



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**„Molekulare Mechanismen der Lebensveränderung  
durch Nahrungsinhaltsstoffe bei  
Caenorhabditis elegans.“**

Verfasser

Matthias Foller

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Einleitung und Fragestellung</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Theorien des Alterns in Bezug auf C. elegans</b> .....	<b>8</b>
Free Radical Theory of Aging (FRTA) .....	8
Antagonistische Pleiotropie .....	8
Green Theory of Aging .....	9
Disposable Soma Theorie .....	9
<b>2. Wichtige Signalpfade, die bei der molekularen Lebensveränderung durch Nahrungsinhaltsstoffe bei C. elegans eine Rolle spielen</b> .....	<b>11</b>
Insulin ähnlicher Signalpfad (IIS) .....	11
Funktionsweise des IIS .....	11
Gene, deren Wirkungsweise durch den IIS kontrolliert wird .....	12
Signalwege des Transkriptionsfaktors SKN-1 .....	14
Target of Rapamycin (TOR)-Pfad .....	15
Pfade der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) .....	17
JNK-Signalpfad .....	17
p38-Signalpfad .....	17
OSR-1-Signalpfad .....	19
Autophagie .....	19
Veränderung der mitochondrialen Respiration .....	20
Energierestriktion .....	20
<b>3. Methoden zur Bestimmung von Messgrößen der Lebensveränderung bei C. elegans</b> .....	<b>23</b>
Einzelne Untersuchungsmethoden zur Detektion der Lebensveränderung bei C. elegans im Detail .....	25
Grundansätze zur Durchführung von Lifespanstudien bei C. elegans .....	25

Untersuchung der Wirkung gegen oxidativen Stress .....	26
Untersuchung der Wirkung gegen thermalen Stress.....	27
Green Fluorescent Protein (GFP) .....	27
Bestimmung der räumlichen und zeitlichen Lokalisation bestimmter Proteine bei <i>C. elegans</i> durch GFP.....	28
RNA-interference (RNA-i) .....	29
Parameter, die zusätzlich bei der Durchführung von Studien mit <i>C. elegans</i> beachtet werden müssen.....	30
Mögliche Beeinflussung durch Antibiotika und Bakterien.....	30
Variation zwischen interner und externer Konzentration .....	30
Hormese .....	31

#### **4. Nahrungsinhaltsstoffe mit lebensverändernder Wirkung bei *C. elegans***

##### **32**

Polyphenole.....	32
Polyhydroxyphenole.....	32
Flavanole .....	36
Flavonole .....	44
Phenolische Säuren.....	53
Sonstige nicht flavanoide Polyphenole.....	56
Vitamine.....	59
Vitamin E.....	59
NAD <sup>+</sup> .....	60
Coenzym Q (CoQ).....	62
Demethoxy-Q9 (DMQ9) .....	63
Coenzym Q10 .....	63
Kohlenhydrate .....	65
Glucose.....	65
Trehalose .....	66
Schwefelhaltige Nahrungsbestandteile.....	68
Taurin .....	68
Diallyltrisulfide (DATS).....	70

Karotinoide .....	72
Astaxanthin .....	72
Metalle .....	73
Lithium73	
Mangan .....	75
Amide .....	78
Acrylamid .....	78
<b>5. Schlussbetrachtung .....</b>	<b>81</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>82</b>
Zusammenfassung .....	82
Abstract .....	83
Lebenslauf .....	84
<b>Literatur .....</b>	<b>85</b>

## Abbildungsverzeichnis

1 Ein Model der Funktionsweise von DAF-16 .....	13
2 Steuerung von SKN-1 über den IIS [Tullet et al. 2008].....	15
3 Verschiedene Arten der Regulation über den TOR Pfad bei A: ausreichender Nahrung und bei B: Nahrungsknappheit [Jia et al. 2004].....	16
4 Der p38 MAPK Pfad [Inoue et al. 2005]. .....	18
5 Wirkung von Catechin bei oxidativen und thermalen Stress [Saul et al. 2010]. .....	40
6 Lebensverlängernde Wirkung von EGCG A unter thermalem Stress und .....	43
7 Effekte von Quercetin auf die Lipofuscinwerte [Kampkötter et al. 2007a]. .....	45
8 Molekulare Pfade beeinflusst durch Quercetin bei C. elegans .....	47
9 Beeinflussung der Stress Promotors GST-4 durch Kaempferol und Fisetin [Kampkötter et al. 2007]. .....	49
10 Mögliche Wirkung von Resveratrol auf molekulare Signalwege bei C. elegans [Gruber et al. 2007]. .....	52
11 Veränderung der mittleren Lebensspanne durch CA und RA bei einzelnen Mutantentypen von C. elegans [Pietsch et al. 2011]. .....	55
12 Wirkung von Curcumin bei oxidativen und thermalen Stress [Liao et al. 2011]. .....	57
13 Biosynthese Pfade von NAD [Vrablik et al. 2009].....	60
14 Erhöhung der Lebensspanne bei unterschiedlichen Konzentrationen von NAD [Hashimoto et al. 2010]. .....	61
15 ROS Anhäufung bei hohem Glucoselevel [Schlotterer et al. 2009]. .....	66
16 Wirkung von Taurinzugabe auf durch Tunicamycin erhöhte Werte von HSP-70.....	69
17 Auswirkungen verschiedener Mangankonzentration auf die Lebensspanne von mev-1-Mutanten [Lin et al. 2006].....	77
18 Negative Folgen von Acrylamidkonzentrationen auf die mittlere Lebensspanne [Hasegawa et al. 2004]. .....	79

## Einleitung und Fragestellung

Altersforschung mit speziellem Fokus auf die Entdeckung von endogenen Mechanismen der Langlebigkeit hat bereits eine lange Tradition und genießt derzeit sehr großes Interesse in der Wissenschaft. Viele Reviews haben sich aus diesem Grund bereits mit dem Alterungsprozess im Detail befasst.

Ein bedeutender Modelorganismus ist *C. elegans*, eine frei im Boden lebende Nematode, bei der 60 – 80 % der Gene homolog zu Säugetiergenen sind. Hauptsächlich sind Hermaphroditen vorhanden, die sich durch Selbstbefruchtung fortpflanzen.

Innerhalb von zwei bis drei Tagen durchlaufen sie 4 Larvenstadien, bis sie schlussendlich ihr adultes Stadium erreichen. Ein adulter Nematode kann etwa 300 Nachkommen zur Welt bringen. Dadurch gewinnt man kostengünstig und ohne großen Aufwand synchronisierte Kulturen, die auf Platten oder in flüssigem Nährmedium aufgezogen werden.

Einen weiteren Vorteil bei der Erforschung bestimmter molekularer Mechanismen bietet *C. elegans* durch die vorhandene Entschlüsselung der geringen Anzahl von sechs Chromosomen und dem Genom des Mitochondriums [Braeckman et al. 2004].

Spätestens seitdem langlebige Mutanten des Modelorganismus *C. elegans* isoliert wurden, begann sich eine große Anzahl an Forschungsprojekten mit der Identifikation verschiedener molekularer Pfade und metabolischer Prozesse des Alterns zu befassen. In diesem Kontext befindet sich auch die Erforschung der lebensverändernden Wirkung von verschiedenen Nahrungsinhaltsstoffen bei *C. elegans* [Pietsch et al. 2009].

Es ist bekannt, dass die doch sehr große chemische Gruppe an Nahrungsinhaltsstoffen auf viele verschiedene Arten, z.B. auf molekulare

Signalwege oder auf die Erhöhung des antioxidativen Potentials, bei *C. elegans* wirken. Diese Effekte werden in Parametern, wie z.B. einer erhöhten Lebensspanne, oder besserer Resistenzen gegen oxidativen und thermischen Stress, gezeigt

Dieses Review versucht die verschiedenen Gruppen von Nahrungsinhaltsstoffen und deren Wirkungsweisen auf Signalwege bei *C. elegans* zusammenzufassen und durch verschiedene Theorien des Alterns zu klassifizieren [Collins et al. 2006].

## **1. Theorien des Alterns in Bezug auf C. elegans**

### **Free Radical Theory of Aging (FRTA)**

In dieser Theorie von Harman wird angenommen, dass Alterserscheinungen eine Reaktion auf die langfristige Akkumulation von oxidativen Schäden in den Mitochondrien sind. Dabei schützen die Zellabwehrsysteme, wie z. B. Katalase, Superoxiddismutase und Glutathion-Peroxidase, nur solange gegen interne und externe Mengen von ROS (Reactive Oxygen Species), bis deren Aktivität abnimmt und Zellschäden vermehrt auftreten. Ein Hinauszögern des Alterns ist laut dieser Theorie hauptsächlich entweder durch das Verhindern der Initiation oder durch den Kettenbruch von Radikalreaktionen möglich. Erhöhte Lebensspannen können nur mit der besseren Abwehrreaktion des Organismus auf freie Radikale erreicht werden.

Die FRTA dient auch heute noch als anerkannte Erklärungsmethode für diverse Studienergebnisse, die positive Effekte bestimmter Wirkstoffe auf körpereigene Abwehrmechanismen gegen ROS beschreiben [Harman 2006].

### **Antagonistische Pleiotropie**

Diese Theorie wurde 1957 von George Williams aufgestellt und besagt, dass Gene im Organismus des öfteren verschiedene Funktionen innehaben (Pleiotropie). Einige sind im jungen Alter vorteilhaft für den Organismus, wohingegen sie jedoch im höheren Alter eher schädlich auf diesen wirken können. Gegen solche als antagonistisch pleiotrop bezeichneten Gene kann die Natur nicht selektieren, da sie einerseits erst nach der reproduktiven Phase ihre negativen Auswirkungen entfalten und andererseits oft in jüngeren Jahren durch solche Gene ein Fortpflanzungserfolg entsteht. Auch Anti-Stress-Eigenschaften, die in jüngeren Jahren bestimmter Organismen der Erhaltung der reproduktiven Fitness dienen, werden im Alter nicht mehr benötigt und können verloren gehen [Zhou et al. 2011].



## **Green Theory of Aging**

Die Green Theory of Aging von Gems und Mc. Elwee versucht das Altern durch die beim Abbau von Makromolekülen entstandenen toxischen Substanzen zu erklären. Lebensverlängernde Mechanismen wirken entweder durch die Entfernung von toxischen oder die Reparatur von beschädigten Molekülen. Das Problem der Zellen ist allerdings der steigende Energieaufwand zur Entfernung dieser im Alter vermehrt auftretenden metabolischen Abfallprodukte und Xenobiotica. Besonders der Aufwand der Entsorgung von lipophilen Substanzen im Körper, welche besonders viel Energie benötigen, steht dabei im Vordergrund.

Der Name Green Theorie kommt vom Vergleich mit dem menschlichen Umweltschutz und der Müllentsorgung, Müllvermeidung und dem Sparen von Ressourcen um in diesem Fall das Altern zu verhindern. Dabei steht besonders der Aufwand der Entsorgung von lipophilen Substanzen im Körper im Vordergrund, welche besonders viel Energie benötigen [Gems et Mc. Elwee 2004].

## **Disposable Soma Theorie**

Bei dieser Theorie geht es um das Verhältnis von Reproduktion und körperlichem Gleichgewicht. Wie der Name sagt, werden Körper als „Wegwerfkörper“ bezeichnet, sobald sie nicht mehr reproduktionsfähig sind. Zusätzliche Ressourcen werden nur für das somatische Gleichgewicht verwendet, solange die Reproduktionsfähigkeit dadurch nicht gefährdet wird. Aus Sicht der Evolution geht die Erhaltung der Art vor die Langlebigkeit des einzelnen Individuums.

Das Beispiel der Kalorienreduktion kann somit so erklärt werden, in dem der Körper in der Zeit der Nahrungsknappheit mehr Energie ins Überleben

investiert, um sich bei verbesserten Bedingungen dann wieder reproduzieren zu können.

Andererseits stellen Studien an *C. elegans*, bei denen trotz gleichbleibender Fertilität eine Steigerung der Lebensspanne beobachtet wird, diese Theorie in Frage [Zhou et al. 2011].

## **2. Wichtige Signalpfade, die bei der molekularen Lebensveränderung durch Nahrungsinhaltsstoffe bei *C. elegans* eine Rolle spielen**

### **Insulin ähnlicher Signalpfad (IIS)**

Der ISS ist ein endokriner Signalpfad, der die Nahrungsspeicherung und das Wachstum reguliert. Bei schlechten äußeren Bedingungen, wie z. B. Stress oder Nahrungsknappheit, wird vermutet, dass die Aktivität des ISS hinuntergefahren wird, um ein Überleben unter diesen schwierigen Bedingungen zu ermöglichen. Bei *C. elegans* geht das beispielsweise mit einer Erhöhung der Lebensspanne einher.

### **Funktionsweise des IIS**

Bei aktiver Funktion des IIS wird durch das Gen *daf-2* bei *C. elegans* eine Kaskade von Reaktionen ausgelöst. Dabei wird durch den Insulin ähnlichen Signalrezeptor DAF-2 durch Phosphorylierung das Protein AGE-1 aktiviert. AGE-1 katalysiert den Second Messenger Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP-3), welcher dann die Proteine AKT-1, AKT-2, PDK-1 und SGK-1 in die Plasmamembran zufügt.

Die AKT-Proteine formen dann einen Komplex mit SGK-1 und dieser Komplex kann von PDK-1 durch Phosphorylierung aktiviert werden. Diese Signalkaskade endet mit der Phosphorylierung und Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 und damit verbundener Inaktivierung im Zytoplasma gebunden an sogenannte kleine 14.3.3-Proteine.

Die beiden AKT-Proteine sind vor allem beim Übergang zur Dauerformation von *C. elegans* von Bedeutung, SGK-1 ist hingegen bei der Regulation von Stressantworten, Wachstum und Langlebigkeit unter Normalbedingungen wichtig.

