kultivierungsbedingungen ermöglicht Analysen von NP-Biointeraktionen über die gesamte Lebensspanne und erlaubt somit die Identifizierung von vulnerablen Gruppen innerhalb einer Wurmpopulation. Es wurde eine konzentrationsabhängige Toxizität von Nano Ag auf die Bewegung, Eiablage und Lebensspanne festgestellt. Insbesondere Würmer im mittleren Lebensalter zeigten neuromuskuläre Defekte, die mit einer gestörten, serotonergen Neurotransmission im sensorischen Amphidneuron ADF korrelieren. Weiterhin induzieren steigende Konzentrationen von Nano Silika einen Alterungsphänotyp im Darm (Ballonphänotyp) und unterbinden den Peptidtransport in Darmzellen, indem Peptide in Vesikeln akkumulieren. Die Exposition von Nano Silika führt gleichzeitig zu einer reduzierten Körperlänge, welche der Körperlänge von *pep-2* Mutanten ähnelt. Diese Mutanten besitzen eine Mutation im OPT-2/ PEP-2 Transporter und haben somit einen Defekt in der Peptidaufnahme. Im Vergleich zu Nano Silber und Nano Silika konnten bei Polystyren, CeO<sub>2</sub> und ZnO NP keine toxischen Effekte beobachtet werden.

#### **4.1 Würmer im mittleren Lebensalter sind besonders vulnerabel gegenüber einer Exposition mit Nano Silber oder Nano Silika und zeigen neuromuskuläre Defekte**

Die quantitative Analyse der Schwimmbewegung von alternden Würmern über die gesamte Lebensspanne im Flüssigmedium zeigte eine konzentrationsabhängige Toxizität von Nano Ag. Hohe Konzentrationen von 100 µg/ mL werden als letal eingestuft, da die Würmer innerhalb von 8 Tagen sterben. Eine Dosis von 10 µg/ mL reduziert signifikant nicht nur die Lebensspanne, sondern auch die Schwimmbewegung und erhöht unkoordinierte Bewegungen in 8-Tage, adulten Würmern (Piechulek und von Mikecz, 2018). Dieselben neuromuskulären Defekte werden auch in Nano Silika exponierten Würmern beobachtet (Piechulek und von Mikecz, 2019) und ähneln den motorischen Symptomen, wie der Bradykinesie und

der Muskelrigidität, bei PD Patienten. Normalerweise nehmen die Schwimmbewegungen erst in alternden Würmern ab und die unkoordinierten Bewegungen zu (Herndon et al., 2002). Vorherige Studien bestärken die Ergebnisse, dass NP Alterungsprozesse an einem bestimmten Tag beschleunigen. 4-Tage adulte, junge Würmer zeigten nach einer Exposition mit Nano Silika eine reduzierte Pumpfrequenz und ein Defekt in der Eiablage (Pluskota et al. 2009; Scharf et al. 2013). Auch epidemiologische Studien stellten fest, dass die Exposition von NP über Feinstaub besonders in vulnerablen Gruppen das Risiko erhöhen, an einer neurodegenerativen Erkrankung, wie beispielsweise AD oder PD, zu erkranken (Calderón-Garcidueñas et al., 2018; Calderón-Garcidueñas et al., 2019). Hier gehören Kinder, chronisch-krank Menschen und ältere Menschen zu den vulnerablen Gruppen. Die Heinz Nixdorf Studie im Ruhrgebiet zeigte zudem, dass Langzeitexpositionen von Luftverschmutzung und Verkehrslärm einen synergistischen Effekt auf die kognitiven Fähigkeiten von älteren Menschen hat (Tzivian et al., 2016; Tzivian et al., 2017).

Schwimmbewegungen in Würmern werden von chemosensorischen Neuronen, wie dem ADF Neuron, über den Neurotransmitter Serotonin induziert (Vidal-Gadea et al., 2011). Anschließend regulieren Motorneurone die Körperwandmuskelzellen über GABA und ACh (Bargmann, 1998). Es wurde beobachtet, dass Nano Ag eine Proteinaggregation des Fluoreszenzproteins DsRed2 in den sensorischen Amphidneuronen ADF induziert. DsRed2 wird unter der Kontrolle des Promoters der Tryptophan-Hydroxylase-1 (TPH-1) spezifisch in den serotonergen Neuronen ADF, NSM und HSN exprimiert (Tanis et al. 2008; Jafari et al., 2011). Diese Proteinaggregation wird anhand von Unterbrechungen entlang des ADF Axons (*axonal beading*) sichtbar, welche ebenso zu einem verfrühten Alterungsphänotyp der Neurone gehört (Chew et al. 2013). Die Proteinaggregation geht gleichzeitig mit einer abnehmenden Schwimmbewegung und mit steigenden, unkoordinierten Bewegungen der Würmer einher. Parallel dazu wurden keine Proteinaggregate in GABAergen Neuronen beobachtet (Piechulek und von Mikecz, 2018). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass sensorische Neurone nach einer Exposition mit Nano Ag vulnerabler als Motorneurone sind und die neuromuskulären Defekte mit der gestörten, serotonergen Neurotransmission zusammenhängen. Toth et al. (2012) beobachteten ebenso, dass sensorische Tastneurone im Wurm von

Alterungsprozessen, wie dem *neural branching*, betroffen sind. Wiederum zeigten GABAerge Motorneurone oder AVE Interneurone keine Alterungsphänotypen.

Das Amphidneuron ADF ist das einzige serotonerge Neuron, welches direkten Kontakt zur Umwelt und somit auch einen direkten Kontakt zu Nano Ag hat oder es sogar aufnehmen könnte, was dessen Sensitivität gegenüber NP und die Proteinaggregation erklären würde (Jafari et al., 2011). Jedoch kann die Proteinaggregation im ADF Neuron nicht alleine für die unkoordinierten Schwimmbewegungen verantwortlich sein. Vidal-Gadea et al. (2011) stellten fest, dass die Ablation der ADF Neurone keine Auswirkungen auf die Schwimmbewegung haben. Da Proteinaggregate ebenso in den serotonergen Neuronen NSM und HSN beobachtet wurden, kann aber ein allgemeiner reduzierter Serotoninlevel und eine Störung der serotonergen Neurotransmission vermutet werden (Piechulek et al., 2018; unpublizierte Beobachtungen). Bei einem niedrigen Serotoninlevel kann die Schwimmbewegung nicht Aufrecht erhalten werden und die Würmer können auf Grund eines erhöhten Dopaminlevels Kriechbewegungen im Flüssigmedium zeigen (Vidal-Gadea et al., 2011). Da keine Kriechbewegungen im Flüssigmedium beobachtet wurden, stellt sich die Frage, ob die dopaminerge Neurotransmission gestört sein könnte.

Analysen der Kriechbewegung auf Agarplatten mit einer parallelen Beobachtung der Expressionsverteilung von Dopamin in dopaminergen Neuronen könnte Aufschluss geben, ob nur die Schwimmbewegung und serotonerge Neurone betroffen sind oder auch die dopaminerge Neurone und somit auch die Kriechbewegung gestört wird (Nass et al., 2002; Vidal-Gadea et al., 2011). Scharf et al., (2016) haben eine veränderte Kriechspur in 2-Tage alten, Nano Silika exponierten Würmern beobachtet, jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Körperbiegungen pro Sekunde auf den Agarplatten gesehen. Jung et al. (2015) beobachteten ebenso keinen negativen Effekt von Nano Silika oder Nano Ag auf die Schnelligkeit der Kriechbewegung. Da die Anzahl der Körperbiegungen keine signifikanten Unterschiede zeigte, aber doch eine veränderte Kriechspur beobachtet wurde, kann vermutet werden, dass noch andere sensorische Neuronen betroffen sind. Cohen et al. (2012) stellte nämlich fest, dass sich bei einer Degeneration von Mechano- und Tastrezeptorneuronen die Ausrichtungen der Kriechbewegungen ändern. Ob nun dopaminerge Neurone und/ oder andere sensorische Neurone

degeniert sind oder eine gestörte Neurotransmission vorliegt, müsste weiter untersucht werden.

Bei einer längeren Exposition von Nano Silika (Tag 18) wurde ein verfrühtes Auftreten von nur noch Kopf- und/ oder Schwanzbewegungen beobachtet, während der restliche Körper paralytisch ist (Piechulek und von Mikecz, 2019). Ebenso resultierte die veränderte Kriechspur auf eine posteriore Paralyse des Wurms (Scharf et al., 2016). Die Bewegung in *C. elegans* wird durch Körperwandmuskelzellen ausgeführt, welche von den Neurotransmittern GABA und ACh stimuliert werden (Bargmann, 1998). Nematizide, wie Aldicarb und Levamisol, induzieren durch eine Störung der cholinergen Neurotransmission ebenso eine Paralyse im Wurm. Aldicarb inhibiert die Acetylcholinesterase, was zur Akkumulation von ACh in der neuromuskulären Synapse (*neuromuscular junction, NMJ*) führt und den Wurm paralytisch macht (Miller et al., 1996; Sieburth et al., 2005). Im Gegensatz dazu induziert Levamisol die Paralyse durch die Bindung an den Acetylcholinrezeptor UNC-29 (*uncoordinated*; Nurrish et al., 1999). Eine exogene Zugabe von Serotonin inhibiert die ACh Freisetzung des Motorneurons und kann so die von Aldicarb-induzierte Paralyse verzögern, jedoch nicht die Paralyse von Levamisol (Govorunova et al., 2010). Um eine Störung der Motorneurone oder einer muskulären Störung auszuschließen, könnte eine Analyse der Expression von ACh sowie eine Analyse der Körperwandmuskelzellen durchgeführt werden. Eine exogene Zugabe von Serotonin mit einer quantitativen Analyse der Bewegung könnte den Mechanismus von Nano Silika und Nano Ag weiter aufklären.

Die Analysen von Bewegungsphänotypen über die gesamte Lebensspanne ermöglicht die Identifizierung von NP-induzierten, neuromuskulären Defekten an bestimmten Tagen und lässt vulnerable Altersgruppen sichtbar werden. Die Proteinaggregation im sensorischen ADF Neuron gibt erste Hinweise eines Funktionsverlustes, weil die serotonerge Neurotransmission unterbrochen scheint. Scharf et al. (2016) zeigten, dass eine Nano Silika-induzierte Proteinaggregation im HSN zu einer Störung der Eiablage führt. Ein Verlust der olfaktorischen, sensorischen Funktion ist eine gemeinsame Eigenschaft in neurodegenerativen Erkrankungen, wie PD und AD (Oberdörster et al., 2009). Hierbei stellt sich die Frage, ob neben dem ADF Neuron noch in anderen sensorischen Neuronen Proteinaggregate auftreten und somit deren Funktion beeinträchtigt wird.