Unter bestimmten Umständen kann nun die Expression von DAF-2 oder einer im Signalpfad untergestellten wirkenden Komponente vermindert werden und z. B. der Transkriptionsfaktor DAF-16 in den Nucleus wandern und dort verschiedenste Signale auslösen.

Neben DAF-16 wirkt der IIS auf einige weitere Komponenten im Stoffwechsel von *C. elegans*. Einige davon sind bereits bekannt und werden im darauffolgenden Teil beschrieben [Zhou et al. 2011].

## **Gene, deren Wirkungsweise durch den IIS kontrolliert wird**

### **Wirkung auf DAF-16**

DAF-16 gehört zur Gruppe der Forkhead-Transkriptionsfaktoren und ist das Hauptziel der Regulation durch den IIS. Dieser Forkhead-Transkriptionsfaktor fördert durch Bindung an bestimmte Gene in der DNA die Transkription verschiedenster Proteine. DAF-16 kontrolliert nicht nur die Lebensspanne, sondern ist auch in die Entwicklung eines Dauerstadiums bzw. in Metabolismus und Stressantworten bei *C. elegans* involviert [Zhou et al. 2011].

Wenn DAF-2 oder eines seiner im IIS untergeordneten Proteine nun vermindert exprimiert werden, kann DAF-16 vermehrt in den Nucleus wandern und dort die Transkription verschiedenster Gene mit Funktionen in Dauerformation, Lebensspanne, Stressresistenz und Entwicklung verstärken. Das alleinige Vorhandensein von DAF-16 im Nucleus reicht dazu jedoch nicht aus, sondern es werden mehrere Co-Faktoren benötigt, um DAF-16 vollständig zu aktivieren. Gehemmt wird der IIS hauptsächlich durch DAF-18, welches PIP-3 zu PIP-2 dephosphoryliert.

## Sonstige Einflüsse, die DAF-16 regulieren können

### Sirtuine

Sirtuine sind eine Familie von  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Proteindeacetylasen, die Stressantworten und Zellalterung regulieren. In *C. elegans* ist das Homolog SIR-2.1 von Bedeutung. Als Reaktion auf verschiedenen Formen von Stress interagiert SIR-2.1 mit DAF-16. Diese Interaktion wird von PAR-5 und FTT-2 kontrolliert, welche Homologe von 14.3.3-Proteinen (kleine saure Proteine, die Phosphoserin- und Phosphothreoninreste enthalten) bei *C. elegans* sind.

In mehreren Studien mit Mutantentypen von *C. elegans*, bei denen Gene des IIS ausgeschaltet sind, hat man herausgefunden, dass die Wirkung von SIR-2.1 auf DAF-16 nicht von der Aktivität des IIS abhängig ist. Es wird daher angenommen, dass SIR-2.1 und die 14.3.3-Proteine in einer Stress-Antwortreaktion, in der sie DAF-16 unabhängig von IIS aktivieren, agieren. [Zhou et al. 2011].

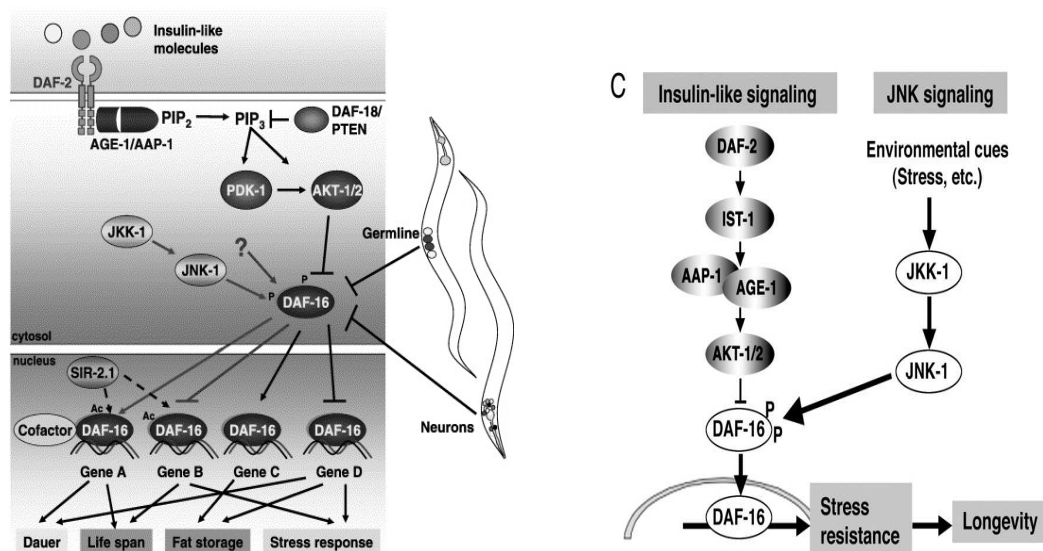


Abbildung 1 Ein Model der Funktionsweise von DAF-16 [Mukhopadhyay et al. 2006].

## **C-Jun Terminale Kinasen (JNK)**

JNK, welches eine Untergruppe der MAP-Kinasen bildet, ist ein Teil einer Signalkaskade, die durch Zytokine oder durch umweltbedingte Stressfaktoren (z. B. thermaler bzw. oxidativer Stress) aktiviert wird.

In *C. elegans* wurde entdeckt, dass JNK DAF-16 direkt an einer anderen Stelle und somit unabhängig vom IIS phosphoryliert und damit seine Translokation in den Nucleus folglich ebenfalls unabhängig vom IIS erfolgt (näheres zu MAPKs und JNK siehe Seite 9.) [Zhou et al. 2011].

## **Signalwege des Transkriptionsfaktors SKN-1**

SKN-1 wird vermutlich über den IIS parallel zu DAF-16 reguliert. In seiner inaktiven Form wird SKN-1 von den AKT- sowie den SGK-Proteinen an mehreren Seiten phosphoryliert und im Cytosol gehalten, ähnlich DAF-16 [Tulet et al. 2008].

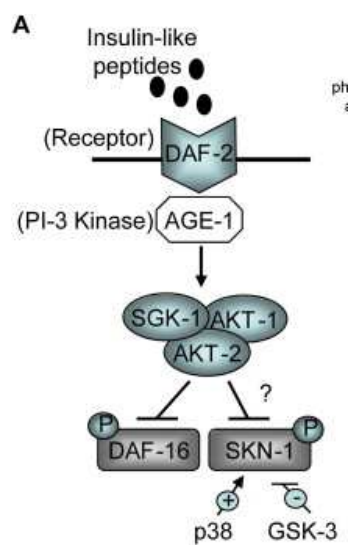
Unter normalen Bedingungen ist SKN-1 hauptsächlich im Cytosol der Zellen des Intestinaltrakts vorhanden und erfüllt ein weites Spektrum an Aufgaben. Das sind z. B. Aufgaben in allen Stufen der Detoxifizierung, Zellreparatur, Beeinflussung des Metabolismus von verschiedenen Stressabwehrsystemen und die Feinmodulierung von Signalpfaden, die die Langlebigkeit verändern können [Oliveira et al. 2009].

In ihrer aktiven Form sind DAF-2-Signale über den IIS reduziert und SKN-1 akkumuliert in Zellkernen des Intestinaltrakts von *C. elegans* und wirkt dort auf die Transkription bestimmter Gene. Zusätzlich wird diese Akkumulation von SKN-1 auch positiv durch die p38/MAPK reguliert. Dessen Gegenspieler Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) kann wieder durch Phosphorylierung an unterschiedlichen Bindungsstellen diese Akkumulation von SKN-1 negativ regulieren (z. B. nach einem Ende der Stresssituation) [Oliveira et al. 2009].

Unter Stress werden durch SKN-1 hauptsächlich Gene, die für die Phase-2-Detoxifikation verantwortlich sind, vermehrt exprimiert. Dabei werden durch verschiedene Stresseinflüsse unterschiedliche Gene beeinflusst. [Tullet et al. 2008].

Eine weitere Regulationsmöglichkeit von SKN-1 auf die Lebensspanne von *C. elegans* ist bei Energiereduktion bekannt, wo es in den ASI-Geschmacksneuronen akkumuliert und von dort aus eine Lebensverlängerung bewirkt.

Zusätzlich existiert unter Normalbedingungen auch ein Feedback-Loop, bei dem SKN-1 INS-7 hemmt und durch diesen Vorgang wieder vermehrt DAF-2-Signale gesendet werden können, die wiederum die SKN-1-Akkumulation hemmen [Oliveira et al. 2009].



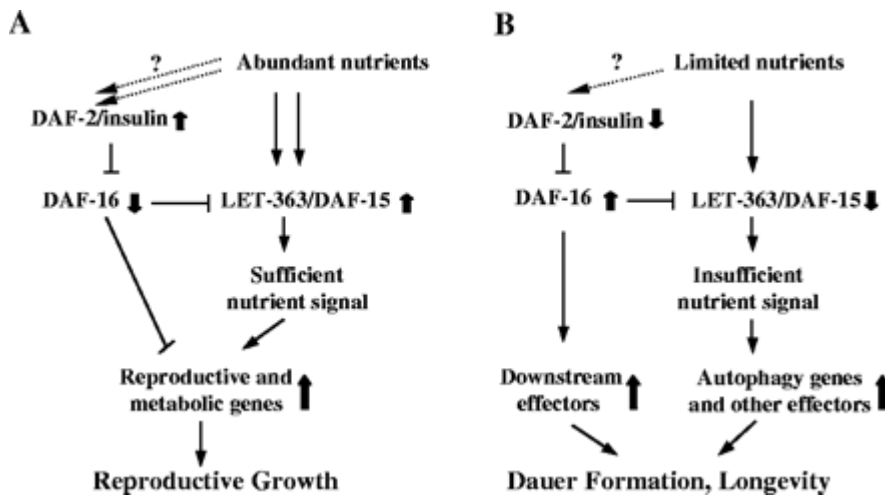
**2 Steuerung von SKN-1 über den IIS [Tullet et al. 2008].**

### Target of Rapamycin (TOR)-Pfad

TOR ist eine Serin/Threonin-Kinase, die Zellwachstum und Metabolismus als Antwort auf die Zufuhr bestimmter Nährstoffe reguliert.

Unter normalen Bedingungen bzw. Vorhandensein von ausreichend Nahrung werden *let-363*, das Homolog von TOR, und *daf-15*, das Homolog von Raptor

(regulatory associated Protein of mTOR), bei *C. elegans* vermehrt exprimiert. Die Priorität liegt dann auf der vermehrten Transkription von Genen, die für Reproduktion und Metabolismus verantwortlich sind [Jia et al. 2004].



### 3 Verschiedene Arten der Regulation über den TOR Pfad bei A: ausreichender Nahrung und bei B: Nahrungsknappheit [Jia et al. 2004]

Unter Stress wird die TOR-Funktion vermindert und der lebensverlängernde Effekt wird auf die verminderte Proteinsynthese und erhöhte Autophagie zurückgeführt. TOR interagiert dabei auf eine noch ungeklärte Weise mit dem IIS-Pfad.

Es ist bekannt, dass DAF-16 DAF-15 hemmt und somit die TOR-Aktivität heruntersetzt. Dabei wird vermutet, dass die mRNA-Translation durch eine verminderte TOR-Phosphorylierung des Translation-Initiation-Factor-4E-binding-protein-1 (4E-BP1) gehemmt wird. Autophagie wird dabei vermutlich erhöht, indem bei verminderter TOR-Aktivität, *bec-1*, ein Gen, das für die Bildung von Autophagosomen verantwortlich ist, vermehrt exprimiert wird.

Außerdem ist bekannt, dass durch verminderte Nahrungsaufnahme bei Energierestriktion TOR auf noch ungeklärte Weise reduziert wird und somit auch an der Lebensverlängerung durch Kalorienrestriktion beteiligt ist [Jia et al. 2004].



## **Pfade der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPKs)**

MAPKs werden durch bestimmte Stimulantien aktiviert, wie z. B. Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Neurotransmittern und zellulären Stress. Sie bestehen aus einer dreifachen Signalkaskade in der Reihenfolge MAPKKK, MAPKK und MAPK (siehe Abbildung). In *C. elegans* kontrollieren sie unter anderem Zellwachstum, neuronale Funktionen und Immunität.

Drei Subgruppen wurden bisher identifiziert, nämlich ERK, JNK und p38, wobei der Name immer den auslösenden Schritt der MAPK charakterisiert.

Bezogen auf die lebensverlängernden Mechanismen bei *C. elegans* sind hauptsächlich JNK und p38 von Bedeutung [Sakaguchi et al. 2004].

### **JNK-Signalpfad**

Bei *C. elegans* ist das Homolog von JNK JNK-1 und sein Aktivator JKK-1 (MAPKK). Die Expression beider Komponenten ist neuronnenabhängig. Bei Mutantensträngen von *C. elegans*, bei denen *jnk-1* und *jjk* ausgeknockt waren, wurden neurologische Störungen beobachtet. Diese konnten bei der selektiven Expression von *jnk-1* und *jjk* wieder hergestellt werden.

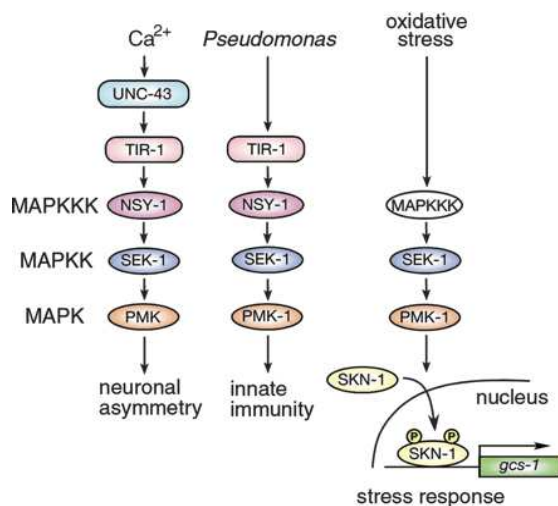
Daraus wird angenommen, dass die zwei Gene Funktionen im neurologischen System erfüllen, wie z. B. der Aktivierung des Transkriptionsfaktors DAF-16 [Sakaguchi et al. 2004].

### **p38-Signalpfad**

Bei *C. elegans* gibt es drei Homologe zu p38. Diese sind PMK-1, PMK-2 und PMK-3, wobei hauptsächlich PMK-1 von Bedeutung ist. Die MAPKK, welche PMK kontrolliert, ist SEK-1 und wird wiederum von der MAPKKK NSY-1 (neural symmetry-1) kontrolliert. Diese NSY-1-SEK-1-MAPK-Kaskade ist bei der

Bestimmung der Entwicklung von asymmetrischen Zellen in AWC-Geruchsneuronen von *C. elegans* involviert. Bisher ist nicht bekannt warum PMK-1 bei *C. elegans* in diesen Pfad involviert ist [Inoue et al. 2005].

Auf diesem Weg werden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale durch die von UNC-2 und UNC-36 gesteuerten Kalziumkanäle durch ein elektrisches Potential geleitet. Diese stimulieren dann die UNC-43  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CamKII), welche wiederum NSY-1 positiv reguliert.



#### 4 Der p38 MAPK Pfad [Inoue et al. 2005].

Eine andere bedeutende Funktion der p38-MAPK wurde bei der Belastung durch oxidativen Stress entdeckt. Bei oxidativem Stress wird PMK-1 von SEK-1 aktiviert und nicht durch UNC-43. Damit wird eine vermehrte Expression von *gcs-1*, welches für die Phase II-Detoxifikationsenzyme kodiert, in Verbindung gebracht. Der Transkriptionsfaktor, der *gcs-1* exprimiert, ist SKN-1. Dadurch wird angenommen, dass SKN-1 ein direktes Ziel der p38-Kinase ist und die Expression von *gcs-1* einleitet (siehe auch IIS).

Durch die Verlegung von SKN-1 vom Zytosol in den Nucleus durch PMK-1 kann vermehrt die Expression von *gcs-1* in den Intestinalzellen von *C. elegans*

stattfinden. Unbekannt ist noch, wie die Funktion von PMK-1 wieder heruntergefahren werden kann [Inoue et al. 2005].

### **OSR-1-Signalpfad**

OSR-1 reguliert die osmotische Stressantwort in *C. elegans*. Dabei dient es zum Detektieren und Vermeiden von hyperosmotischer Umwelt. Bei akuten Stresssituationen wird OSR-1 vermindert exprimiert. Dadurch kann eine Anti-Stress-Reaktion über die CAMKII bzw. UNC-43 erfolgen.

Im normalen Zustand wird UNC-43 durch OSR-1 gehemmt, jedoch bei akuter hyperosmotischer Belastung kann es durch das verminderte Vorhandensein von OSR-1 verschiedene Anti-Stress-Gene transkribieren. Dabei wird über die MAPK PMK-1 eine Reaktion auf osmotischen Stress eingeleitet. Eine Mutation von PMK-1 kann die osmotische Stressantwort um nur 50 % vermindern.

Das deutet daraufhin, dass noch weitere Signalwege bei verminderten Konzentrationen von OSR-1 als Reaktion auf akuten osmotischen Stress eingeleitet werden [Solomon et al. 2004].

### **Autophagie**

Autophagie wird bei bestimmten Stressfaktoren bei *C. elegans* vermehrt beobachtet. Das kann z. B. bei oxidativem Stress oder Energierestriktion sein.

Als Indikator bei *C. elegans* dient das Protein LGG-1, welches in Membranen von Autophagosomen vorhanden ist und gemessen werden kann.

Bei verminderter IIS- und TOR-Aktivität, sowie bei Energierestriktion, konnte vermehrte Expression von LGG-1 beobachtet werden.

Bekannte Gene, die für die lebensverlängernde Wirkung über Autophagie bei *C. elegans* verantwortlich sind, sind *bec-1* und *vps-34*, welche eine Phosphatidylinositol-3-Kinase aktivieren [Zhou et al. 2011].

## **Veränderung der mitochondrialen Respiration**

In mehreren Studien konnte bei Mutationen in der Zellatmung und damit verbundene verringerte mitochondriale Respiration eine verlängerte Lebensspanne von *C. elegans* beobachtet werden. Der Mechanismus dieser Lebensverlängerung ist jedoch noch ungeklärt.

Eine Theorie besagt, dass verminderte ROS-Produktion durch geringere Atmung zu einer erhöhten Lebensspanne führt. Diese Theorie ist aber mittlerweile sehr umstritten. Andere Theorien sprechen von einer erhöhten ROS-Produktion durch milden Stress bei bestimmten mitochondrialen Mutationen.

Die Antwort der Zellen von *C. elegans* auf diesen Stress könnte mittels eines hormetischen Effekts zu einer erhöhten Lebensspanne führen [Zhou et al. 2011].

## **Energierestriktion**

Bei Energierestriktion wird angenommen, dass Ressourcen aus dem reproduktiven System sowie der Fitness abgezogen werden und sich ein Programm mit somatischem Gleichgewicht einstellt.

Bei *C. elegans* äußert sich das z. B. mit einer geringeren Körperlänge, verminderter Brood Size, einer geringeren pharyngealen Pumprate und langsamerer Bewegung. Dabei werden eine höhere Aktivität antioxidativer Defensivmechanismen sowie höhere Resistenz gegen thermalen und oxidativen Stress beobachtet.

Bei *C. elegans* kann Energierestriktion gewollt durch Aufziehen im flüssigen Medium oder auf Platten mit geringerer Konzentration von *E. coli* erreicht werden. Eine andere Möglichkeit wären bestimmte Mutationen, die zu

verringertes Nahrungsaufnahme führen, wie z. B. ein Ausschalten des Gens eat-2 [Zhou et al. 2011].

Der genaue Weg wie ER lebensverlängernd wirkt ist noch nicht erforscht. Probleme dabei sind, dass die Effekte nicht durch die geringere Energiezufuhr selber erzielt werden, sondern durch die veränderten Lebensumstände der Nematoden.

Bei *C. elegans*, die mit weniger *E. coli* gefüttert werden, weiß man nicht, ob der Effekt durch die geringen Schäden von *E. coli* auf *C. elegans* entsteht, oder doch eher durch einen gestörten Metabolismus, der durch Fehlen von essentiellen Nahrungsinhaltsstoffen aus *E. coli* auftritt.

Im flüssigen Medium könnte dieser Effekt auch durch veränderten Metabolismus bzw. der Nährstoffaufnahme der Würmer im Flüssigmedium ausgelöst werden [Zhou et al. 2011].

Auch auf molekularer Ebene sind bisher wenige Details der lebensverlängernden Wirkung durch Energierestriktion bekannt.

Bekannt sind erhöhte SOD- und Katalase-Aktivität und die vermehrte Akkumulation von SKN-1 in den zwei ASI-Neuronen. Daher wird vermutet, dass die ASI-Neuronen Energierestriktion erkennen und eine Anti-Stress-Reaktion über vermehrte Akkumulation von SKN-1 einleiten.

Jedoch muss man sagen, dass bei Mutanten, denen SOD fehlt, keine Verringerung der Lebensspanne bei ER beobachtet wurde.

Auch bei Mutanten, bei denen Gene des IIS-Pfades ausgeschaltet sind, wurde kein Zusammenhang mit ER beobachtet. Da SKN-1 auch mit dem IIS in Verbindung gebracht wird, kann er somit auch nicht allein für die lebensverlängernden Effekte durch ER verantwortlich gemacht werden [Zhou et al. 2011].

Eine andere wichtige Erkenntnis bei der Wirkung über ER ist auch die negative Regulierung des TOR-Pfades, welcher mit Nahrungsaufnahme in Verbindung

gebracht wird. Diese negative Regulierung führt zu einer erhöhten Lebensspanne. Eine Frage dabei wirft wiederum die vorhandene Abhängigkeit des TOR-Pfades vom IIS-Pfad auf, da bei ER kein Zusammenhang mit dem IIS-Pfad erkannt wurde [Zhou et al. 2011].

Die Gene *bec-1* und *vps-34*, werden mit erhöhter Autophagierate in Verbindung gebracht und bei deren Ausschaltung fallen die positiven Effekte auf die Lebensspanne von ER aus.

Durch diese Erkenntnis kann man sagen, dass auch erhöhte Autophagie-Aktivität möglicherweise für den lebensverlängernden Effekt durch Energierestriktion verantwortlich ist [Zhou et al. 2011].

### **3. Methoden zur Bestimmung von Messgrößen der Lebensveränderung bei *C. elegans***

Messgrößen sind wichtig um herauszufinden, wie ein Stoff das Alter eines Organismus beeinflusst. Altern ist ein komplizierter Prozess, der fortschreitende degenerative Alterungsprozesse in einem multiplen Organsystem beschreibt.

Jede Messung dieses Prozesses wird mit verschiedener Häufigkeit bzw. Intensität erfolgen. Deshalb müssen bei Altersstudien mehrmalige Messungen durchgeführt werden, um verwertbare Ergebnisse zu erhalten. Aufgrund der großen Variabilität des Individuums beim Altern ist es notwendig, möglichst große Populationen zu messen und diese Populationen mit statistischen Analysen zu vergleichen.

Bei *C. elegans* beginnen Lifespan-Studien entweder im L1- oder im L4-Stadium. Die Vorteile bei diesen Studien sind, dass eine genau Ergebnisvariable erwartet wird (lebend oder tot), und dass die allgemeinen Lebenserhaltungssysteme gemessen werden können [Collins et al. 2006].

Was kann gemessen werden?

- Periode der Entwicklung bis zur Geschlechtsreife oder die Zeit, in der die Individuen voll entwickelt sind (L1-L4 oder danach)
- Quantitative Daten: z. B.: Pharynx-Pumpgeschwindigkeit, Vermehrung, Bewegungshäufigkeit.
- Altersbedingte Veränderungen im molekularen oder biochemischen Bereich, z. B. Menge an Lipofuscin oder Protein-Carbonylisierung.

Die determinierenden Faktoren der Methoden sind, dass sie nicht spezifisch für das Altern sind, da die Versuche die Entwicklungsperiode miteinbeziehen.

Um genaue Daten über den Alterungsprozess zu erhalten ist eine Kombination verschiedener Methoden am besten [Collins et al. 2006].

### **Identifizierung des positiven Mechanismus eines Stoffes**

Die genaue Wirkung eines Stoffes auf das Altern herauszufinden stellt einen sehr kritischen Punkt dar. Für einige Stoffe wurden einer oder mehrere Wirkungspunkte identifiziert, bei anderen ist der Mechanismus noch nicht so genau bekannt.

Oft werden bei Versuchen zusätzlich zum zugegebenen Stoff auch noch *C. elegans*-Stämme mit bekannten lebensverlängernden Mutationen verwendet. Dabei kann herausgefunden werden, ob durch den zugegebenen Stoff zusätzlich eine Wirkung stattgefunden hat oder nicht.

Wenn dabei keine zusätzliche Veränderung stattfindet, kann das bedeuten, dass Stoff und Mutation in derselben Weise lebensverlängernd wirken. Wenn jedoch der Stoff eine zusätzliche Lebensverlängerung bewirkt, könnte das heißen, dass er auf andere Art und Weise als die Mutation wirkt [Collins et al. 2006].

Wenn ein Stoff ein bestimmtes Ziel hat, auf das er wirkt, können spezifische Experimente durchgeführt werden. Zu identifizieren gilt es...

- ...ob der Stoff sich an die Zielregion bindet.
- ...welche Konzentration nötig ist, um die gewünschte Wirkung zu erreichen.
- ...ob die Mutationen in den Wurmstämmen die Wirkung des Stoffes oder der Gene der Zielregion des Stoffes beeinflussen.



Diese Untersuchungen können zeigen, ob ein bestimmter Stoff das Altern durch Bindung an einen bestimmten Zielort (Protein) beeinflusst [Collins et al. 2006].

## **Einzelne Untersuchungsmethoden zur Detektion der Lebensveränderung bei *C. elegans* im Detail**

### **Grundansätze zur Durchführung von Lifespanstudien bei *C. elegans***

#### 1. Synchronisierte Kulturen erhalten

Um die Lebensspanne einer Gruppe von Nematoden bestimmen zu können, muss zuerst eine synchronisierte Kultur hergestellt werden.

Die am meisten verwendete Methode, um synchronisierte Kulturen zu erhalten, ist die Behandlung mit Hypochlorit, bei der trüchtige Nematoden in eine Bleach-Lösung überführt werden. Nach Durchführung verschiedener Arbeitsschritte bleiben nur mehr die Eier übrig, die nun eine synchronisierte Kultur darstellen.

Wenn man nun eine synchronisierte Kultur aufgezogen hat, muss diese nun von der Nachkommenschaft getrennt werden, um die Vermischung mit nachfolgenden Generationen zu vermeiden. Der optimale Weg, das zu verhindern, ist die tägliche Übertragung von adulten Würmern auf frische Platten mit festem oder flüssigem Medium. Ein Nachteil dabei ist, dass jeder Transfer die Gefahr mit sich bringt, Würmer zu töten, zu verletzen oder zu verlieren. Außerdem könnte unabsichtlich eine geschlüpfte Larve mit transferiert werden und, wenn diese übersehen wird, einen großen Fehler beim Ermitteln der maximalen Lebensspanne verursachen.

## 2. Vermeidung von Kontaminationen

Nematoden werden normalerweise auf Platten monoxenisch mit OP50-Bakterien als Futterquelle oder im flüssigen Medium aufgezogen. Dabei sollte Antibiotika-Zugabe zur Vermeidung von Kontaminationen möglichst verhindert werden, da einige Studien eine Erhöhung der Lebensspanne durch Antibiotika-Zugabe zu *C. elegans* zeigen und somit falsch-positive Ergebnisse entstehen können [Gruber et al. 2009].