Altersabhängige Analysen lassen weitere Bewegungsphänotypen und betroffene Neurone identifizieren und einen möglichen Degenerationsverlauf entschlüsseln.

#### **4.2 Nano Silika unterbinden den Peptidtransport in Darmzellen und führen zu einer reduzierten Körperlänge**

Die Beobachtung von amyloiden Strukturen im Nucleolus von einzelnen Darmzellen lässt die Frage offen, ob Nano Silika Auswirkungen auf die Darmfunktion hat und die beobachteten, neuromuskulären Defekte mit Veränderungen im Darm einhergehen, wie es z.B. bei PD Patienten der Fall ist.

Zur Klärung dieser Frage wurden unterschiedliche Nano Silika verwendet, die durch verschiedene Synthesemethoden hergestellt wurden: die Stöber-Synthese, *high-temperature flame hydrolyse* (HTFH) und die Hartlen-Synthese (Stoeber et al., 1968; Hartlen et al., 2008). Unterschiedliche Synthesemethoden resultieren in verschiedenen Partikelcoronas, welche die Partikelaufnahme und -lokalisierung beeinflusst (Charan et al. 2011; Fadeel et al. 2015). Nach einer 24-stündigen Exposition mit unterschiedlich synthetisierten Nano Silika zeigten Würmer einen morphologischen Ballonphänotyp des Darms und eine Akkumulation von fluoreszierenden Di-Peptidderivaten  $\beta$ -Ala-Lys-AMCA in Vesikeln in einzelnen Darmzellen. Dieser Ballonphänotyp wurde bei 50% der alternden Kontrollwürmer erst nach 12 Tagen beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei dem Nano Silika-induzierten Ballonphänotyp um einen Alterungsphänotyp des Darms handelt (Piechulek et al., 2019). Weiterhin wird vermutet, dass die beobachtete Akkumulation von Peptidvesikeln ebenfalls ein Alterungsphänotyp darstellt, da alternde Würmer vermehrt Lipidtropen und Vakuolen in einzelnen Darmzellen aufweisen, die normalerweise in jungen Würmern nicht beobachtet werden (Herndon et al., 2002; McGee et al., 2011). Bei einer Exposition mit dem Toxin von *Bacillus thuringiensis* weisen Nematoden einen ähnlichen Phänotyp im Darm auf (Marroquin et al., 2000), was auf einen ähnlichen Effekt hindeuten könnte.

Normalerweise werden Peptide über den vesikulären Transport von der apikalen Domäne zu Organellen und von da zur basolateralen Domäne transportiert oder für die Proteinbiosynthese verwendet (Sato et al., 2014). Die fluoreszierenden Di-Peptidderivate liegen dann diffus in den einzelnen Darmzellen der Kontrollwürmer

vor (Meissner et al. 2014; Piechulek et al., 2019). Durch den Einschluss der Peptide in Vesikeln sind diese jedoch nicht mehr für die Zelle und somit auch nicht mehr für die Proteinbiosynthese verfügbar. Long et al. (2002) zeigten, dass Würmer mit Mutationen im TOR (*target of rapamycin*) Signalweg auch Peptidvesikel aufweisen. Genau wie die Nano Silika-induzierten Peptidvesikel wachsen die Vesikel in TOR-defekten Wurmern über die Zeit an, während die Anzahl der Vesikel und das cytoplasmatische Volumen abnimmt (Long et al., 2002).

TOR gehört zu der Superfamilie der Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3K) und besteht aus den hochkonservierten Komplexen TORC1 und TORC2. Der TOR Signalweg agiert als Zell-intrinsischer Sensor und Regulator abhängig vom metabolischen Zustand, Stress, Verfügbarkeit von Aminosäuren und Insulin-ähnlichen Peptiden in verschiedenen Spezies (Wullschlegler et al., 2006; Saxton und Sabatini, 2017). TOR stimuliert die Proteinbiosynthese durch die Aktivierung der Translationsmaschinerie, u.a. die ribosomale S6 Kinase p70S6K und den Translationsinitiationsfaktor 4E Bindeprotein (4E-BP1) (Lawrence und Abraham, 1997; Long et al., 2002). Bei einer reduzierten Verfügbarkeit von Aminosäuren wird die Runterregulierung der Proteinbiosynthese durch eine reduzierte Aktivität von TOR vermutet. Dieses wiederum resultiert in einer reduzierten Aktivität von p70S6K und 4E-BP1 (Hara et al., 1998). 4E-BP1 bindet und reguliert die Verfügbarkeit des Cap-bindenden Proteins eIF-4E und dadurch die Translation von mRNAs (Sonenberg und Gingras, 1998). Diese mRNAs kodieren für Proteine, die das Wachstum und die Proliferation in *C. elegans* beeinflussen. Die Inaktivierung von Komponenten der Translationsmaschinerie, wie der eIF-2 Untereinheiten und eIF-4G, erzeugen denselben Phänotyp. Im Gegensatz dazu zeigen hungernde Würmer keine Peptidvesikel (Long et al. 2002).

Um die Peptidvesikel zu identifizieren, wurde die gleichzeitige Aufnahme von Rhodamin-markierten Nano Silika und dem fluoreszierenden Di-Peptidderivat beobachtet. Während Rhodamin-markierte Stoeber und HTFH Nano Silika im Darmlumen lokalisiert sind, translozieren Rhodamin-markierte Hartlen Nano Silika über den apikalen Endocytoseweg in Lysosomen-assoziierte Vesikel, die GG. Jedoch verbleiben Rhodamin-markierte Hartlen Nano Silika im Darmlumen von *pep-2* Mutanten, die eine Mutation im OPT-2/ PEP-2 Transporter haben. Das bedeutet, dass die Partikel Aufnahme der Hartlen Nano Silika in die Darmzelle vom OPT-2/

PEP-2 Transporter abhängt. Die GG mit den Harten Nano Silika kolokalisieren nicht mit den Peptidvesikeln. Ebenso konnte in *glo-1 und glo-3 (gut granule loss)* Mutanten die Formation von Peptidvesikeln beobachtet werden (Piechulek et al., 2019). Bei den Peptidvesikeln könnte es sich um membranlose Zellkompartimente handeln, sogenannte *liquid droplets* (Flüssigkeitstropfen), die sich durch Phasentrennung (LLPS; *liquid-liquid phase separation*) gebildet haben. Bei der Phasentrennung trennen sich homogene flüssige Phasen mit Makromolekülen in zwei distinkte Phasen. Die eine Phase ist angereichert mit speziellen Makromolekülen und die andere Phase ist arm an denselben Makromolekülen (Alberti und Dormann., 2019). Beispiele für membranlose Kompartimente sind Nucleoli im Nucleus, in denen die Ribosomenbiosynthese stattfindet, oder *stress granules*, die unter Stresszuständen in den Zellen gebildet werden (Hyman et al., 2014; Alberti und Dormann, 2019). Somit könnte es sich bei den Peptidvesikeln auch um distinkte Lagerorte in den Darmzellen handeln, die spezifisch verdaute Proteine und Peptide beinhalten (Piechulek et al., 2019). Mittels FRAP-Analysen (*fluorescence recovery after bleaching*) könnte die Diffusionsgeschwindigkeit und Mobilität der Peptide innerhalb der Vesikel überprüft werden. Sobald sich die Fluoreszenz und die Peptidvesikel nach einigen Sekunden wieder bilden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um Flüssigkeitstropfen handelt (Brangwynne et al., 2009; Hyman et al., 2014).

Um zu untersuchen, ob der Insulin/ IGF-1 Rezeptor (DAF-2) Signalweg (IIS) einen Einfluss auf den Effekt im Darm hat, wurden verschiedene, langlebige *daf-2* Mutanten und kurzlebige *daf-16 Mutanten* mit Nano Silika behandelt. *Daf-2 loss of function* Mutanten mit einer Mutation in der Tyrosin-Kinasedomäne zeigten kleinere Vesikel, die sich entlang der apikalen Plasmamembran anordneten, anstatt sich zufällig im Cytoplasma zu verteilen. Da eine Peptidvesikelformation beobachtet wurde, kann vermutet werden, dass der IGF-1 Rezeptor DAF-2 und somit der Insulinsignalweg keinen Einfluss auf die Formation selber hat, aber am apikalen Transport der Vesikel beteiligt sein könnte (Piechulek et al., 2019).

Bei einer reduzierten Verfügbarkeit von Aminosäuren wird über die Inhibition von TOR nicht nur die Initiation der Translation inhibiert, sondern auch die Ribosomenbiosynthese. Gleichzeitig wird die Proteindegradation und Autophagie induziert, so dass falsch gefaltete Proteine von der Zelle entsorgt werden können (Schmelzle und Hall, 2000). Zusammen mit dem IIS modulieren beide Signalwege

die Lebensspanne und die Stressresistenzen (Vellai et al. 2003; Meissner et al., 2004; Baumeister et al., 2006). Eine starke Inhibition des TOR Signalwegs über RNAi resultiert in einen Entwicklungsstopp der L3 Larve, wohingegen eine schwache Inhibition die Lebensspanne verlängert (Vellai et al. 2003). Weshalb also sterben mit Nano Silika behandelte Würmer früher als Kontrollwürmer (unpublizierte Beobachtungen) und zeigen gleichzeitig amyloide Strukturen sowohl global als auch in einzelnen Darmzellen (Scharf et al., 2013)? Es kann vermutet werden, dass ein Verschluss der Aminosäuren anstatt eine reduzierte Verfügbarkeit von Aminosäuren vorliegt. Hinzu kommt, dass die Nano Silika-induzierten Proteinaggregate Proteine beinhalten, die zu den Gen-Ontologie-Gruppen der Proteolyse, der Translation, rRNA Prozessierung und Stressantwort gehören. Sowohl der gestörte Peptidtransport als auch die Proteinaggregate unterbinden von zwei Seiten die Translation und Ribosomenbiosynthese in der Zelle (Scharf et al., 2016; Piechulek et al., 2019). Selbst wenn zu Beginn der Vesikelbildung noch Gene für die Stressantwort durch den Transkriptionsfaktor DAF-16 angeschaltet werden sollten, kann durch den Verschluss von Aminosäuren keine Proteinbiosynthese mehr stattfinden. Chen et al. (2008) zeigten in Epithelzellen, dass das UPS in Nano Silika-induzierten Proteinaggregaten aktiv ist, es jedoch zu keiner Degradation dieser Aggregate kam. Proteom- und Transkriptomanalysen an vulnerablen Zeitpunkten könnte Aufschluss über veränderte mRNA-Transkripte und Proteinexpressionen geben, die an metabolischen und neuralen Signalwegen oder Stressantworten beteiligt sind. Zusätzlich könnte eine Analyse der Zusammensetzung des Proteoms ein Ungleichgewicht in der Proteostase aufklären und wichtige Schlüsselproteine identifizieren (Golden et al., 2008; Walther et al., 2015). Walther et al. (2015) zeigten, dass in alternden Würmern ribosomale Proteine abnehmen und Komplexe des Proteasoms zunehmen, um der generellen Proteinaggregation entgegen zu wirken.