Somit liegt eine hohe Priorität auf sterilem Arbeiten und Beobachten der Wurmstämme, um mögliche Kontaminationen vorzeitig zu erkennen und zu beseitigen. Für die Durchführung von Arbeiten und Mikroskopie an den Nematoden ist ein gut gewarteter horizontaler Laminar-Flow Voraussetzung [Gruber et al. 2009].

## 3. Nahrungsdichte

Eine optimale Nahrungsdichte liegt ungefähr bei  $10^{10}$  Bakterienzellen pro ml. Dieser Wert sollte ungefähr eingehalten werden, um Kalorienrestriktion durch zu geringe Nahrungsaufnahme zu vermeiden [Gruber et al. 2009].

## **Untersuchung der Wirkung gegen oxidativen Stress**

Reactive oxygen Species (ROS) schadet Proteine, Lipide und Nucleinsäuren in der Zelle. Diese Schäden werden als oxidativer Stress bezeichnet. Bei der mitochondrialen Atmung werden 0,4-4 % des konsumierten Sauerstoffs in reaktive Zwischenprodukte umgewandelt, oft in Superoxid.

Superoxid reagiert mit Eisen-Schwefel-Clustern und löst dabei Eisen oder wird zu Hydrogenperoxid, welches mit dem freien Eisen zu Hydroxylradikalen reagiert. Diese Radikale können Makromoleküle schädigen [Zhou et al. 2011].

Als Schutz vor deren verursachten Schäden existieren Enzyme wie Superoxiddismutase (SOD), Katalase (KAT) und Glutathion-Peroxidase, welche diese ROS in weniger reaktive Formen umwandeln.

Um Wirkungen von Nahrungsstoffen auf oxidativen Stress zu untersuchen können in Experimenten mit *C. elegans* vorher Oxidantien wie z. B. Tert-butylhydroperoxide, Arsenit, Paraquat oder Juglon zugefügt werden und dann die Wirkung der Nahrungsstoffe auf deren oxidative Schäden gemessen werden. Diese möglichen positiven Eigenschaften können im Vergleich der Lebensdauer von *C. elegans*-Stämmen mit oder ohne einen bestimmten Nahrungsstoff gemessen werden.

Außerdem können Indikatoren gemessen werden, die auf oxidative Schäden hindeuten. Ein Indikator wäre das Protein-Carbonyl-Vorkommen, ein anderes, ein fluoreszierendes Pigment das Lipofuscin genannt wird [Zhou et al. 2011].

### **Untersuchung der Wirkung gegen thermalen Stress**

Thermaler Stress wird bei *C. elegans* durch Temperaturen von ca. 35 °C über längere Zeit verursacht. Dabei kann die Überlebensrate von *C. elegans* mit oder ohne einen bestimmten Nahrungsstoff verglichen werden.

Eine andere Methode wäre nach einer bestimmten Belastungszeit mit thermischem Stress die Expression von Hitzeschockproteinen (HSP) zu vergleichen. Dabei kann man herausfinden, ob durch einen bestimmten Stoff die Reaktion auf thermischen Stress verbessert wird [Zhou et al. 2011].

### **Green Fluorescent Protein (GFP)**

GFP wurde 1955 von Davenport und Nicol in den licht-produzierenden Zellen der Qualle *Aequorea victoria* fluoresced entdeckt. Im Laufe der Zeit wurden

immer bessere Methoden zur Verwendung des GFP entdeckt, sowie weitere fluoreszierende Proteine aus anderen Tierarten gewonnen [Hobert et Loria 2006].

In den letzten Jahren wurde GFP zu einem Standard-Forschungswerkzeug bei *C. elegans*. Aufgrund seiner Transparenz bietet *C. elegans* bei der Verwendung von GFP enorme Vorteile, weil dadurch die Visualisierung von GFP bei lebenden Tieren unter dem Mikroskop ermöglicht wird.

Ein anderer Vorteil ist die einfache, schnelle und kostengünstige Konstruktion eines GFP-Reporter-Gens, das dann von den Nematoden zu einem gewünschten Zweck exprimiert werden kann.

### **Bestimmung der räumlichen und zeitlichen Lokalisation bestimmter Proteine bei *C. elegans* durch GFP**

DNA von GFP kann mit der DNA des zu erforschenden Gens, durch die Bindung an dessen codierende Region und die unter Kontrolle eines Gen eigenen oder heterogenen Promoters eine GFP-Protein-Fusion eingehen. Die subzelluläre Lokalisation des dadurch entstandenen Fusionsproteins kann auf diesem Wege beobachtet werden.

Die zeitliche und räumliche Expression in den Zellen von *C. elegans* kann mittels Messung der Fluoreszenz oder der Beobachtung unter einem speziellen Mikroskop festgestellt werden. Ein Beispiel wäre die Akkumulation des Transkriptionsfaktors SKN-1 in den Intestinalzellen von *C. elegans* bei akutem oxidativen Stress. Gebunden an ein GFP kann diese sichtbar gemacht werden [Hobert et Loria 2006].

## **RNA-interference (RNA-i)**

Bei RNA-i-Methoden wird double-stranded-RNA (dsRNA) in die Zellen eingeschleust. Diese double-stranded-DNA wird von einem Enzym namens Dicer in der Zelle zu small-interfering-RNAs (siRNA) gespalten.

Diese siRNA assoziiert mit dem RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) und wird von dort zu den Ziel-RNAs geleitet. Diese werden gespalten und damit die Translation bestimmter Proteine unterbunden.

Bei *C. elegans*, Pflanzen und Pilzen gibt es zusätzlich eine RNA-dirigierte RNA-Polymerase (RdRP) Aktivität, die zusätzliche siRNA produzieren kann, die die Ziel-mRNA als Vorlage für eine verstärkte Reaktion nutzen kann.

Organismen, die diese Mechanismen besitzen, haben eine robustere RNA-i.

Ein weiterer großer Vorteil von *C. elegans* bei der Anwendung von RNA-i ist die Bekanntheit des Genoms und damit ein möglichst gezielter Knockdown bestimmter Gene, die von Interesse sind [Maine E. 2008].

### **Anwendungsmöglichkeit von RNA-i bei *C. elegans***

Bei *C. elegans* wird RNA-i hauptsächlich dazu verwendet Gene auszuschalten, die bestimmte Proteine transkribieren und die Auswirkungen davon zu messen, z. B. Ausschaltung des Proteins DAF-16 und dessen Auswirkungen auf die Lebensspanne von *C. elegans*. Dabei wird meistens bei der Aufzucht von *C. elegans* auf Platten den als Futter dienenden Bakterien dsRNA verabreicht, die dann in den Nematoden die Ausschaltung bestimmter Gene bewirkt.

Eine andere Möglichkeit zum Einsatz von RNA-i bei *C. elegans* ist die vorherige Durchführung einer Microarray-Analyse bei Zugabe eines bestimmten Stoffes, um zu sehen, welche Gene vermehrt transkribiert werden. Daraufhin kann man

durch Ausschalten betroffener Gene durch RNA-i feststellen, bei welchen die positiven Wirkungen eines Stoffes verloren gehen. [Maine E. 2008].

## **Parameter, die zusätzlich bei der Durchführung von Studien mit C. elegans beachtet werden müssen**

### **Mögliche Beeinflussung durch Antibiotika und Bakterien**

C. elegans wird normalerweise mit Bakterien als Nahrungsquelle kultiviert. Dabei kann es zur unerwünschten Nebenwirkung kommen, dass die zu untersuchenden Stoffe vor allem auf die Bakterien wirken und dadurch erst indirekt auf die Würmer. Beispielsweise kann eine Droge den Nährwert der Bakterien senken und so zur Lebensverlängerung durch Energiereduktion führen.

Auch kann es passieren, dass durch Antibiotikazugabe die normalerweise toxische Wirkung von E. coli auf ältere Würmer nicht stattfindet und diese Wirkung für eine Lebensverlängerung anstelle des eigentlich untersuchten Stoffes verantwortlich ist.

Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, sollte man Experimente zusätzlich mit durch UV-Strahlung abgetöteten E-coli durchführen, oder eine Kultivierung im flüssigen Medium, welches frei von Bakterien ist, durchführen [Collins et al. 2006].

### **Variation zwischen interner und externer Konzentration**

Normalerweise wird C. elegans in Petrischalen mit Agar und E. coli als Nährquelle oder in einem chemically defined-Medium (Flüssigmedium) mit den zusätzlich zu untersuchenden Substanzen kultiviert. Hydrophobe Substanzen können in Dimethyl-Sulfoxiden oder Ethanol vor deren Zugabe gelöst werden. Es wird angenommen, dass die Absorption in den Würmern primär intestinal

erfolgt, aber auch Absorptionen, z. B. durch die Cuticula, möglich sind. Die extern zugegebene Konzentration kann berechnet werden, die Interne jedoch muss gemessen werden.

Studien zu den Unterschieden gibt es z. B. von Davies et al. 2003, wo 400 mmol Ethanol extern zugegeben wurden und 22 mmol Ethanol in den Würmern gemessen wurde. Anhand dieser Daten lässt sich erkennen, wie wichtig es ist, die interne Konzentration zu messen, nicht letztlich um verschiedene Studien miteinander vergleichen zu können [Collins et al. 2006].

## **Hormese**

Bei Hormese handelt es sich um ein Phänomen, bei dem Substanzen oder Behandlungen in geringen Mengen positive oder stimulierende Eigenschaften haben, jedoch in hohen Dosen negativ bzw. toxisch wirken können.

Im Falle einer lebensverlängernden Wirkung, tritt die positive Wirkung bei Zugabe von geringen Mengen eines Stoffes oft durch Stressinduzierung und deren Reaktion darauf auf, z.B. beim Hinaufregulieren der Gene, die für die Wirkung von antioxidativen Stoffen oder Hitzeschockproteinen zuständig sind. Dabei wird angenommen, dass die Nematoden auf molekularer Basis ihre Energie für zukünftige Stressfaktoren erhöhen und zukünftig darauf besser reagieren können.

Man muss jedoch beachten, dass Substanzen, die in hohen Dosen toxisch sind, nicht automatisch in niedrigen Mengen hormetische Wirkung hervorrufen [Butov et al. 2001].

## 4. Nahrungsinhaltsstoffe mit lebensverändernder Wirkung bei *C. elegans*

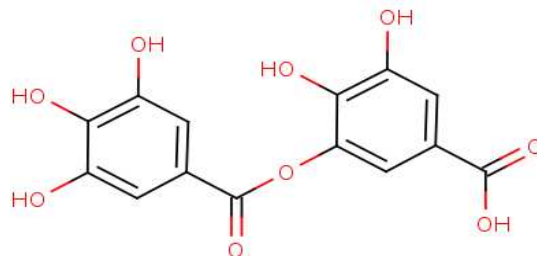
### Polyphenole

#### Polyhydroxyphenole

#### Tanninsäure (TA)

Tanninsäure gehört zu den hydrolysierbaren Tanninen, welche sekundäre Metaboliten mit Polyphenol-Struktur sind. Ihre Proteine wurden früher zur Umwandlung von tierischem Fell zu Leder verwendet.

Tanninsäure besteht aus 5-di-Gallensäure, die kovalent an ein zentrales Glucose-Molekül gebunden ist.



Dieses Gallotannin kommt in vielen Getränken, wie z. B. Rotwein und Tee, sowie in einigen Nahrungsmitteln, wie z. B.: Trauben und Nüssen, vor [Saul et al. 2010].

#### Lebensverlängernder Effekt von TA bei *C. elegans*

Es konnte eine positive Wirkung an N2-Nematoden bei niedrigen Konzentrationen von 20-200 µg festgestellt werden, wobei 100 µg mit einer



mittleren Lifespan-Erhöpfung (im Vergleich zu N2-Würmern ohne TA-Zugabe) von 18 % bei 20 °C als optimal erkannt wurde. Zu toxischer Wirkung kam es bei höheren Dosen von über 400 µg.

Gegenüber thermischem Stress bei achtstündiger Belastung unter 35 °C konnte eine positive Wirkung bei allen Konzentrationen (bis 400 µg) festgestellt werden.

Bei Produktion von oxidativem Stress durch Hydrogenperoxid konnte nur bis zu 200 µg ein positiver Effekt beobachtet werden. Bei höheren Konzentrationen ging dieser verloren bzw. wurde negativ [Saul et al. 2010].

### **Mögliche Wirkungsweisen von TA bei *C. elegans***

#### **Wirkung über den IIS und den daran beteiligten Proteinen**

Bei mehreren Mutantensträngen, deren entfernte Gene mit dem IIS in Verbindung gebracht werden, wie z. B. *daf-16*, *jnk-1*, *daf-12*, *skn-1*, und *sir-2.1*, wurde durch TA eine zusätzlich positive Wirkung auf die mittlere Lebensspanne festgestellt. Damit kann ausgeschlossen werden, dass der IIS bei der Lebensverlängerung durch TA von Bedeutung ist [Saul et al. 2010].

#### **Antimikrobielle und antioxidative Wirkung sind nicht die Hauptursache der Lebensverlängerung**

Bei Würmern, die lebende Bakterien als Nährmedium zur Verfügung hatten, konnte keine signifikante Lebensverlängerung durch Tanninsäure festgestellt werden, bei denen, die mit toten Bakterien gefüttert wurden, jedoch schon. Das bedeutet, dass die antimikrobielle Wirkung als bedeutender Faktor der Lebensverlängerung ausgeschlossen werden kann.

Die Wirkung von Tanninsäure gegen oxidativen Stress ist im Vergleich zu jener gegen thermalen Stress sehr gering. Bei Zugabe von Hydrogenperoxid konnte nur eine sehr geringe Verlängerung der Lebensdauer von *C. elegans*

beobachtet werden. Außerdem konnte an mev-1-Nematoden keine Lebensverlängerung erreicht werden. Daraus kann man erkennen, dass die positive Beeinflussung wahrscheinlich auf die Wirkung gegen thermalen Stress zurückzuführen ist.

Diese Erkenntnis wurde auch in der Studie von Wilson et al. 2006 mit Blaubeer-Polyphenolen festgestellt [Saul et al. 2010].

### **Energierestriktion und Hormese können Lebensverlängerung nur teilweise erklären**

Es wurde zwar nachgewiesen, dass bei niederen Konzentrationen ein positiver Effekt und bei höheren Konzentrationen ein negativer Effekt durch Zugabe von TA auftritt, jedoch war diese Wirkung nur in Bezug auf oxidativen Stress zu beobachten.

Im Gegensatz dazu konnte bei thermalem Stress keine negative Wirkung bei höheren Konzentrationen gegenüber der Vergleichsgruppe beobachtet werden

Ein Hinweis auf ER wären einerseits kein zusätzlicher Effekt an eat-2-Mutanten und andererseits ein reduziertes Körperwachstum in zwei von drei Versuchen. Dagegen spricht jedoch eine unveränderte Pumprate des Pharynx, sowie eine normale Reproduktion nach der Zugabe von TA. ER durch TA kann damit nicht ausgeschlossen werden, aber auch nicht den vollen Effekt der Lebensverlängerung erklären.

### **Erklärungsversuch durch Kombination aus den Erkenntnissen der Disposable-Soma-Theorie und Hormese**

Wilson et al. 2010 hatten mit Blaubeeren die Wirkung über den OSR-1/UNC-43/SEK-1-Weg entdeckt.

Pietsch et al. 2009 entdeckten, dass SEK-1 und UNC-43 durch Quercetin positiv beeinflusst werden, jedoch nicht OSR-1.

In dieser Studie wurde SEK-1, aber nicht OSR-1 und UNC-43 als positives Ziel von TA erkannt. Bei Fehlen von SEK-1 wurde sogar festgestellt, dass TA eine toxische Wirkung hat. [Saul et al. 2010].

Das wirft die Frage auf, ob SEK-1 normalerweise eine Abwehrwirkung auf mögliche durch TA produzierte Folgen bewirkt und diese Wirkung einen hormetischen Effekt hervorruft.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass SEK-1 einen toxischen Effekt von TA mindert und TA zusätzlich über einen noch unbekanntem Weg eine Lebensverlängerung bewirkt.

Würde ersteres zutreffen, kann man zusammenfassend sagen, dass die hauptsächlich lebensverlängernde Wirkung eventuell durch die Erklärung über die Disposable-Soma-Theorie und den Effekt der Hormese erfolgt.

Der Abwehrmechanismus von SEK-1 auf milden pathogenen Stress durch TA würde auf Hormese hindeuten.

Diese Wirkung ruft wiederum als Reaktion eine Verlegung der Energiereserven durch eine verminderte Körperlänge der Nematoden zu Gunsten einer erhöhten Lebensspanne hervor (siehe auch Disposable-Soma-Theorie).

Nach heutigem Wissen könnte dieser Effekt nur die antioxidative bzw. antipathogene Wirkung von TA erklären. Der beträchtliche Effekt gegenüber thermalen Stress wirft jedoch noch immer Fragen für die Zukunft auf [Saul et al. 2010].

## **Flavanole**

### **Proanthocyanidine aus Blaubeeren**

Wilson et al. 2010 erreichten durch Zugabe eines Blaubeerenextrakts (BE) an *C. elegans* des Wildtyps (N2) einen signifikant lebensverlängernden Effekt, der auf die Wirkung der darin enthaltenen Proanthocyanidine (PA) zurückzuführen ist. Das besondere an deren Wirkung ist, dass sie nicht nur das Überleben im Alter hinauszögern, sondern Altersvorgänge während des gesamten Lebens verlangsamen können. Darauf deuten die erniedrigten Werte von Lipofuscin als Marker für altersbedingte Zellschäden hin. Nach Zugabe von BE zu *C. elegans* wurde die Fluoreszenz von Lipofuscin um 20 % gesenkt [Wilson et al. 2010].

### **Aufarbeitung der möglichen Wirkungsweise des Blaubeerenextrakts**

Bei *daf-16*-Würmern, denen Ampicilin als Antibiotikum und BE zugefügt wurde, trat ein zusätzlicher lebensverlängernder Effekt von 30 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (mit BE, ohne Ampicilin) ein. Aus dieser Erkenntnis, kann man die antimikrobielle Wirkung von PA als bedeutenden Faktor ausschließen.

Energiereduktion kann auch als bedeutender Faktor ausgeschlossen werden, da sowohl an *daf-16*-, als auch an *sir-2.1*-Mutanten eine positive Wirkung nach Zugabe von BE gemessen wurde und die Wirkungsweise dieser zwei Gene mit Energiereduktion in Verbindung gebracht wird. Außerdem wurde eine erhöhte Pumprate des Pharynx gemessen, welche bei Energiereduktion erniedrigt sein sollte [Wilson et al. 2006].

Bei Würmern, die mit BE aufgezogen wurden, konnte im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne BE-Zugabe keine zusätzlich positive Wirkung gegen oxidativen Stress nach Zugabe von Paraquat (10 mM) oder Hydrogenperoxid (200 µg) festgestellt werden.

Außerdem konnte auch die Lebensspanne von mev-1-Würmern nicht verlängert werden.

Bei Tieren, die über 16 Stunden einem thermalen Stress bei 35 °C ausgesetzt waren, konnte eine 2,5 fache Überlebensrate im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne BE-Zugabe gemessen werden [Wilson et al. 2006].

Die zusätzliche Wirkung von BE bei daf-16- und skn-1-Mutanten schließt die Beteiligung dieser zwei Gene an der Wirkungsweise von BE auf *C. elegans* aus. Diese zwei Gene werden oft mit antioxidativer und detoxifizierender Wirkung in Verbindung gebracht.

Hingegen wurde bei *osr-1/unc-43/sek-1*-Mutanten keine zusätzliche Wirkung festgestellt. Solomon et al. 2004 zeigten erstmals die zusammenhängende Funktion von OSR-1 mit der MAPK-SEK-1 und der darüber gesteuerten MAPKKK-UNC-43. Verwunderlich daran ist, dass diese Gene mit einer Wirkung gegen stark oxidativen, osmotischen und pathogenen Stress, jedoch nicht gegen thermalen Stress, wo ja BE eine signifikante Wirkung gegen thermalen Stress zeigt, in Verbindung gebracht werden.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass BE einen milden oxidativen Stress erzeugt und dadurch verschiedene auch noch unbekanntes Signalwege stimuliert. Eine andere Möglichkeit wäre, dass OSR-1 und BE unterschiedlich auf Outputs reagieren und somit die Stressresistenz verbessern.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Blaubeer-Polyphenole unter bestimmten Bedingungen die Lebensspanne eines Organismus verbessern können, aber dazu müssen, insbesondere zu dem noch sehr wenig erforschten molekularen Signalweg über *osr-1/unc-43/sek1*, weitere Studien durchgeführt werden [Wilson et al. 2006].

## **Procyanidine aus dem Apfel (AP)**

Procyanidine sind die am häufigsten vorkommenden Polyphenole im Apfel und sind aus den Isomeren Catechin und Epicatechin aufgebaut. Sie werden auch in anderen Pflanzen, wie z. B. Blaubeeren, Trauben und außerdem in vielen pharmazeutisch verwendeten Pflanzen gefunden.

Extrahierte Procyanidine aus dem Apfel zeigten eine signifikante Erhöhung der mittleren Lebensspanne von N2-Würmern nach deren Zugabe. Diese Wirkung war dosisabhängig, wobei 65 µg als optimale Dosis erkannt wurde [Sunagawa et al. 2011].

### **Mögliche Wirkungsweisen von AP auf *C. elegans***

Die Wirkung über Energierestriktion kann ausgeschlossen werden, da weder verminderte Körperlänge, noch verringerte Reproduktion oder Pumprate des Pharynx festgestellt werden konnten.

An mev-1-Würmern wurde keine Lebensverlängerung festgestellt. Damit kann eine Wirkung gegen akuten oxidativen Stress ausgeschlossen werden.

An sir-2.1-Mutanten von *C. elegans* wurde ebenfalls keine Wirkung durch AP festgestellt. Dieses Erkenntnis wurde auch schon bei der Zugabe von Resveratrol an *C. elegans* gemacht.

Bei der Zugabe von AP wird, aber von keiner direkten Wirkung auf SIR-2.1 ausgegangen, sondern von einer Expression über verschiedene Signalfade. Eine andere Möglichkeit wäre, dass AP den NAD<sup>+</sup>-Metabolismus, der SIR-2.1 steuert, beeinflusst.

Ein Rätsel wirft die nicht vorhandene Wirkung von Procyanidinen aus Blaubeeren auf SIR-2.1 auf [Wilson et al. 2006]. Eine mögliche Erklärung dazu wäre die noch unbekannt molekulare Zusammensetzung der Procyanidine in den Blaubeeren.

Abschließend kann man sagen, dass die in der angesprochenen Studie verwendete Menge durchaus auch in natürlichen Produkten vorhanden ist. Durch diese Erkenntnis haben Procyanidine aus Äpfeln ein großes Potential, welches in Zukunft noch genauer erforscht werden sollte [Sunagawa et al. 2011].

### **Catechine**

Catechine sind phenolische Inhaltsstoffe, die beispielsweise in grünem Tee, Kakao, Trauben und Äpfeln zu finden sind. Es wurden bereits mehrere Studien mit Polymeren von Catechinen bzw. mit Proanthocyanidinen, die sich aus verschiedenen Catechin-Polymeren zusammensetzen, gemacht.

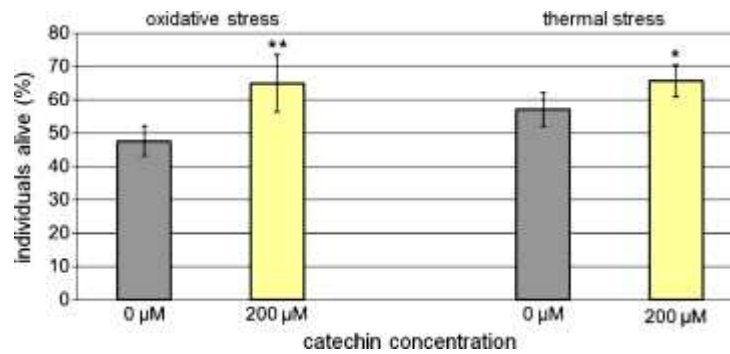
Saul et al. 2010 stellten einen temperatur- und konzentrationsunabhängigen lebensverlängernden Effekt von Catechinhydrat bei *C. elegans* fest. Dabei wurde die größte Steigerung von ca. 15 % der mittleren Lebensspanne bei einer Temperatur von 20 °C und einer Zugabe von 200 µg Catechinhydrat zu *C. elegans* des Wildtyps gegenüber einer Kontrollgruppe ohne Catechinhydratzugabe erreicht [Saul et al. 2010].

### **Analyse des molekularen Wirkungsmechanismus von Catechin auf *C. elegans***

#### **Wirkung gegen oxidativen und thermalen Stress**

Bei einer Temperatur von 35 °C über eine Dauer von 8 Stunden und nach Zugabe von Hydrogenperoxid konnte eine höhere mittlere Lebensspanne durch Catechinzugabe als bei einer catechinfreien Vergleichsgruppe von N2-Würmern festgestellt werden.

Gegen *mev-1*-Mutanten als Indikator für starken oxidativen Stress blieb die Wirkung von Catechin aber aus [Saul et al. 2010].



### 5 Wirkung von Catechin bei oxidativen und thermalen Stress [Saul et al. 2010].

Durch Hormese, antimikrobielle Wirkung und Kalorienrestriktion kann der positive Effekt von Catechin nicht erklärt werden

Die Vermutung auf einen hormetischen Effekt kommt durch die Beteiligung von NHR-8 am lebensverlängernden Effekt durch Catechin auf. NHR-8 wird normalerweise als Abwehrreaktion auf Stress durch Umwelteinflüsse verstärkt exprimiert. Dadurch wird angenommen, dass NHR-8 als Abwehrreaktion auf Catechin selbst exprimiert wird.

Gegen Hormese spricht jedoch deutlich, dass bei allen zugegebenen Konzentrationen eine Lebensverlängerung stattgefunden hat und bei dem Phänomen der Hormese normalerweise nur niedrigere Dosen einen positiven und höhere einen negativen Effekt haben sollten [Saul et al. 2010].

Dass Catechin kaum antimikrobielle Wirkung besitzt, kann aufgrund jener Tatsache angenommen werden, dass zwischen Nematoden-Stämmen, die mit durch UV-Strahlen getöteten E. coli gefüttert wurden, und jenen, die lebende E. coli zu fressen bekamen, ein ähnlich positiver Effekt zu beobachten war.

Energierestriktion (ER) kann aufgrund der verringerten Körperlänge zwar nicht ausgeschlossen werden, aber die fehlende Beteiligung von SIR-2.1, sowie die vergleichbare Wirkung an lebenden und toten Bakterien, die unveränderte Reproduktionsrate und sogar erhöhte Pharynx-Pumpgeschwindigkeit machen ER unwahrscheinlich.

Um ER vollkommen ausschließen zu können sollten in Zukunft noch weitere Tests mit eat-2-Mutanten, sowie Autophagie-Determination gemacht werden. [Saul et al. 2010].



## **Molekulare Wirkungsweise von Catechinhydrat**

Bei den Mutantensträngen *unc-43*, *sek-1*, *jnk-1*, *daf-12*, *daf-16* und *eat-2* konnte jeweils eine signifikante Lebensverlängerung festgestellt werden. Das deutet darauf hin, dass diese Proteine, die wichtig für die klassischen Pfade des Alterns sind, keine bedeutende molekulare Wirkung bei Catechin-induzierter Lebensverlängerung haben [Saul et al 2010].