Um zu verifizieren, dass TOR inhibiert ist und Nano-Silika induzierte Proteinaggregate durch Autophagosomen degradiert werden, könnten Analysen der Autophagie in *C. elegans* durchgeführt werden. Bei einer Inhibierung von TOR wird die Autophagie aktiviert (Meléndez und Levine, 2002; Saxton und Sabatini, 2017). Anhand von RNAi sowie Expressions- und Fluoreszenzanalysen des Autophagosomenmarkerprotein LGG-1 können sowohl die Verteilung der

Autophagosomen als auch die veränderte Expression beobachtet werden (Zhang et al., 2015).

Eine reduzierte Translation könnte der Grund für die reduzierte Körperlänge von *C. elegans* sein. Die Körperlänge ist nicht signifikant unterschiedlich zur *pep-2* Mutante, die eine Mutation im OPT-2/ PEP-2 Transporter hat (Piechulek et al., 2019). Diese Mutation blockiert die Aufnahme von Peptiden in Darmzellen, wodurch sie im Darmlumen verbleiben (Meissner et al., 2004). Die Körperlänge könnte jedoch auch durch die Hyperaktivität oder Dysfunktion von Körperwandmuskelzellen verursacht sein. Mutationen in dem Kaliumkanal *unc-58* induzieren eine Hyperaktivität der Körperwandmuskelzellen, der Pharynxmuskeln, der Vulvamuskeln und des enteralen Muskels. Diese Hyperaktivität führt zu einer dauerhaften Kontraktion des Muskels, welcher dadurch verkürzt erscheint und somit zu einer kleineren Körpergröße (*dumpy*, *dpy* Phänotyp) führt und die Ursache von unkoordinierten Bewegungen und einer gestörten Eiablage ist (Reiner et al., 1995). Da der Pharynxmuskel auch betroffen ist, lässt sich vermuten, dass ebenso die Pumpfrequenz gestört ist. Vorherige Studien und diese Doktorarbeit zeigen, dass die Exposition von Nano Silika ebenfalls eine unkoordinierte Schwimmbewegung, eine reduzierte Pumpfrequenz, eine gestörte Eiablage und eine reduzierte Körpergröße induziert (Pluskota et al., 2009; Scharf et al., 2013; Scharf et al., 2016; Piechulek und von Mikecz, 2019; Piechulek et al., 2019). Da sich diese Nano Silika-induzierten Phänotypen mit den Phänotypen, die bei einer Hyperaktivität oder Dysfunktion von Körperwandmuskelzellen beobachtet werden, ähneln, kann vermutet werden, dass in Nano Silika-exponierten Würmern ebenfalls eine gestörte Muskelaktivität vorliegt.

Im Wurm steuern die ADF Neurone über einen ansteigenden Serotoninlevel das olfaktorische, aversive Lernverhalten bei einer Exposition mit einem pathogenen Bakterium (Zhang et al., 2005). Ebenso konnten Sakai et al. (2017) zeigen, dass TORC2 im Lernverhalten eine Rolle spielt. Wenn Würmer in einer Salzkonzentration gefüttert werden, kriechen sie immer zur Salzkonzentration. Jedoch meiden sie diese, wenn sie unter derselben Salzkonzentration gehungert haben. Bei einer Inhibierung von TORC2 wird dieses Lernverhalten aufgehoben. Diese Ergebnisse lassen eine Korrelation zwischen der Neurotransmission im ADF Neuron und der Aktivität von TOR vermuten. Wenn die serotonerge Neurotransmission durch die Exposition von Nano Silika und Nano Silber gestört und ebenso der TOR-Signalweg

inhibiert wird, könnte der Wurm Störungen im olfaktorischen Lernverhalten zeigen. Diese Erkenntnisse erfordern weitere Untersuchungen, da insbesondere AD Patienten Störungen in kognitiven Fähigkeiten sowie ein Gedächtnisverlust zeigen (Griffin et al., 2017).

Unabhängig davon, ob Nano Silika über den OPT-2/ PEP-2 Transporter in die GG von Darmzellen translozieren oder im Darmlumen verbleiben, verändern unterschiedlich synthetisierte NP die Morphologie von Darmzellen und interferieren mit dem Peptidtransport. Jedoch bleibt unklar, ob und wie hinzugefügte Nano Silika in Lebensmitteln und Medikamenten auf die Darmzellen im Menschen reagieren. Im Gegensatz zu NP zeigten 500 nm-große Partikel keinen Effekt auf dem Darm. Die Kontrolle mit den 500 nm-großen Partikeln bedeutet, dass es sich bei den beobachteten Effekten um Nano Silika-induzierte Interaktionen handelt und nicht um Effekte, die ausschließlich von Silika Partikeln ausgehen (Piechulek et al., 2019).

### **4.3 Beurteilung der verwendeten NP-Konzentrationen**

Umweltrelevante NP, wie Nano Ag und Nano Silika, werden von Würmern aufgenommen und translozieren in das Pharynxgewebe sowie einzelne Darm- und Vulvazellen, wo sie die Funktion der Organe stören. Die Beobachtungen über die komplette Lebensspanne identifizieren früh auftretende Alterungsphänotypen in Populationen (Pluskota et al., 2009; Scharf et al., 2013; Piechulek und von Mikecz, 2018; Piechulek und von Mikecz, 2019). Anhand von quantitativen Analysen wurde die Konzentration bestimmt, bei der 50% der untersuchten Population einen Alterungsphänotyp zeigt. Diese Konzentration wird als *Aging Dosis<sub>50</sub>* (*AD<sub>50</sub>*, Alterungsdosis) definiert und als Parameter zur Identifizierung von toxischen Substanzen verwendet, die das Altern beschleunigen und die allgemeine Fitness reduzieren. Die Analyse ermöglichen zusätzlich die Bestimmung des Alters der betroffenen Population und durch Titration der Noxe die Bestimmung der toxischen Konzentration (Piechulek und von Mikecz, 2019).

Bei einer Exposition von 1250 µg/ mL Nano Silika zeigen 50% der exponierten Population an Tag 5 eine reduzierte Schwimmbewegung, die normalerweise erst in alten Würmern auftritt (Piechulek und von Mikecz, 2019). Die Titration von Nano Silika in Bezug auf einen Defekt im Peptidtransport ergab einen LOAEL (*lowest observed adverse effect*, niedrigsten beobachteten negativen Effekt) von 80 µg/ mL

(Piechulek et al., 2019). Beide Konzentrationen sind zwar höher als die kalkulierten Konzentrationen von Nano Silika im Sediment (jährlichen Anstieg von 6,7 mg/ kg) und auf mit Klärschlamm gedüngten Feldern (jährlicher Anstieg von 6300 µg/ kg), jedoch werden die Konzentrationen im Klärschlamm schon auf 940 mg/ kg geschätzt (Wang et al., 2016), was bereits das 10fache über dem LOAEL-Wert ist. Das regelmäßige Düngen von Feldern mit Nano Silika belastetem Klärschlamm kann somit negative Auswirkungen auf den Bodenorganismus *C. elegans* und andere Nematoden auf Feldern haben, was zu einem Ungleichgewicht im terrestrischen Ökosystem führen würde. Während NP in Umweltkompartimenten akkumulieren können und damit ein Risiko für Flora, Fauna und Mensch darstellen, können Nano Silika zusätzlich noch als Additiv von Lebensmitteln oder Medikamenten direkt vom Menschen im Darm aufgenommen werden (Wang et al., 2016). Die konkreten Konzentrationen von Nano Silika in Lebensmitteln oder Medikamenten sind weitgehend unbekannt. Jedoch erlauben die Europäische Union ein Maximum von 1% Silika und die *United States Food and Drug Administration* bis zu 2% Silika pro Gewicht in Lebensmitteln (European Union 2011; US FDA 2015).

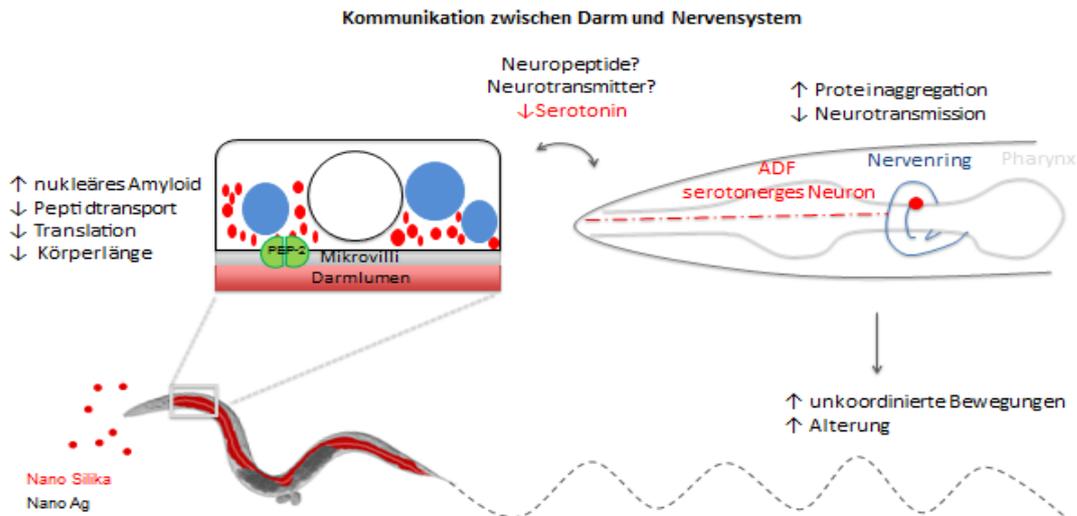
Im Vergleich zu Nano Silika werden die Konzentrationen von Nano Ag in der Umwelt als relativ gering eingeschätzt und belaufen sich auf 30 µg/ kg im Sediment bis 61 µg/ kg in Deponien und 79 µg/ kg im Klärschlamm (Sun et al., 2016). Alterungsphänotypen wurden jedoch erst bei 10 µg/ mL Nano Ag beobachtet und können momentan als nicht umweltrelevant eingeschätzt werden (Piechulek und von Mikecz, 2018). Bei einer steigenden Produktion und Disposition von NP oder NP-enthaltenden Produkten kann aber auch mit einer steigenden Akkumulation von Nano Ag in Umwelt-Senken gerechnet werden.