Eine Ausnahme dabei sind die *akt-2* und *daf-2*-Mutanten, bei denen keine signifikante Lebensverlängerung festgestellt wurde. Dies könnte darauf hindeuten, dass AKT-2 und DAF-2 einen teilweise positiven Mechanismus unabhängig vom IIS auf die Lebensverlängerung durch Catechin ausübt.

Dazu haben Quevedo et al. 2007 berichtet, dass AKT-1 und AKT-2 durch DNA-Schäden induzierte Apoptose unabhängig von DAF-16 negativ regulieren.

Außerdem haben Yu et Larsen 2001 berichtet, dass die Proteine Dauer or Aging adult Overexpression (DAO3) und Hitzeschockprotein-90 (HSP-90) von DAF-2 und AKT-2 in einem DAF-16 unabhängigen Weg reguliert werden.

Diese beiden Erkenntnisse deuten auf eine stressinduzierte Wirkung von AKT-2 und DAF-2 ausgelöst durch Catechin hin.

An Mutanten, bei denen das Gen *nhr-8*, welches an der Biotransformation beteiligt ist und Cytochrom P450 reguliert, ausgeschaltet wurde, konnte keine Lebensverlängerung festgestellt werden. Der Verdacht liegt vor, dass Catechin NHR-8 zusätzlich aktiviert und somit die Biotransformation ankurbelt, oder selbst ein Substrat von NHR-8 ist und das intermediäre Produkt daraus auf eine noch unbekannt Art und Weise lebensverlängernd wirkt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die durch NHR-8, AKT-2 und DAF-2 beeinflusste Stressresistenz und Reparaturmechanismen in einer Kombination auf verschiedene Arten eher detoxifizierend als rein antioxidativ wirken. Die Verlegung von Energiereserven von Körpergröße zu zellulärer Abwehr und Stressantwort deuten auf eine Wirkung hin, wie es die Disposable-Soma-Theorie beschreibt.

Die Art der Wirkungsweise über diese Gene ist bei natürlichen Substanzen bisher einzigartig [Saul et al. 2010].

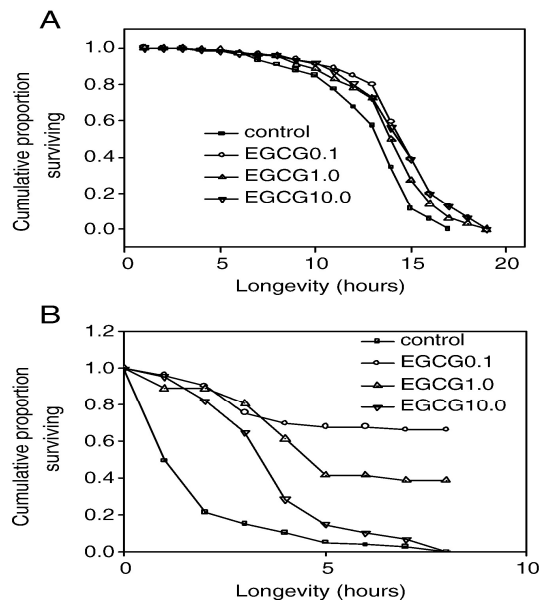
### **Eppigallocatechin Gallate (EGCG)**

EGCG sind eine polymere Form der Catechine und werden in der Natur als wichtiger Bestandteil des grünen Tees gefunden. Unter anderem wird ihnen sowohl eine antikanzerogene und blutdrucksenkende, als auch eine „revitalisierende“ Wirkung nachgesagt.

Auf die Lebensspanne von *C. elegans* konnte unter normalen Bedingungen keine Wirkung festgestellt werden, jedoch sehr wohl unter oxidativem bzw. thermalem Stress, wo eine signifikante Wirkung auf die mittlere und maximale Lebensspanne beobachtet wurde.

Unter thermalem Stress (35 °C) konnte nach Zugabe von EGCG die Überlebensrate von *C. elegans* um bis zu 13,1 % bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml gesteigert werden.

Bei einem Versuch mit einer Gruppe von Nematoden, die mit EGCG behandelt wurden, überlebten nach Zugabe von 500 µg Juglone zu einem bestimmten Zeitpunkt noch 50 %. Jedoch in der Vergleichsgruppe ohne EGCG-Zugabe war zu diesem Zeitpunkt kein Wurm mehr am Leben [Zhang et al. 2009].



**6 Lebensverlängernde Wirkung von EGCG A unter thermalem Stress und B unter oxidativem Stress [Zhang et al. 2009].**

### **SOD-3 und HSP-16.2 als wichtige Komponenten der antioxidativen Wirkung von EGCG**

Die gemessene Fluoreszenz von SOD-3 gebunden an GFP war im transgenen *C. elegans*-Strang CF1553 nach Zugabe von EGCG um bis zu 49 % erhöht.

Die HSP-16.2-Expression wurde ebenfalls nach einstündiger Hitzebelastung bei 35 °C und darauffolgender Regeneration von 24 Stunden bei 20 °C gebunden an ein GFP gemessen.

Dabei wurde beim transgenen Strang CI2070 nach Behandlung mit EGCG um 11,9 % mehr HSP-16.2-Fluoreszenz im Vergleich zu einer Gruppe ohne EGCG Zugabe gemessen [Zhang et al. 2009].

### **Mögliche lebensveränderte Wirkungsweise von EGCG bei *C. elegans***

Die RNAi-Expression von *daf-16*, *sod-3* und *skn-1* wurde nach EGCG-Zugabe erhöht gemessen. Das bedeutet, dass die Wirkung möglicherweise über DAF-

16 und den IIS in Kombination mit SKN-1 erfolgt, welche die Expression von SOD-3 und HSP-16.2 kontrolliert.

Die direkte Wirkung gegen durch oxidativen bzw. thermalen Stress erzeugte Radikale könnte somit durch einen erhöhten Level an HSP-16.2 und SOD-3 stattfinden. Eine verstärkte Expression *daf-16*, *sod-3* und *skn-1* wurde bei einer RNA-i-Untersuchung nach Zugabe von EGCG zu *C. elegans* vermehrt gemessen [Zhang et al. 2009].

Energierestriktion kann nicht ganz ausgeschlossen werden, da eine erniedrigte pharyngeale Pumprate bei *C. elegans* nach EGCG-Zugabe festgestellt wurde. Um diese vollkommen ausschließen zu können, sollten noch weitere Studien durchgeführt werden [Brown et al. 2006].

## **Flavonole**

### **Quercetin**

Quercetin kommt in mehreren Nahrungsmitteln, u.a. in Äpfeln, Zwiebeln, Wein, Broccoli und Blaubeeren, vor. Die positive Wirkung bei *C. elegans* basiert auf einer Lebensverlängerung mit zusätzlicher Steigerung der Fitness [Pietsch et al. 2010].

### **Lebensverlängerung bei *C. elegans* in einer hormetischen Weise**

Auf eine hormetische Wirkung von Quercetin deuten bei den Konzentrationen von 100 und 200 µg eine positive (+11 % und +18 % im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Quercetin-Zugabe) und ab 250 µg eine negative Wirkung nach Zugabe an *C. elegans* hin [Pietsch et al. 2010].

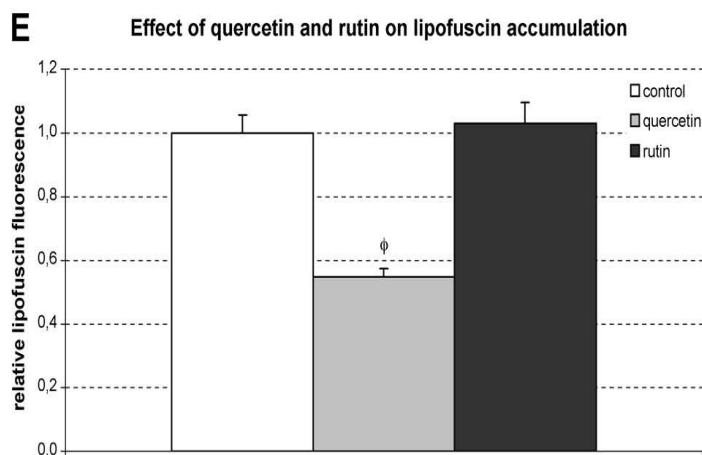
## Positive Wirkung gegen thermalen Stress

Eine erhöhte Überlebensrate nach 7,5-stündiger Behandlung mit thermalem Stress bei 37 °C von 12 % gegenüber einer Quercetin-freien Vergleichsgruppe konnte festgestellt werden [Kampkötter et al. 2007a].

## Keine direkt antioxidative Wirkung von Quercetin

Es wurde festgestellt, dass die Wirkung gegen oxidativen und thermalen Stress nicht durch eine erhöhte Expression der antioxidativen Enzyme GST-4 und SOD-3 stattfindet, sondern durch eine mögliche Beeinflussung molekularer Signalwege.

Daraufhin deutet auch eine 40 % geringere Fluoreszenz von Lipofuscin im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nach Zugabe von DMSO (Dimethylsulfoxid) zu *C. elegans* im Flüssigmedium hin [Kampkötter et al. 2007a, 2008].



**7 Effekte von Quercetin auf die Lipofuscinwerte [Kampkötter et al. 2007a].**

## Antimikrobielle Wirkung und Energierestriktion

Die Erkenntnis, dass mit toten *E. coli* gefütterte Würmer nach Quercetin-Zugabe im Mittel um 60 % länger leben als Würmer, die mit lebenden *E. coli* aufgezogen wurden, schließt eine antimikrobielle Wirkung von Quercetin aus.

Energierestriktion kann sowohl aufgrund der unveränderten Reproduktionsfähigkeit, als auch der gleichgebliebenen Körperlänge, trotz Quercetin-Behandlung ausgeschlossen werden [Pietsch et al. 2010].

### **Molekulare Mechanismen der Lebensveränderung bei Quercetin-Zugabe**

An 13 getesteten Mutantensträngen von *C. elegans* konnte nur bei *daf-2*, *age-1*, *sek-1* und *unc-43* keine Veränderung der Lebensdauer nach Zugabe von Quercetin festgestellt werden. Dieses Ergebnis wirft einige Fragen auf [Pietsch et al. 2010]:

- Eine Frage entsteht dadurch, dass AGE-1 und DAF-2 eine Schlüsselrolle bei der durch Quercetin vermittelten Lebensverlängerung spielen, im Gegensatz zu DAF-16, das über den IIS durch diese zwei Liganden kontrolliert wird.

Eine mögliche Antwort wäre eine vorhandene Translokation von DAF-16 in den Nucleus bei fehlenden Co-Faktoren, wie z. B. GST-4 und SOD-3, die durch Quercetin unterdrückt werden.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass *daf-16*-Würmer anfällig auf oxidativen und thermalen Stress sind und Quercetin positiv auf *daf-16*-Stämme wirkt und somit den negativen Effekt ausgleicht.

Ein drittes Szenario wäre, dass *daf-2*- und *age-1*-Würmer bereits sehr robuste Anti-Stress-Eigenschaften besitzen bzw. deren lebensverlängernde Eigenschaften schon am Maximum liegen und der Effekt von Quercetin dadurch maskiert wird.

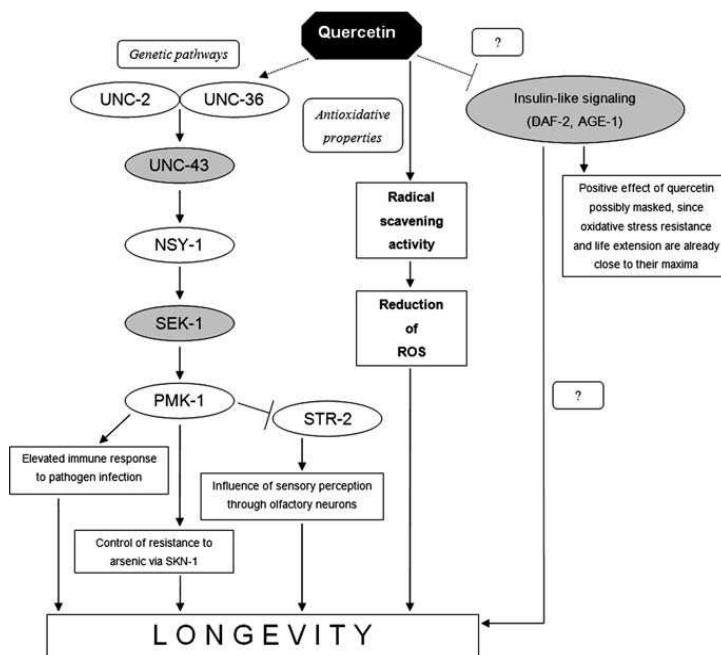
- Eine weitere Frage wird durch die positive Veränderung von *akt-2*-Mutanten hervorgerufen, welche normalerweise durch AGE-1 und DAF-2 kontrolliert werden.

Eine mögliche Antwort darauf wäre, dass der AKT/PKB-Kinase-Komplex eher bei Dauerformen von *C. elegans* von Bedeutung ist und durch Quercetin-

Zugabe eine zusätzlich lebensverlängernde Wirkung erreicht wurde (siehe auch IIS) [Pietsch et al. 2010].

Noch komplexer wird die Fragestellung durch die Involvierung von UNC-43 und SEK-1 in den Wirkungspfad. Die Wirkung über diese Gene wurde schon bei Blaubeer-Polyphenolen erkannt und könnte über deren Wirkung im immanenten Immunsystem die präventive Wirkung von Quercetin gegenüber Alterungsprozessen erklären (siehe MAP-Kinasen).

Drei mögliche Pfade dienen derzeit zur Erklärung der Lebensverlängerung durch Quercetin-Zugabe bei *C. elegans*, wobei der Pfad an dem DAF-2 und AGE-1 beteiligt sind mit einem Fragezeichen versetzt ist, da hier die mögliche Wirkung durch die starken antioxidativen Effekte von Quercetin maskiert sein könnten und der eigentliche Weg über den UNC-43- und SEK-1-Pfad führt [Pietsch et al. 2010].



### 8 Molekulare Pfade beeinflusst durch Quercetin bei *C. elegans* [Pietsch et al. 2010].

Würde diese Vermutung der maskierten Effekte von Quercetin zutreffen, stellt sich die prinzipielle Frage, ob einzelne Mutantenstränge - insbesondere jene mit robusten Anti-Stress-Eigenschaften - für Lifespan-Versuche herangezogen,

Ergebnisse verglichen und interpretiert werden können, ohne die genauen Einzelheiten der physiologischen Vorgänge zu kennen [Pietsch et al. 2010].

### **Kaempferol und Fisetin**

Kaempferol ist eines der bedeutendsten Flavanoide in Nahrungsmitteln und Fisetin ähnelt ihm strukturell. Beide kommen beispielsweise in Äpfeln, Zwiebeln, Trauben und verschiedenen Gewürzen vor [Kampkötter et al. 2007].

#### **Positive Wirkungsmechanismen von Kaempferol und Fisetin auf *C. elegans***

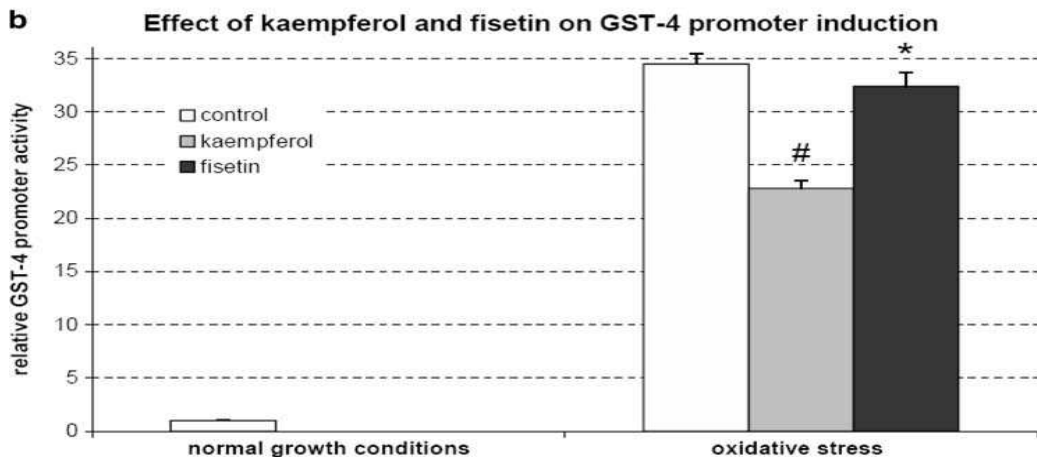
Nach Belastung durch thermalen Stress bei 37 °C von *C. elegans* des transparenten Stranges BL-1 im flüssigen Medium, die zuvor mit Kaempferol oder Fisetin angereichert wurden, konnte bei Kaempferol eine 10-prozentige und bei Fisetin eine 6-prozentige Steigerung des mittleren Lifespans beobachtet werden.

Die Ergebnisse wurden im Vergleich mit einer Kontrollgruppe, der zuvor DMSO anstatt von Kaempferol oder Fisetin zugegeben wurde, ermittelt.

Zugabe des Reduktanz Juglone in das Flüssig-Medium von *C. elegans* des transgenen Stranges BL-1 verursachte einen Anstieg von GST-4 als Reaktion auf den dadurch entstandenen oxidativen Stress. Dieser Anstieg wurde durch die Bindung eines GFP an die BL-1-Nematoden gemessen.

Bei vorhergehender Behandlung mit Kaempferol oder Fisetin wurde eine signifikant geringere Expression von GST-4 als Marker für oxidativen Stress beobachtet. Somit kann angenommen werden, dass Kaempferol und Fisetin positiv gegenüber oxidativen Stress wirken. Im Vergleich zwischen Kaempferol und Fisetin schnitt jedoch Kaempferol deutlich besser ab [Kampkötter et al. 2007].





### 9 Beeinflussung der Stress Promotors GST-4 durch Kaempferol und Fisetin [Kampkötter et al. 2007].

Die Lipofuscinwerte als Marker für altersbedingte Zellschäden konnten nur bei Kaempferol signifikant gesenkt werden.

### Molekulare Effekte von Kaempferol und Fisetin durch die subzelluläre Lokalisation von DAF-16

Ob eine lebensverlängerte Wirkung über den DAF-16-Pfad (siehe oben) stattgefunden wurde am C.elegans-Strang TJ356 getestet welches DAF-16 an das GFP koppelt.

Dabei konnte eine signifikante Lokalisation von DAF-16 aus dem Cytosol in den Nukleus nach Zugabe von Kaempferol und Fisetin festgestellt werden.

### Zusammenfassende Erkenntnisse

Trotz der Beeinflussung von DAF-16 durch Kampferol und Fisetin und möglicherweise damit verbundene Wirkung über bestimmte Signalwege wird angenommen, dass die hauptsächliche Wirkung durch das Auffangen von ROS stattfindet.

Diese Annahme erfolgt dadurch, dass gegen oxidativen Stress im Versuch nur Kaempferol eine deutlich bessere Wirkung als Fisetin zeigte [Kampkötter et al. 2007].

Hingegen zeigte sich bei beiden Flavanoiden in ähnlichem Ausmaß eine Lokalisation von DAF-16 in den Nukleus.

In einigen Studien wurde erkannt, dass mehrere Co-Faktoren eine Rolle spielen, um die transkriptionelle Wirkung von DAF-16 zur Geltung zu bringen.

Damit könnte die geringere Wirkung von Fisetin auf oxidativen Stress so erklärt werden, dass bestimmte Co-Faktoren fehlen, um die Wirkung von DAF-16 zu entfalten.

Um diese Annahmen weiter zu unterstützen sind jedoch weitere Studien zu der molekularen Wirkungsweise dieser zwei Flavanoide nötig [Kampkötter et al. 2007].

### **Resveratrol**

Resveratrol kommt in vielen Nahrungsmitteln - besonders in Weintrauben - und medizinischen Pflanzen vor.

Seine lebensverlängernde Eigenschaft bei *C. elegans* erfolgt vermutlich über die Stimulierung von Autophagie.

Die direkten Effekte von Resveratrol sind in vivo schwierig zu messen, da Resveratrol sehr schnell vom Körper absorbiert wird und nach Zugabe noch ca. zwei Prozent freies Resveratrol gemessen werden kann. Der Rest wird vermutlich zu konjugierten Formen wie Glucuronid- und Sulfat-Resveratrol umgewandelt [Gruber et al. 2007].

### **Erhöhung der Lebensspanne bei Resveratrol Zugabe zu *C. elegans***

Eine signifikante Erhöhung der mittleren und der maximalen Lebensspanne bei einer Konzentration von 1 mM konnte an N2-Nematoden nach Resveratrol-Zugabe im Vergleich zu N2-Stämmen ohne Resveratrol-Zugabe gemessen werden [Viswanthan et al. 2005].

Die mittlere Überlebensrate nach Belastung mit oxidativen Stress verursacht durch Paraquat konnte durch vorherige Resveratrol-Zugabe um 13 Tage im Vergleich zu unbehandelten Nematoden gesteigert werden [Gruber et al. 2007].

### **Molekulare Mechanismen, die eine Lebensveränderung durch Resveratrol-Zugabe bewirken**

Körperlänge, pharyngeale Pumprate und Reproduktion bleiben nach Resveratrol-Zugabe zu *C. elegans* nahezu unverändert. Aus diesen Erkenntnissen kann eine positive Wirkung von Resveratrol über Energierestriktion ausgeschlossen werden [Gruber et al. 2007].

Bei *sir-2.1*-Mutanten konnte keine zusätzliche Steigerung durch Resveratrol-Zugabe erkannt werden, bei *daf-16*-Mutanten hingegen schon. Dieses Ergebnis ist verwunderlich, da eine Wirkung von SIR-2.1 über den IIS-Pfad bisher mit einer Steuerung von DAF-16 in Verbindung gebracht wurde [Viswanthan et al. 2005].

Eine Microarray-Analyse des Genoms von N2- und *daf-16*-Würmern nach Resveratrol-Zugabe zeigte, dass Gene der *pqn*-Gruppe, insbesondere die *abu*-Gene, vermehrt exprimiert wurden.

Deren Funktion ist die Encodierung von prion-ähnlichen glutamin/asparaginreichen Proteinen (14.3.3-Proteine), die bei der ER-Stress-Reaktion zur Blockierung der Transkription falsch gefalteter Proteine beteiligt sind.

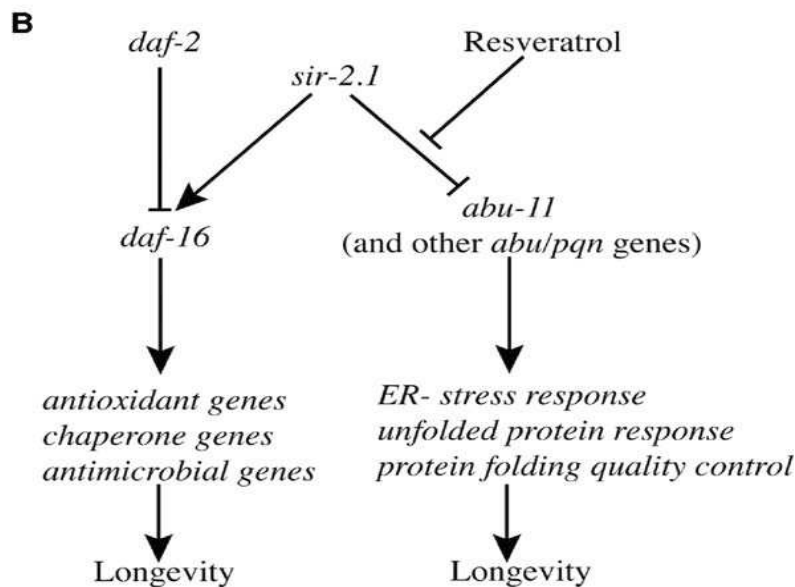
Nach einer RNA-i-Untersuchung wurde insbesondere die *abu-11*-Gruppe als bedeutend in Bezug auf Lebensverlängerung durch Resveratrol identifiziert [Viswanthan et al. 2005].

Außerdem wurde erkannt, dass bei *sir-2.1*-Mutanten die Gene der *abu*-Gruppe noch stärker als bei N2- und bei *daf-16*-Nematoden hinaufreguliert wurden. Dieses Ergebnis war überraschend, da ja SIR-2.1 und ABU-11 als bedeutend in

Bezug auf die Lebensverlängerung erkannt wurden und nun beim Ausschalten von *sir-2.1* *abu-11*-Gene verstärkt exprimiert wurden.

Erklärt werden könnte dies durch eine Doppelrolle von SIR-2.1, indem es einerseits durch Resveratrol gehemmt wird und somit *abu-11* vermehrt exprimiert werden kann, und andererseits kann es in seiner aktiven nicht an Resveratrol gebundenen Form über den IIS in einer noch ungeklärten Weise unabhängig von DAF-16 wirken.

Resveratrol könnte somit eine Rolle bei der Steuerung des Gleichgewichts zwischen dem Weg über den reduzierten IIS-Pfad und der vermehrten Expression von Genen verantwortlich für Autophagie entgegenkommen [Viswanthan et al. 2005].



**10 Mögliche Wirkung von Resveratrol auf molekulare Signalwege bei *C. elegans* [Gruber et al. 2007].**

## **Phenolische Säuren**

### **Kaffeesäure und Rosmarinsäure**

Kaffeesäure (CA), einem Cinnamat, und Rosmarinsäure (RA), einem Cinnamat-Konjugat, wird eine lebensverlängernde Wirkung an *C. elegans* nachgesagt. Sie sind sehr häufig vorkommende sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.

Diese beiden Phenolsäuren wirken unabhängig von Energierestriktion in bestimmten Dosen positiv auf die Lebensspanne von *C. elegans* [Pietsch et al. 2011].

### **Wirkungsweise der Lebensveränderung durch CA und RA**

Die Zugabe von 250 und 300 µg RA zu *C. elegans* konnte mit einer signifikanten Erhöhung der mittleren Lebensspanne in Verbindung gebracht werden.

Bei RA konnte bei einer Zugabe zu *C. elegans* in den Konzentrationen von 250 und 300 µg eine signifikante Erhöhung der mittleren Lebensspanne beobachtet werden.

Ab Konzentrationen von 600 µg wurde ein negativer Effekt beobachtet, was auf eine hormetische Wirkungsweise von RA hindeutet. Auf diesen Effekt deutet auch eine Hinaufregulation von Hitzeschockproteinen nach RA-Zugabe hin.

Bei CA hingegen konnte keine hormetische Wirkung festgestellt werden und die optimale Erhöhung der mittleren Lebensspanne bei einer Konzentration von 300 µg beobachtet werden.

### **Erklärungsansatz der Wirkungsweise von RA und CA**

Da nach Zugabe von RA und CA zu Nematoden, die mit UV-Licht getöteten Bakterien ernährt wurden, eine intensivere Steigerung der mittleren

Lebensspanne, als bei mit lebenden Bakterien aufgezogenen Nematoden beobachtet wurde, können anti-bakterielle Eigenschaften als Wirkungsursache ausgeschlossen werden [Pietsch et al. 2011].

Eine geringere Reproduktion nach RA-Zugabe, sowie ein vermindertes Wachstum nach RA und CA-Zugabe konnten beobachtet werden.

Außerdem konnte den Würmern nach Zugabe von CA eine geringere Fluoreszenz von Nile Red (ein Marker für die in vivo-Detektion von Lipiden in den Lysosym-abhängigen Organellen im Intestinaltrakt), als bei einer Vergleichsgruppe ohne CA-Zugabe festgestellt werden, was auf geringere Fettreserven hindeutet.