Bei Nano Ag wird vermutet, dass besonders die dissoziierenden  $Ag^+$  Ionen toxische Effekte auslösen oder eine Kombination aus dissoziierten  $Ag^+$  Ionen und NP Funktionen der Organe beeinträchtigt. Bei der Freisetzung von NP in die Umwelt können diese ihre ursprünglich physikalischen und chemischen Eigenschaften verändern (Mitrano et al., 2015). In Kläranlagen transformieren Nano Ag zu  $Ag_2S$ , die somit kaum  $Ag^+$  Ionen freisetzen und weniger toxisch sind (Wijnhoven et al., 2009). Bei Nano Silika hingegen erfolgen Veränderungen an der Oberflächenzusammensetzung, was mit dem toxischen Potential korreliert (Mitrano et al., 2015). Unabhängig von der Synthesart der Nano Silika und ihrer zellulären

Lokalisation induzieren alle Nano Silika eine Akkumulation von Peptidvesikeln, die über die Zeit wachsen und den Peptidtransport innerhalb der Darmzelle inhibieren. (Piechulek et al., 2019). In Zukunft sollten verschiedene NP Transformationen berücksichtigt werden, um sowohl die Interaktionen der NP mit der Umwelt besser zu verstehen als auch die zelluläre Lokalisation, Interaktion mit anderen Proteinen und deren generellen Auswirkungen auf die Zelle und den ganzen Organismus beurteilen zu können (Nel et al., 2009; He et al., 2015)

#### **4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen**

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass bestimmte NP, wie Nano Ag und Nano Silika, altersabhängige Prozesse beschleunigen, die zu Neurodegenerationen und somit zu Verhaltensdefekten führen. Die Beobachtungen in der kumulativen Doktorarbeit (Piechulek und von Mikecz, 2018; Piechulek und von Mikecz, 2019; Piechulek et al., 2019) unterstützen die Ergebnissen aus vorherigen Studien (Pluskota et al., 2009; Scharf et al., 2013; Scharf et al., 2016). Das sensorische Amphidneuron ADF scheint besonders vulnabel gegenüber Nano Ag zu sein, da im Vergleich zum HSN oder GABAergen Neuronen früher Proteinaggregate beobachtet wurden. Außerdem korreliert die Proteinaggregation mit einer Abnahme von Schwimmbewegungen und einer Zunahme von unkoordinierten Bewegungen (Piechulek und von Mikecz, 2018; Piechulek und von Mikecz, 2019). Gleichzeitig führt die Exposition von Nano Silika zu morphologischen Veränderungen des Darms und einem veränderten Peptidtransport. Sowohl der defekte Peptidtransport als auch die Induktion von amyloiden Strukturen in Nucleoli der Darmzellen führen zu einer reduzierten Translation und Ribosomenbiosynthese, was für eine kleine Körpergröße verantwortlich sein könnte (Scharf et al., 2013; Scharf et al., 2016; Piechulek et al., 2019). Trotz des aktiven UPS sind die Epithelzellen nicht in der Lage Nano Silika-induzierte Proteinaggregate zu degradieren (Chen et al., 2008). Die Ergebnisse stimmen mit Ergebnissen von van Ham et al. (2008) überein, dass sowohl die Qualitätskontrolle als auch der vesikuläre Peptidtransport für die Aufrechterhaltung der Proteostase in der Zelle wichtig sind. Weiterhin gefährden Proteinaggregate in Neuronen und ein gestörter Peptidtransport die Kommunikation zwischen Darm und Nervensystem (Abb.7).



**Abb. 7 Zusammenfassung der NP-induzierten Effekte auf den Darm und das Nervensystem im Wurm *C. elegans*.**

Die Aufnahme von Nano Silika und Nano Silber hat Auswirkungen auf die Funktion der Darmzellen und das Nervensystem. Nano Silika induzieren die Bildung von nukleärem Amyloid und stören den Peptidtransport. Beide Effekte wirken sich auf die Translation aus und inhibieren diese, was zu einer reduzierten Körperlänge führt. Bei einer Störung der Proteostase und des Peptidtransports stellt sich die Frage, ob die Kommunikation zwischen Darm und Nervensystem noch besteht. In serotonergen Neuronen wurde eine Proteinaggregation und gestörte Neurotransmission in Nano Silika und Nano Ag-exponierten Würmern festgestellt. Die Proteinaggregation korreliert mit einem Anstieg von unkoordinierten Bewegungen und lässt den Wurm früher altern.

Neben Serotonin werden in den ADF Neuronen auch Neuropeptide und Insulin-ähnliche Peptide exprimiert, die an den DAF-2 Rezeptor binden können (Nathoo et al., 2001; Kodama et al., 2006; Li und Kim, 2008; Jafari et al., 2011; Kimura et al. 2011). Die Proteinaggregation in serotonergen Neuronen lässt vermuten, dass auch Peptide aggregieren und es somit zu einer reduzierten Aktivität des IIS kommt. Eine Reduzierung des IIS würde den Transkriptionsfaktor DAF-16 aktivieren und zu einer Translokation in den Zellkern führen. DAF-16 ist in verschiedenen Geweben aktiv, wie Muskeln und Neuronen, aber überwiegend im Darm (Ogg et al., 1997; Henderson und Johnson, 2001; Murphy und Hu, 2013). Transgene Reporterwürmer und Proteom- sowie Transkriptomanalysen können zukünftig zeigen, ob DAF-16 in den Zellkern transloziert und dort die Expression von Proteinen induziert, die in der Stressantwort notwendig sind (Henderson und Johnson, 2001). Beispiele dafür wären die Expression von Superoxiddismutase (SOD-3) bei oxidativem Stress, heat shock Proteine (HSP-16; HSP-12.6) bei proteolytischem Stress und Cytochrome P450, um die Detoxifizierungsprogramme einzuleiten (Honda und Honda, 1999; Hsu

et al., 2003; McElwee et al., 2004; Cohen et al., 2006; Oh et al., 2006; Murphy und Hu, 2013).

Nanopartikel beeinflussen die Interaktion zwischen Proteostase und Neuropeptidsignalweg und stören somit nicht nur die Proteinbiosynthese in der einzelnen Darmzelle, sondern auch die Kommunikation zwischen dem Darm und dem Nervensystem im Wurm. Es sind weitere nanotoxikologische Analysen erforderlich, um die NP-induzierten Alterungsprozesse zu charakterisieren und besser zu verstehen.

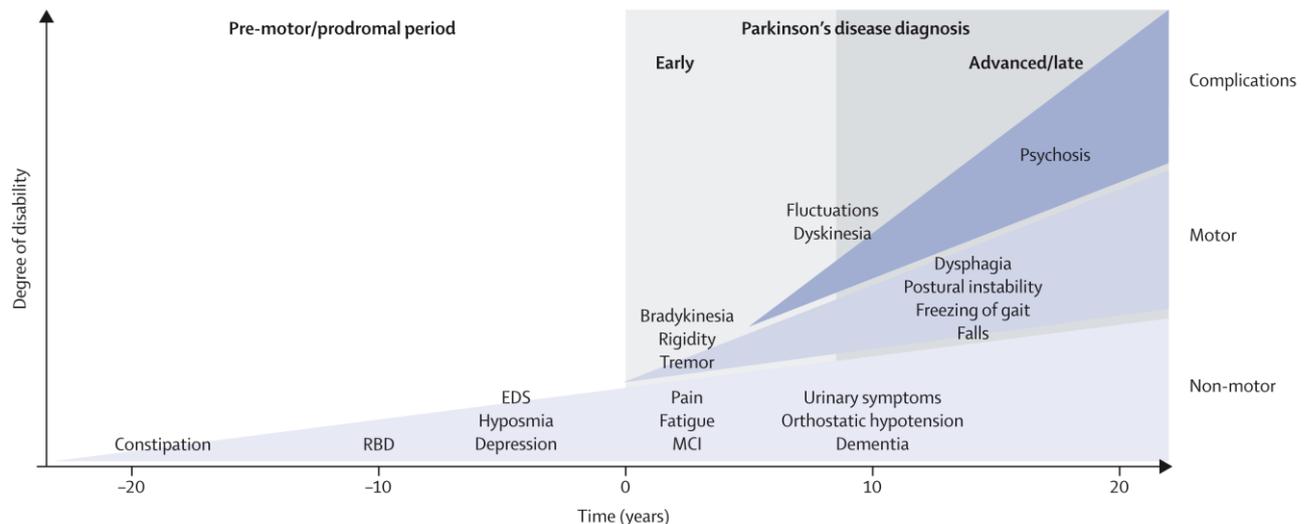
Die Ergebnisse in dieser Doktorarbeit zusammen mit vorheriger Studien zeigen Alterungsphänotypen, die Symptomen in neurodegenerativen Erkrankungen, wie PD, ähneln (Tabelle 1). Frühe nicht-motorische Symptome bei PD Patienten sind olfaktorische Defekte und Obstipation. Anschließend folgen oft motorische Symptome, wie Zittern und Muskelrigidität, Proteinaggregationen und die damit zusammenhängende Neurodegeneration (Klingelhoefer und Reichman, 2015; Santos et al., 2019). Bei einem Vergleich von NP-induzierten Alterungsphänotypen von *C. elegans* und pathologischen Prozessen von PD Patienten lassen sich erstaunliche Gemeinsamkeiten feststellen, wie beispielweise Defekte in sensorischen Neuronen, Proteinaggregation und Neurodegeneration, sowie gestörte Bewegungen. Das Darmmikrobiom in *C. elegans* wurde nicht untersucht, jedoch könnte eine Nano Silika-induzierte Störung im Peptidtransport schon einen Hinweis auf eine Störung der Darmfunktion geben.

**Tabelle 1. Vergleich von NP-induzierten Alterungsphänotypen und Symptome in PD Patienten**

<i>C. elegans</i>	Mensch
Defekte im sensorischen ADF Neuron	olfaktorische Defekte
veränderte Darmmorphologie und -funktion	verändertes Darmmikrobiom und Verstopfung
Proteinaggregation	Proteinaggregation
gestörte Neurotransmission	Neurodegeneration
gestörte Bewegung und Steifheit	gestörte Bewegung und Steifheit

Der Krankheitsverlauf bei PD Patienten und die Reihenfolge der auftretenden Symptome ist soweit bekannt. (Abb. 8). Im Prodromalstadium der Krankheit zeigen

sich vornehmlich nicht-motorische Symptome, wie z.B. Obstipation oder Schlafstörungen. Diese werden teilweise schon 20 Jahre vor der eigentlichen PD Diagnose (Zeitpunkt 0) beobachtet. Sobald motorische Symptome, wie Bradykinesie, Rigidität (= Steifheit) und Tremor, hinzukommen und sich weiter verstärken, wird mit hoher Wahrscheinlichkeit die Parkinson Erkrankung diagnostiziert. Therapien mit Dopamin können Komplikationen, wie Dyskinesie und Psychosen, hervorrufen (Kalia und Lang, 2015).



**Abb. 8 Zeitachse der klinischen Symptome in der Parkinson Erkrankung**

Gewöhnlich erfolgt die Diagnose für der Parkinson Erkrankung zum Zeitpunkt 0, wenn die motorischen Symptome, wie Bradykinesie, Rigidität und Tremor, eintreten. 20 Jahre vor der Parkinson Diagnose können aber schon nicht-motorische Symptome, wie Verstopfung oder Schlafstörungen, auftreten. Sobald motorische Symptome auftauchen, können weitere nicht-motorische Symptome, wie Müdigkeit, Demenz und Probleme mit dem Harnsystem, ebenfalls zunehmen. In der fortgeschrittenen Parkinson Erkrankung folgen schließlich auch weitere motorische Symptome, wie eine posturale Instabilität und es kommt immer häufiger zu Stürzen. Therapien mit Dopamin können verschiedene Komplikationen hervorrufen, wie Dyskinesie und Psychosen (übernommen von Kalia und Lang, 2015).

Bei *C. elegans* ist die chronologische Reihenfolge der NP-induzierten Alterungsphänotypen nicht bekannt. Weiterhin stellt sich die Frage, ob es eine chronologische Reihenfolge gibt oder ob die NP-Bio-Interaktionen teilweise unabhängig und/ oder gleichzeitig auftreten.

Im Vergleich zum Wurm erfolgt die Kommunikation zwischen dem Darm und dem Gehirn im Menschen über das enterische Nervensystem (ENS) bzw. über den Vagusnerv (Santos et al., 2019). Klingelhoefer und Reichmann (2015) vermuten einen Zusammenhang zwischen den Eintrittspforten von Umweltschadstoffen, wie Pestiziden, und der Ausbreitung von neurodegenerativen Pathologien/

Proteinaggregaten über das olfaktorische System und dem ENS im Darm über einen trans-synaptischen Zell-zu-Zelltransfer ins Gehirn. Die Kommunikation zwischen dem Darm und dem Gehirn erfolgt zusätzlich noch über den hormonellen Weg und zwar über das lymphatische System und den Blutkreislauf (Powell et al., 2017; Santos et al., 2019). Bestimmte chemosensorische Darmepithelzellen, die enteroendokrinen Zellen, haben einen direkten Kontakt zum Vagusnerv und sezernieren Peptide, Neurotransmitter und Hormone, welche als Signalmoleküle zwischen dem Gehirn und dem Darmmikrobiom interagieren (Hoffman and Lumpkin, 2018; Kaelberer et al., 2018).

Im Wurm hingegen ist der Darm nicht innerviert. Die Kommunikation zwischen dem Darm und dem Nervensystem erfolgt ausschließlich über den hormonellen Weg über Neuropeptide und Neurotransmitter (Li und Kim, 2008), so dass neurodegenerative Prozesse im ENS nicht untersucht werden können. Mit Hilfe von Reporterwürmern kann jedoch untersucht werden, ob die Expression von Neuropeptide und/ oder Neurotransmitter verändert und somit die Kommunikation zwischen dem Darm und dem Nervensystem gestört ist (Nathoo et al., 2001; Nass et al., 2002, Tanis et al., 2008; Scharf et al., 2016; Piechulek und von Mikecz, 2019).

## 5 Ausblick

Die Ergebnisse der Dissertation und vorheriger Studien lassen darauf schließen, dass die Translation durch die Exposition von Nano Silika von zwei Seiten verstärkt inhibiert wird. Nano Silika unterbinden den Peptidtransport und somit die Verfügbarkeit von Aminosäuren in der Zelle und induzieren die Bildung von amyloiden Strukturen in Nucleoli (Scharf et al., 2013; Piechulek et al., 2019). Folglich stellt sich die Frage, ob die gestörte Proteostase die Synthese und Freisetzung von Neurotransmittern und Neuropeptiden inhibiert, was wiederum die Kommunikation zwischen Darm und Nervensystem stört. Fluoreszenzanalysen der Expression von Neuropeptiden würden Aufschluss über die Verteilung der Neuropeptide in Neuronen geben (Nathoo et al., 2001). Proteom- und Transkriptomanalysen wiederum würden eine Reduktion der globalen Translation identifizieren, aber auch Schlüsselproteine aus Signalwegen erkennen, um Stressantworten und schützende Mechanismen einzuleiten (Walther et al., 2015; Viau et al., 2020).

In einem PD Wurmmodell zeigten Goya et al. (2020), dass der probiotische *Bacillus subtilis* den Wurm vor  $\alpha$ -Synuclein Aggregaten schützt, indem er schützende Signalwege aktiviert, wie den DAF-16/ FOXO und den Sphingolipidmetabolismus. Diese Resultate zeigen Möglichkeiten der Degradation von Proteinaggregaten für therapeutische Zwecke und implizieren die Berücksichtigung der Analyse und Beobachtung des Darmmikrobioms, um den Mechanismus der Proteinaggregation zu verstehen.

Eine weitere Frage ist, inwiefern die beobachteten Proteinaggregationen im ADF Neuron mit den unkoordinierten Bewegungen von *C. elegans* zusammenhängen. Die neuromuskulären Schaltkreise können auf neuraler und muskulärer Ebene untersucht werden. Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase oder auch EAT-6 (eating: *abnormal pharyngeal pumping*) ist in *C. elegans* an der neuromuskulären Synapse der Körperwandmuskelzellen lokalisiert und moduliert die Neurotransmission von ACh in Abhängigkeit von Serotonin und somit die Bewegung. Mit Hilfe von transgenen Würmern sowie der Zugabe von Inhibitoren der cholinergen Neurotransmission könnte die Verteilung von ACh an der Synapse erste Hinweise geben, ob ACh akkumuliert und an unkoordinierten Bewegungen beteiligt ist (Doi und Iwasaki, 2008; Govorunova et al., 2010). In alternden Würmern gehen Einschränkungen der

Bewegung mit einem muskulären Zerfall einher. Die Morphologie der Körperwandmuskelzellen kann in transgenen Würmern beobachtet werden. Der Anstieg von desorganisierten Sarkomeren korreliert dabei mit unkoordinierten Bewegungen (Herndon et al., 2002).

## Literaturverzeichnis

- Alberti S und Dormann D** (2019) Liquid–Liquid Phase Separation in Disease. *Annu Rev Genet.* 53:171-194
- Allen EN, Ren J, Zhang Y, Alcedo J** (2015) Sensory systems: their impact on *C. elegans* survival. *Neuroscience* 296: 15-25
- Altun ZF und Hall DH** (2010) Nervous system, neuronal support cells. In *WormAtlas*
- Avery L und Thomas JH** (1997) Feeding and Defecation In: *C. elegans* II. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; Chapter 24
- Avery L und Shtonda BB** (2003). Food transport in the *C. elegans* pharynx. *J. Exp. Biol.* 206, 2441–2457
- Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW** (2008) Adapting Proteostasis for Disease Intervention. *Science*, 319(5865):916-9
- Bargmann CI** (1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 282:2028–2033
- Baumeister R, Schaffitzel E, Hertweck M** (2006) Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity. *J Endocrinol.* 190(2):191-202
- Bencsik A, Lestaevel P, Canu IG** (2018) Nano- and neurotoxicology: An emerging discipline. *Prog Neurobiol*, 160, 45-63
- Brangwynne CP, Eckmann CR, Courson DS, Rybarska A, Hoegel C, Gharakhani J, Jülicher F, Hyman AA** (2009) Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science* 324:1729–32
- Brenner S** (1973) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 77: 71-94
- Calderón-Garcidueñas L, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Delgado-Chávez R, Mukherjee PS, Kulesza RJ, Torres-Jardón R, Ávila-Ramírez J, Villarreal-Ríos R** (2018) Hallmarks of Alzheimer disease are evolving relentlessly in Metropolitan Mexico City infants, children and young adults. APOE4 carriers have higher suicide risk and higher odds of reaching NFT stage V at ≤ 40 years of age. *Environ Res*, 164, 475-487
- Calderón-Garcidueñas L, Reynoso-Robles R, González-Maciel A** (2019) Combustion and friction-derived nanoparticles and industrial-sourced T nanoparticles: The culprit of Alzheimer and Parkinson's diseases. *Environ Res*, 176:108574
- Canton I und Battaglia G** (2012) Endocytosis at the Nanoscale. *Chem Soc Rev.* 41(7):2718-39
- Cao Z, Stowers C, Rossi L, Zhang W, Lombardini L, Ma X** (2017) Physiological effects of cerium oxide nanoparticles on the photosynthesis and water use efficiency of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) *Environ. Sci.: Nano*, 4, 1086
- Cassee FR, van Balen EC, Singh C, Green D, Muijsers H, Weinstein J, Dreher K** (2011) Exposure, health and ecological effects Review of engineered nanoscale cerium and cerium oxide associated with its use as a fuel additive. *Crit Rev Toxicol*, 41 (3), 213-29

- Charan S, Chien FC, Singh N, Kuo CW, Chen P** (2011) Development of Lipid Targeting Raman Probes for in Vivo Imaging of *Caenorhabditis elegans*. *Chemistry - A European Journal* 17(18): 5165–5170
- Chase DL und Koelle MR** (2007) Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.132.1
- Chen und von Mikecz** (2005) Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Exp Cell Res*, 305 (1), 51-62
- Chen M, Singer L, Scharf A, von Mikecz A** (2008) Nuclear polyglutamine-containing protein aggregates as active proteolytic centers. *J Cell Biol.* 180(4):697-704
- Chew YL, Fan X, Götz J, Nicholas HR** (2013) Aging in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Communicative & Integrative Biology* 6:5, e25288
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL** (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*, 22(5):442-51
- Ciechanover A und Kwon YT** (2017) Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration. *Front Neurosci*, 11:185
- Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW, Dillin A** (2006) Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science* 313, 1604-1610
- Cohen E, Yemini E, Schafer W, Feitelson DG, Treinin M** (2012) Locomotion analysis identifies roles of mechanosensory neurons in governing locomotion dynamics of *C. elegans*. *J Exp Biol.* 215(Pt 20):3639-48
- Collins JJ, Huang C, Hughes S, Kornfeld K** (2008) The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*. ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.137.1
- Corsi AK, Wightman B, Chalfie M** (2015) A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200 (2), 387-407
- Cuervo AM und Wong E** (2014) Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res*, 24(1):92-104
- David DC, Ollikainen N, Trinidad JC, Cary MP, Burlingame AL, Kenyon C** (2010) Widespread Protein Aggregation as an Inherent Part of Aging in *C. elegans*. *PLoS Biol*, 8(8):e1000450
- De Bono M und Bargmann CI** (1998) Natural variation in a neuropeptide Y receptor homolog modifies social behavior and food response in *C. elegans*. *Cell.* 94: 679-689
- Doi M und Iwasaki K** (2008) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase regulates the expression and localization of acetylcholine receptors in a pump activity-independent manner. *Mol Cell Neurosci* 38: 548–558
- Doolette CL, Gupta VVSR, Lu Y, Payne JL, Batstone DJ, Kirby JK, Navarro DA, McLaughlin MJ** (2016) Quantifying the sensitivity of soil microbial communities to silver sulfide nanoparticles using metagenome sequencing. *PLoS One*, 11 (8), e0161979
- Douglas PM and Dillin A** (2010) Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *J Cell Biol*, 190(5):719-29

- Edwards RH** (1998) Neurotransmitter release: variations on a theme. *Curr Biol* 8:R883–R885
- European Union** (2011) Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 Amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by Establishing a Union List of Food Additives. *Official Journal of the European Union* 295: 1–177
- Fadeel B, Fornara A, Toprak MS, Bhattacharya K** (2015) “Keeping It Real: The Importance of Material Characterization in Nanotoxicology.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468(3): 498–503. doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.178
- Félix A und Braendle C** (2010) The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*. 20: R965-R969
- Friedman DB und Johnson TE** (1988) Three mutants that extend both mean and maximum life span of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, define the *age-1* gene. *J. Gerontol.* 43(4):B102–9
- Golden TR, Hubbard A, Dando C, Herren MA, Melov S** (2008) Age-related behaviors have distinct transcriptional profiles in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* 7(6):850-65.
- Goodman MB** (2006) Mechanosensation, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.62.1
- Govorunova EG, Moussaif M, Kullyev A, Nguyen KC, McDonald TV, Hall DH, Sze JY** (2010) A Homolog of FHM2 Is Involved in Modulation of Excitatory Neurotransmission by Serotonin in *C. elegans*. *PLoS One.* 5(4):e10368
- Goya ME, Xue F, Sampedro-Torres-Quevedo C, Arnauteli S, Riquelme-Dominguez L, Romanowski A, Brydon J, Ball KL, Stanley-Wall NR, Doitsidou M** (2020) Probiotic *Bacillus subtilis* Protects against  $\alpha$ -Synuclein Aggregation in *C. elegans*. *Cell Rep.* 30(2):367-380.e7
- Gray J und Lissmann** (1964) The locomotion of nematodes. *J Exp Biol*, 41, 135-54
- Griffin EF, Caldwell KA, Caldwell GA** (2017) Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer’s Disease Using *Caenorhabditis elegans*. *ACS Chem Neurosci.* 8(12):2596-2606
- Hamer G, Matilainen O, Holmberg CI** (2010) A photoconvertible reporter of the ubiquitin-proteasome system *in vivo*. *Nat Methods*, 7(6):473-8
- Hansen SF, Heggelund LR, Besora PR, Mackevica A, Boldrin A, Baun B** (2016) Nanoproducts – what is actually available to European consumers? *Environ. Sci.: Nano*, 3, 169-180
- Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J** (1998) Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem.* 273(23):14484-94
- Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M** (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356):324-32
- Hartlen KD, Athanasopoulos AP, Kitaev V** (2008) Facile Preparation of Highly Monodisperse Small Silica Spheres (15 to >200 nm) Suitable for Colloidal Templating and Formation of Ordered Arrays. *Langmuir* 24(5): 1714–1720

- He X, Aker WG, Fub PP, Hwang HM** (2015) Toxicity of engineered metal oxide nanomaterials mediated by nano–bio–eco–interactions: a review and perspective. *Environ. Sci.: Nano*, 2, 564-582
- Hemmerich PH und von Mikecz AH** (2013) Defining the subcellular interface of nanoparticles by live-cell imaging. *PLoS One*.8(4):e62018
- Henderson ST und Johnson TE** (2001). *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 11, 1975-1980
- Hermann GJ, Schroeder LK, Hieb CA, Kershner AM, Rabbitts BM, Fonarev P, Grant BD, Priess JR** (2005) Genetic Analysis of Lysosomal Trafficking in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*, 16 (7), 3273-88
- Herndon LA, Schmeissner PJ, Dudaronek JM, Brown PA, Listner KM, Sakano Y, Paupard MC, Hall DH, Driscoll M** (2002) Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature* 419: 808-814
- Herndon LA, Wolkow CA, Driscoll M, Hall DH** (2017) Effects of ageing on the basic biology and anatomy of *C. elegans*. In *Ageing: lessons from C. elegans*. (ed Olsen, A. and Gill, M.). Chapter 2. pp. 9-39. Springer International, Switzerland
- Hoffman BU und Lumpkin EA** (2018) A gut feeling. *Science*, 361 (6408), 1203-1204
- Honda Y und Honda S** (1999). The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 13, 1385-1393
- Hsu AL, Murphy CT, Kenyon C** (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300, 1142-1145
- Huang C, Wagner-Valladolid S, Stephens AD, Jung R, Poudel C, Sinnige T, Lechler MC, Schlörit N, Lu M, Laine RF, Michel CH, Vendruscolo M, Kaminski CF, Kaminski Schierle GS, David DC** (2019) Intrinsically aggregation-prone proteins form amyloid-like aggregates and contribute to tissue aging in *Caenorhabditis elegans*. *Elife*, 8:e43059
- Hyman AA, Weber CA, Jülicher F** (2014) Liquid-Liquid Phase Separation in Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 30:39-58
- Irazoqui JE, Urbach JM, Ausubel FM** (2010) Evolution of Host Innate Defence: Insights From *Caenorhabditis elegans* and Primitive Invertebrates. *Nat Rev Immunol*, 10 (1), 47-58
- Jafari G, Xie Y, Kullyev A, Liang B, Sze JY** (2011) Regulation of Extrasynaptic 5-HT by Serotonin Reuptake Transporter Function in 5-HT-Absorbing Neurons Underscores Adaptation Behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci.* 31(24):8948-57
- Jung SK, Qu X, Aleman-Meza B, Wang T, Riepe C, Liu Z, Li Q, Zhong W** (2015) Multi-endpoint, high-throughput study of nanomaterial toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci Technol.* 49(4):2477-85
- Kalia LV und Lang AE** (2015) Parkinson's disease. *Lancet.* 386(9996):896-912
- Kaelberer MM, Buchanan KL, Klein ME, Barth BB, Montoya MM, Shen X, Bohórquez DV** (2018) A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Science*, 361 (6408)

- Keller AA, McFerran S, Lazareva A, Suh S** (2013) Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J Nanopart Res*, 15:1692
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R** (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366(6454):461–64
- Kiffin R, Christian C, Knecht E, Cuervo AM** (2004) Activation of Chaperone-mediated Autophagy during Oxidative Stress. *Mol Biol Cell*, 15(11):4829-40
- Kimura KD, Riddle DL, Ruvkun G** (2011) The *C. elegans* DAF-2 insulin-like receptor is abundantly expressed in the nervous system and regulated by nutritional status. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 76:113-20
- Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU** (2018) Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J Cell Biol*, 217(1):51-63
- Klingelhoefer L und Reichmann H** (2015) Pathogenesis of Parkinson disease—the gut–brain axis and environmental factors. *Nat Rev Neurol*, 11 (11), 625-36
- Kodama E, Kuhara A, Mohri-Shiomi A, Kimura KD, Okumura M, Tomioka M, Iino Y, Mori I** (2006) Insulin-like signaling and the neural circuit for integrative behavior in *C. elegans*. *Genes Dev.* 20(21):2955-60.
- Koga H, Kaushik S, Cuervo AM** (2011) Protein Homeostasis and Aging: the importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev*, 10(2): 205–215
- Labousse M** (2006) Epithelial junctions and attachments. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, doi/10.1895/wormbook.1.56.1
- Lawrence JC Jr und Abraham R** (1997) PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation. *Trends Biochem Sci.* 22(9):345-9
- Lee K und Mylonakis E** (2017) An Intestine-Derived Neuropeptide Controls Avoidance Behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Rep*, 20 (10), 2501-2512
- Lehane MJ** (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.* 42, 525–550
- Li C, Kim K, Nelson LS** (1998). FMRFamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Brain Res.* 848, 26–34
- Li W, Kennedy SG, Ruvkun G** (2003). *daf-28* encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway. *Genes Dev.* 17, 844–858
- Li C und Kim K** (2008) Neuropeptides, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.142.1, <http://www.wormbook.org>.
- Long X, Spycher C, Han ZS, Rose AM, Müller F, Avruch J** (2002) TOR Deficiency in *C. elegans* Causes Developmental Arrest and Intestinal Atrophy by Inhibition of mRNA Translation. *Curr Biol.* 12(17):1448-61.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G.** (2013) The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6):1194-217

- Maher BA, Ahmed IAM, Karloukovski V, MacLaren DA, Foulds PG, Allsop D, Mann DMA, Torres-Jardón R, Calderon-Garciduenas L** (2016) Magnetite pollution nanoparticles in the human brain. *PNAS U S A*, 113 (39), 10797-801
- Marroquin LD, Elyassnia D, Griffiths JS, Feitelson JS, Aroian RV** (2000) *Bacillus thuringiensis* (Bt) Toxin Susceptibility and Isolation of Resistance Mutants in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 155(4):1693-9.
- McElwee JJ, Schuster E, Blanc E, Thomas JH, Gems D** (2004). Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* Dauer larvae and long-lived daf-2 mutants implicates detoxification system in longevity assurance. *J. Biol. Chem.* 279, 44533-44543
- McGee MD, Weber D, Day N, Vitelli C, Crippen D, Herndon LA, Hall, DH, Melov S** (2011) Loss of intestinal nuclei and intestinal integrity in aging *C. elegans*. *Aging Cell* 10:699-710
- McGhee JD** (2007) The *C. elegans* intestine, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.133.1, <http://www.wormbook.org>.
- McGhee JD, Sleumer MC, Bilenky M, Wong K, McKay SJ, Goszczynski B, Tian H, Krich N, Khattrra J, Holt RA, Baillie DL, Kohara Y, Marra MA, Jones SJM, Moerman DG, Robertson AG** (2007). The ELT-2 GATA-Factor and the Global Regulation of Transcription in the *C. elegans* Intestine. *Dev. Biol.* 302, 627–645
- Meissner B, Boll M, Daniel H, Baumeister R** (2004) Deletion of the intestinal peptide transporter affects insulin and TOR signaling in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 279(35):36739-45
- Meléndez A und Levine B** (2009) Autophagy in *C. elegans*. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.147.1, <http://www.wormbook.org>.
- Melo JA und Ruvkun G** (2012) Inactivation of conserved *C. elegans* genes engages pathogen- and xenobiotic-associated defenses. *Cell* 149:452–466
- Menzies FM, Fleming A, Rubinsztein DC** (2015) Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 16(6):345-57
- Miller KG, Alfonso A, Nguyen M, Crowell JA, Johnson CD, Rand JB** (1996) A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *PNAS U S A*. 93(22):12593-8
- Mitrano DM, Motellier S, Clavaguera S, Nowack B** (2015) Review of nanomaterial aging and transformations through the life cycle of nano-enhanced products. *Environ Int.* 77:132-47
- Nass R, Hall DH, Miller DM 3rd, Blakely RD** (2002) Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS U S A*. 99(5):3264-9
- Nathoo AN, Moeller RA, Westlund BA, Hart AC** (2001). Identification of neuropeptide-like protein gene families in *Caenorhabditis elegans* and other species. *PNAS. U.S.A.* 98, 14000–14005
- Neher DA** (2001) Role of Nematodes in Soil Health and Their Use as Indicators. *J Nematol*, 33 (4), 161-8
- Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M** (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat Mater.* 8(7):543-57

- Nurrish S, Ségalat L, Kaplan JM** (1999) Serotonin inhibition of synaptic transmission: Galpha(0) decreases the abundance of UNC-13 at release sites. *Neuron*. 24(1):231-42
- Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D, Yang H, A report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group** (2005) Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol*, 2, 8
- Oberdörster G, Elder A, Rinderknecht A** (2009) Nanoparticles and the Brain: Cause for Concern? *J Nanosci Nanotechnol*. 9(8): 4996–5007
- Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G** (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature*. 389(6654):994-9
- Oh SW, Mukhopadhyay A, Dixit BL, Raha T, Green MR, Tissenbaum HA** (2006). Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nat. Genet.* 38, 251-257
- Oikonomou G und Shaham S** (2011) The glia of *Caenorhabditis elegans*. *Glia* 59: 1253-1263
- Pan CL, Peng CY, Chen CH, McIntire S** (2011) Genetic analysis of age-dependent defects of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108:9274-9
- Petrasccheck M, Ye X, Buck LB** (2007) An antidepressant that extends lifespan in adult *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 450(7169):553-6
- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B** (2012) Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res*, 14:1109
- Piechulek A und von Mikecz A** (2018) Life span-resolved nanotoxicology enables identification of age-associated neuromuscular vulnerabilities in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ* 233:1095-1103
- Piechulek A und von Mikecz A** (2019) Aging by pollutants: introducing the aging dose (AD)<sub>50</sub>. *Environ Sci Eur* 31, 23
- Piechulek A, Berwanger LC, von Mikecz A** (2019) Silica nanoparticles disrupt OPT-2/PEP-2-dependent trafficking of nutrient peptides in the intestinal epithelium. *Nanotoxicology*. 13(8):1133-1148
- Pierce SB, Costa M, Wisotzkey R, Devadhar S, Homburger SA, Buchman AR, Ferguson KC, Heller J, Platt DM, Pasquinelli AA, Liu LX, Doberstein SK, Ruvkun G** (2001). Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. *Genes Dev*. 15, 672–678
- Pluskota A, Horzowski E, Bossinger O, von Mikecz A** (2009) In *Caenorhabditis elegans* nanoparticle-bio-interactions become transparent: silica-nanoparticles induce reproductive senescence. *PLoS One* 4(8):e6622
- Powell N, Walker MM, Talley NJ** (2017) The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut-brain communications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 14:143–59

- Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE** (2009) Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annu Rev Biochem*, 78:959-91
- Reiner DJ, Weinschenker D, Thomas JH** (1995) Analysis of dominant mutations affecting muscle excitation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 141(3):961-76
- Riera CE, Merkwirth C, De Magalhaes Filho CD, Dillin A** (2016) Signaling Networks Determining Life Span. *Annu Rev Biochem*. 85:35-64
- Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G** (2011) Autophagy and Aging. *Cell*, 146(5):682-95
- Sakai N, Ohno H, Tomioka M, Iino Y** (2017) The intestinal TORC2 signaling pathway contributes to associative learning in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*12(5):e0177900
- Salio C, Lossi L, Ferrini F, Merighi A** (2006). Neuropeptides as synaptic transmitters. *Cell Tissue Res*. 326, 583–598
- Santos SF, de Oliveira HL, Yamada ES, Neves B, Pereira Jr. A** (2019) The Gut and Parkinson's Disease—A Bidirectional Pathway. *Front Neurol*, 10, 574
- Sato K, Norris A, Sato M, Grant BD** (2014) *C. elegans* as a model for membrane traffic, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.77.2, <http://www.wormbook.org>
- Saxton RA und Sabatini DM** (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 168(6):960-976
- Schafer WF** (2006) Genetics of egg-laying in worms. *Annu Rev Genet* 40: 487–509
- Scharf A, Piechulek A, von Mikecz A** (2013) Effect of nanoparticles on the biochemical and behavioral aging phenotype of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *ACS Nano* 7(12):10695-703
- Scharf A, Gührs KH, von Mikecz A** (2016) Anti-amyloid compounds protect from silica nanoparticle-induced neurotoxicity in the nematode *C. elegans*. *Nanotoxicology* 10(4):426-35
- Schmelzle T und Hall MN** (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell*. 103(2):253-62
- Schulenburg H und Félix MA** (2017) The Natural Biotic Environment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 206 (1), 55-86
- Sieburth D, Ch'ng Q, Dybbs M, Tavazoie M, Kennedy S, Wang D, Dupuy D, Rual JF, Hill DE, Vidal M, Ruvkun G, Kaplan JM** (2005) Systematic analysis of genes required for synapse structure and function. *Nature*. 436(7050):510-7
- Sonenberg N und Gingras AC** (1998) The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol*. 10(2):268-75
- Stiernagle T** (1999) Maintenance of *C. elegans*. In: Hope IA (Eds) *C. elegans*. A practical approach. Oxford University Press, Oxford, New York, S. 51-67
- Stoeber W, Fink A, Bohn E** (1968) Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of Colloid and Interface Science* 26: 62–69

- Stroo E, Koopman M, Nollen EAA, Mata-Cabana A** (2017) Cellular Regulation of Amyloid Formation in Aging and Disease. *Front Neurosci*, 11:64
- Sun TY, Bornhöft NA, Hungerbühler K, Nowack B** (2016) Dynamic probabilistic modeling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ Sci Technol*, 50 (9), 4701-11
- Tanis JE, Moresco JJ, Lindquist RA, Koelle MR** (2008) regulation of serotonin biosynthesis by the G proteins Galphao and Galphaq controls serotonin signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 178: 157-169
- Tank EM, Rodgers KE, Kenyon C** (2011) Spontaneous age-related neurite branching in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*. 31:9279-88
- The *Caenorhabditis elegans* Sequencing Consortium** (1998) Genome sequence of the nematode *Caenorhabditis elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282: 2012–2018
- The Nanodatabase**. <http://nanodb.dk> (Zugriff am 02.09.2019)
- Thwala M, Klaine SJ, Musee N** (2016) Interactions of metal-based engineered nanoparticles with aquatic higher plants: A review of the state of current knowledge. *Environ Toxicol Chem*, 35 (7), 1677-94
- Toth ML, Melentijevic I, Shah L, Bhatia A, Lu K, Talwar A, Naji H, Ibanez-Ventoso C, Ghose P, Jevince A, Xue J, Herndon LA, Bhanot G, Rongo C, Hall DH, Driscoll M** (2012) Neurite sprouting and synapse deterioration in the aging *Caenorhabditis elegans* nervous system. *J Neurosci*. 32:8778-90; PMID:22745480
- Tzivian L, Dlugaj M, Winkler A, Weinmayr G, Hennig F, Fuks KB, Vossoughi M, Schikowski T, Weimar C, Erbel R, Jöckel KH, Moebus S, Hoffmann B, Heinz Nixdorf Recall Study Investigative Group** (2016) Long-term air pollution and traffic noise exposures and mild cognitive impairment in older adults: A cross-sectional analysis of the Heinz Nixdorf Recall Study. *Environ Health Perspect*, 124 (9), 1361-8
- Tzivian L, Jokisch M, Winkler A, Weimar C, Hennig F, Sugiri D, Soppa VJ, Dragano N, Erbel R, Jöckel KH, Moebus S, Hoffmann B, Heinz Nixdorf Recall Study Investigate Group** (2017) Associations of long-term exposure to air pollution and road traffic noise with cognitive function—An analysis of effect measure modification. *Environ Int*, 103, 30-38
- US FDA** (2015) Code of Federal Regulations Title 21, 21CFR172.480. 2015. United States Food and Drug Administration. Zugriff am 23.04.2020. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.480>
- van Ham TJ, Thijssen KL, Breitling R, Hofstra RM, Plasterk RH, Nollen EA** (2008) *C. elegans* model identifies genetic modifiers of alpha-synuclein inclusion formation during aging. *PLoS Genet*. 4(3):e1000027
- Varshney LR, Chen BL, Paniagua E, Hall DH, Chklovskii DB** (2011) Structural properties of the *Caenorhabditis elegans* neuronal network. *PLoS Comput Biol* 7:e1001066
- Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs A, Orosz L, Muller F** (2003) Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 426 620
- Vidal-Gadea A, Topper S, Young L, Crisp A, Kressin L, Elbel E, Maples T, Brauner M, Erbguth K, Axelrod A, Gottschalk A, Siegel D, Pierce-Shimomura JT** (2011) *Caenorhabditis elegans* selects distinct crawling and swimming gaits via dopamine and serotonin. *PNAS U S A*. 108(42):17504-9

- von Mikecz A** (2006) The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J Cell Sci*, 119(Pt 10):1977-84
- Walther DM, Kasturi P, Zheng M, Pinkert S, Vecchi G, Ciryam P, Morimoto RI, Dobson CM, Vendruscolo M, Mann M, Hartl FU** (2015) Widespread Proteome Remodeling and Aggregation in Aging *C. elegans*. *Cell*. 161(4):919-32
- Wang Y, Kalinina A, Sun T, Nowack B** (2016) Probabilistic modeling of the flows and environmental risks of nano-silica. *Sci Total Environ*, 545-546, 67-76
- Wang Y und Nowack B** (2018) Dynamic probabilistic material flow analysis of nano-SiO<sub>2</sub>, nano iron oxides, nano-CeO<sub>2</sub>, nano-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and quantum dots in seven European regions. *Environ Pollut*. 235:589-601
- White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S** (1986) The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 314:1–340
- Wijnhoven SWP, Peijnenburg WJGM, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EHW, Roszek B, Bisschops J, Gosens I, Van De Meent D, S Dekkers S, De Jong WH, van Zijverden M, Sips AJAM, Geertsma RE** (2009) Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicol*. 3: 109-138
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN** (2006) TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell*. 124(3):471-84
- Zhang Y, Lu H, Bargmann CI** (2005) Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 438 (7065), 179-84
- Zhang M, Chung SH, Fang-Yen C, Craig C, Kerr RA, Suzuki H, Samuel ADT, Mazur E, Schafer WR** (2008) A self-regulating feed-forward circuit controlling *C. elegans* egg-laying behavior. *Curr Biol* 18:1445–55
- Zhang SO, Box AC, Xu N, Men JL, Yu J, Guo F, Trimble R, Mak HY** (2010) Genetic and Dietary Regulation of Lipid Droplet Expansion in *Caenorhabditis Elegans*. *PNAS USA*, 107 (10), 4640-5
- Zhang H, Chang JT, Guo B, Hansen M, Jia K, Kovács AL, Kumsta C, Lapierre LR, Legouis R, Lin L, Lu Q, Meléndez A, O'Rourke EJ, Sato K, Sato M, Wang X, Wu F** (2015) Guidelines for monitoring autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy*. 2015;11(1):9-27
- Zhang S, Gao H, Bao G** (2015) Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS Nano*. 9(9):8655-71
- Zhang B, Gong J, Zhang W, Xiao R, Liu J, Xu XZS2** (2018) Brain–gut communications via distinct neuroendocrine signals bidirectionally regulate longevity in *C. elegans*. *Genes Dev*, 32 (3-4), 258-270

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α	alpha
γ	gamma
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
4E-BP1	Translationsinitiationsfaktor 4E Bindeprotein 1
Abb	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AD	<i>Alzheimer's Disease</i>
AD <sub>50</sub>	Alterungsdosis
Ag	Silber
<i>age-1</i>	<i>ageing alteration</i>
AKT-1/ -2	AKT Serin/Threonin Kinase 1/ -2
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Aluminiumoxid
BODIPY	Bor-Dipyrrromethen
BOW	<i>bag-of-worms</i>
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CeO <sub>2</sub>	Ceriumdioxid
<i>daf-2/ -16</i>	<i>abnormal dauer formation</i>
DCV	<i>dense core vesicle</i>

EAT-6 .....eating: *abnormal pharyngeal pumping*

*dpy*..... *dumpy*

*E. coli*.....*Escherichia coli*

ENS ..... enterisches Nervensystem

Fe .....Eisen

FLP ..... *FMRFamide-like peptides*

FOXO ..... *forkhead box O*

FRAP ..... *fluorescence recovery after bleaching*

GABA .....  $\gamma$ -Aminobuttersäure

GG ..... *gut granules*

*glo-1/ -3* ..... *gut granule loss*

HCF-1 ..... *host cell factor-1*

HSN ..... *hermaphrodite-specific neuron*

HSP-12.6/ -16 ..... *heat shock protein*

HTFH ..... *high-temperature flame hydrolyse*

IGF-1 ..... *insulin like growth factor-1*

IIS ..... Insulin/ IGF-1 Rezeptor (DAF-2) Signalweg

*ins-11/ -7* ..... *insulin-like peptide*

kg ..... Kilogramm

L ..... Liter

LGG-1 ..... LC3, GABARAP und GATE-16 Familie

LLPS ..... *liquid-liquid phase separation*

LOAEL ..... *lowest observed adverse effect*

MFA.....	Material-Fluss-Analysen
mg .....	Milligramm
mm .....	Millimeter
mL .....	Milliliter
mRNA.....	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NLP .....	Neuropeptid-ähnliche Proteine
NMJ .....	<i>neuromuscular junction</i>
nm .....	Nanometer
NP .....	Nanopartikel
OPT-2.....	Oligopeptidtransporter
<i>P. aeruginosa</i> .....	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PD .....	<i>Parkinson's Disease</i>
PDK-1.....	3-Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
PEP-2/ <i>pep-2</i> .....	Peptidtransporter
PI3K.....	Phosphoinositid 3-Kinase
PRMT-1 .....	<i>protein arginine methyltransferase</i>
RLE-1 .....	<i>regulation of longevity by E3 ubiquitin ligase</i>
RNA.....	<i>ribonucleic acid</i>
rRNA.....	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RNAi .....	<i>RNA interference</i>
SGK-1.....	Serum/ Glucocorticoide-regulatorische Kinase 1
SiO <sub>2</sub> .....	Siliziumdioxid
SMK-1 .....	<i>suppressor of MEK</i>

SOD-3 ..... Superoxiddismutase  
t ..... Tonnen  
TOR ..... *target of rapamycin*  
TPH-1 ..... Tryptophan-Hydroxylase-1  
TiO<sub>2</sub> ..... Titaniumdioxid  
u.a. .... unter anderen  
UNC-29/ *unc-58*..... *uncoordinated*  
UPS ..... Ubiquitin-Proteasom-System  
y.....Jahr  
z.B. .... zum Beispiel  
ZnO ..... Zinkoxid

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Verteilung von Nanopartikel in der Umwelt am Beispiel von Nano Silika. ....	2
Abb. 2 Aufnahmerouten von Nano Silika im Nematoden <i>C. elegans</i> .....	5
Abb. 3 Der Aufbau des Darms in <i>C. elegans</i> .....	7
Abb. 4 Verschaltung von sensorischen Neuronen, Interneuronen und Motorneuronen moduliert die Bewegung in <i>C. elegans</i> . ....	11
Abb. 5 Das Netzwerk der Proteostase.....	13
Abb. 6 Der Insulin/ IGF-1 Signalweg im Nematoden <i>C. elegans</i> . ....	16
Abb. 7 Zusammenfassung der NP-induzierten Effekte auf den Darm und das Nervensystem im Wurm <i>C. elegans</i> . ....	38
Abb. 8 Zeitachse der klinischen Symptome in der Parkinson Erkrankung.....	40

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Vergleich von NP-induzierten Alterungsphänotypen und Symptome in PD Patienten .....	39
--	----

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meines ganzen Biologie Studiums und der Doktorarbeit unterstützt haben!

Mein erster Dank richtet sich an Prof. Dr. rer. nat. Anna von Mikecz. Vielen Dank für die Möglichkeit an dem interessanten Thema zu arbeiten, für die intensive und engagierte Betreuung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. rer. nat. Dieter Willbold für die Bereitschaft als mein Mentor zu fungieren.

Desweiteren möchte ich mich auch an alle Mitglieder und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe von Mikecz bedanken: Andrea, Florian, Lutz, Alex, Maren, Sylwia, Inge und Tri. Vielen Dank für die gute Arbeitsatmosphäre, eure Hilfsbereitschaft und zahlreichen Anregungen und unterhaltsamen Diskussionsrunden während der Arbeitsphase. Es war und ist schön mit euch zusammen zu arbeiten!

Vielen Dank auch an das Workpackage-Team 6 im NanoMILE Projekt für die anregenden Diskussionen.

Ein herzliches und besonderes Dankeschön gilt meinem Mann, meiner Familie und meinen Freunden, die immer an mich geglaubt, mich mit viel Geduld unterstützt und auch gerne mal auf andere Gedanken gebracht haben ;)

Herzlichsten Dank!

## **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. Ferner erkläre ich, dass ich die Dissertation in keiner anderen Fakultät vorgelegt habe und auch noch keine Promotionsversuche unternommen habe.

Düsseldorf, den