Wenn man diese Fitnessparameter zusammenfasst, kann die Disposable Soma Theorie mit ihrer Aussage zur Verschiebung der Priorität von Energiereserven zur Erhöhung der Langlebigkeit zumindest teilweise den lebensverlängernden Effekt von RA und CA erklären.

An mev-1-Wurmstämmen konnte nach CA- und RA-Zugabe eine Erhöhung der mittleren Lebensspanne um ca. 10 % erreicht werden.

Außerdem konnte bei CA eine signifikante Reduktion der Fluoreszenz von Lipofuscin beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass besonders CA ein antioxidatives Potential besitzt.

### **Molekulare Mechanismen, die zur Lebensverlängerung beitragen**

Bei Zugabe von CA und RA konnte bei den Wurmstämmen *osr-1*, *unc-43* und *sek-1* keine positive Veränderung festgestellt werden. Die Erkenntnis deutet auf eine maßgebliche Beteiligung dieser drei Gene an der lebensverlängernden Wirkung von CA und RA bei *C. elegans* hin. Zu dieser Erkenntnis kamen auch schon Wilson et. al 2006 bei Studien mit Blaubeerextrakt an *C. elegans* [Pietsch et al. 2011].

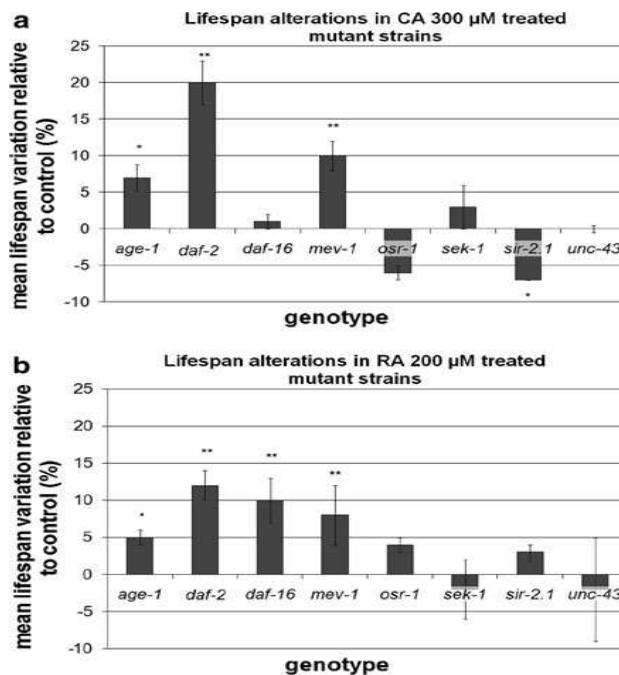
Bei Zugabe von CA zu *sir-2.1*- und *daf-16*-Würmern konnte auch kein zusätzlicher Effekt erkannt werden. Das deutet bei Zugabe von CA auf eine Aktivierung von DAF-16 durch SIR- 2.1 möglicherweise über 14-3-3 Proteine hin.

Diese Wirkung findet wahrscheinlich unabhängig vom IIS statt, da an *daf-2*-Mutanten ein zusätzlicher Effekt von CA beobachtet wurde.

Außerdem könnte CA auch zusätzlich über einen SIR-2.1-abhängigen ER Stress-Antwort-Weg lebensverlängernd wirken.

RA, welches nur bei *sir-2.1*-Mutanten keinen Effekt zeigt, könnte auch über diesen ER-Stress-abhängigen Pfad wirken. Eine Möglichkeit, warum keine Wirkung von RA über den DAF-16-Pfad entdeckt wurde, könnte mit einer teilweisen Hydrolyse zu CA erklärt werden.

Zukünftig müssen dazu jedoch weitere Tests erfolgen, um die genauen physiologischen Wege von RA und CA in Bezug auf Lebensverlängerung zu identifizieren [Pietsch et al. 2011].



**11** Veränderung der mittleren Lebensspanne durch CA und RA bei einzelnen Mutantentypen von *C. elegans* [Pietsch et al. 2011].

## **Sonstige nicht flavanoide Polyphenole**

### **Curcumin**

Curcumin ist der am häufigsten vorkommende polyphenole Bestandteil in indischen Gewürzen, wie z. B. Safran, und ist auch ein bedeutender Bestandteil von Currypulver. Außerdem wird es häufig als Farbstoff in Nahrungsmitteln verwendet.

Curcumin werden eine Reihe von Eigenschaften zugesagt, wie z. B. eine antioxidative und entzündungshemmende Wirkung.

Mit einer als optimal erwiesenen Konzentration von 20 µg Curcumin kann die mittlere Lebensspanne von N2-Würmern signifikant gesteigert werden [Liao et al. 2011].

### **Details zur Wirkungsweise von Curcumin auf *C. elegans***

Bei *C. elegans*, die tote Bakterien als Nahrungsquelle erhielten, konnte die mittlere und maximale Lebensdauer durch Curcumin ebenfalls signifikant gesteigert werden.

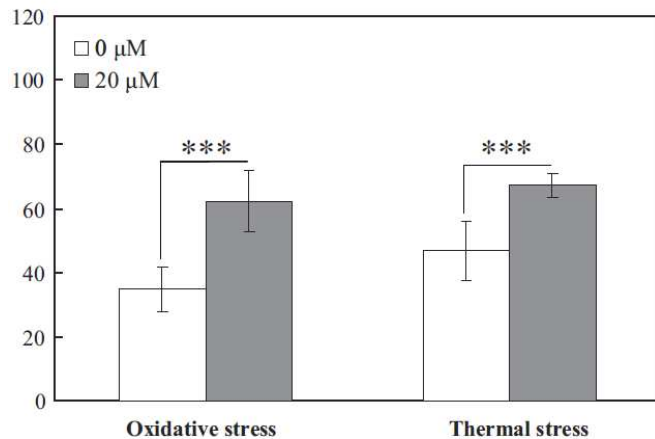
Somit kann eine antimikrobielle Wirkung als hauptsächlich lebensverlängernder Effekt ausgeschlossen werden.

Bei mit Curcumin aufgezogenen Nematoden des *mev-1*-Mutantenstranges wurde im Vergleich zu einer Gruppe ohne Curcumin-Zugabe eine Erhöhung der Überlebensrate unter durch 250 µg Juglone zugeführtem oxidativen Stress erkannt [Liao et al. 2011].

Die Überlebensrate nach Zuführung von Curcumin wurde auch nach thermischem Stress über sieben Stunden bei 37 °C signifikant erhöht.



Zusätzlich wurden am vierten und am achten Tag des adulten Stadiums bei N2-Würmern im Vergleich zu unbehandelten N2-Nematoden eine signifikant verringerte Lipofuscinfluoreszenz um 39,5 % und 47,5 % festgestellt.



## 12 Wirkung von Curcumin bei oxidativen und thermalen Stress [Liao et al. 2011].

Auf Energierestriktion deuten z. B. verminderte Körpergröße und eine geringere Pharynxpumprate hin. Jedoch konnte keine verminderte Reproduktionsrate festgestellt werden, welche normalerweise ein wichtiger Hinweis auf Energierestriktion ist.

Da weder an sir-2.1- noch an sek-1-Mutanten eine Lebensverlängerung festgestellt werden konnte, wird angenommen, dass diese zwei Gene an einem molekularen Pfad beteiligt sind, der einen ähnlichen Zustand wie Energiereduktion bei den Nematoden bewirkt.

## Molekulare Wirkungsweise von Curcumin bei *C. elegans*

Eine zusätzliche Wirkung an daf-16-, jedoch aber keine Wirkung an age-1-Mutanten lässt vermuten, dass AGE-1 unabhängig von DAF-16 über den IIS in einer noch ungeklärten Weise positiv auf die Lebensspanne von *C. elegans* wirkt. Ähnliche Erkenntnisse konnten auch Pietsch et al. 2009 bei Quercetin-Zugabe zu *C. elegans* erkennen [Liao et al. 2011].

Die Lebensspanne von osr-1-, sek-1-, unc-43- und skn-1-Mutanten wurde ebenfalls nicht durch Curcumin-Zugabe verändert. Ein Zusammenhang der

Calmodulinkinase-II mit OSR-1 und SEK-1 wurde bereits von Wilson et al. 2006 nach Zugabe von Polyphenolen aus Blaubeeren zu *C. elegans* beschrieben.

Eine mögliche Wirkungsweise von Curcumin könnte somit über erhöhte Stressresistenz durch die CaMKII und der p38-Kinase, sowie deren Verlegung von SKN-1 in den Zellkern erfolgen.

Auch der MAPK JNK-1-Pfad könnte an der Lebensverlängerung beteiligt sein, da beim Ausschluss des beteiligten Gens *mek-1* trotz Curcumin-Zugabe keine zusätzliche Lebensverlängerung erkannt werden konnte.

Offene Fragen wirft die fehlende antimikrobielle Wirkung von Curcumin auf, da MEK-1 und SEK-1 in einem gemeinsamen Pfad dafür bekannt sind, die antimikrobielle Abwehr zu steigern.

Eine andere Frage wirft die negative Wirkung von 20 µg Curcumin auf *sek-1*-Mutanten auf. Es ist möglich, dass noch unbekannte Mechanismen in die Lebensverlängerung involviert sind, oder dass niedrige Dosen von Curcumin durch geringe Toxizität die durch *sek-1* und *mek-1* eingeleitete pathogene Abwehrreaktion stimuliert.

Um diese Fragen - entstanden durch die Vielzahl an beteiligten Genen bei der lebensverlängernden Wirkung durch Curcumin - beantworten zu können, müssen dazu noch einige weitere Untersuchungen zu dessen Signalwegen durchgeführt werden [Liao et al. 2011].

## Vitamine

### Vitamin E

Vitamin E gilt als eines der bedeutendsten kettenbrechenden Antioxidantien beim Menschen und kommt in *C. elegans* in zwei bedeutenden Formen vor. Bei *C. elegans* sind Tocotrienole als Antioxidans in Bezug auf Lebensverlängerung am bedeutendsten. Dabei wurde ein um 40-60 % höheres antioxidatives Potential von Tocotrienolen gegenüber Tocopherolen festgestellt. Beim Menschen allerdings ist überwiegend Alpha-Tocopherol aufgrund der um ein Drittel höheren Bioverfügbarkeit im Vergleich zu Tocotrienol von Bedeutung [Adachi et Ishii 2000].

### **Wirkungsweise von Tocotrienol bei *C. elegans* gegenüber oxidativem Stress**

Bei Zugabe von Tocotrienol zu Nematoden des Wildtyps N2 konnte ein signifikanter Anstieg der mittleren Lebensspanne um 1,5 Tage bei einer Konzentration von 8 µg/ml und um 3,2 Tage bei einer Konzentration von 80 µg/ml im Vergleich zu einer Gruppe von N2-Würmern ohne Tocotrienol-Zugabe beobachtet werden. Bei Alpha-Tocopherol-Zugabe konnte keine positive Veränderung beobachtet werden.

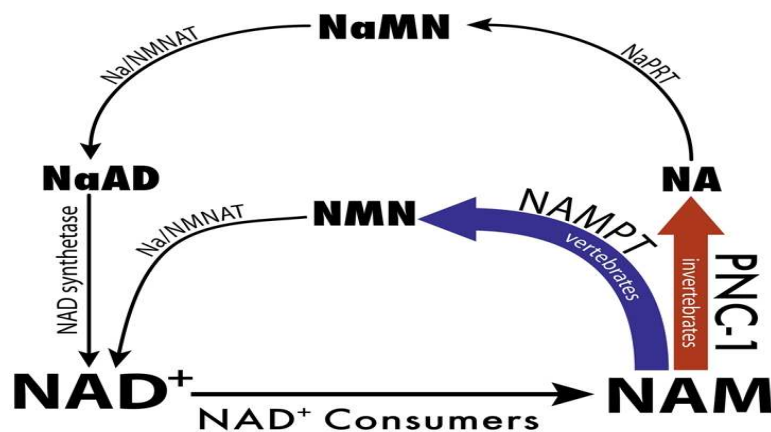
Eine signifikant positive Wirkung gegen oxidativen Stress zeigen eine verminderte Menge von Protein-Carbonyl, sowie eine positive Wirkung gegen durch UV-Strahlen verursachten oxidativen Stress durch Tocotrienol-Zugabe.

Um deren Funktionsweise klarer darstellen zu können, sollten in Zukunft noch weitere Studien zu den molekularen Signalwegen von Tocotrienolen durchgeführt werden.

## NAD<sup>+</sup>

NAD<sup>+</sup> ist ein bedeutendes Reduktans in der zellulären Biochemie. Von Bedeutung ist das Shutteln von Elektronen zwischen NAD<sup>+</sup> und NADH bei der oxidativen Phosphorylierung. Außerdem hat es bedeutende Funktionen als Co-Substrat einiger Enzyme.

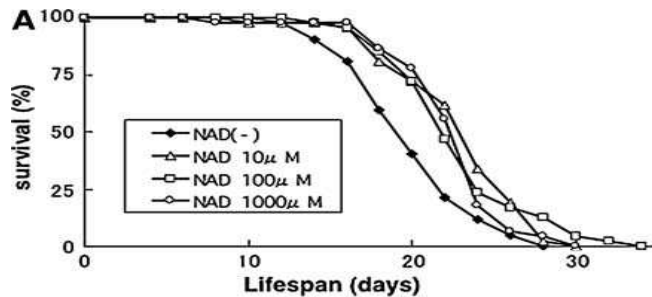
Bei invertebraten Spezies, wie z. B. *C. elegans*, wird NAD<sup>+</sup> über einen längeren Pfad als bei Vertebraten synthetisiert [Vrablik et al. 2009].



13 Biosynthese Pfade von NAD [Vrablik et al. 2009].

### Lebensverlängernder Effekt von Nicotinamid bei *C. elegans*

Der wirkungsvollste Effekt von NAD<sup>+</sup> auf den Lifespan von N2-Nematoden wurde bei einer Zugabe von 100 µg mit einer 15-prozentigen Steigerung gegenüber einer Kontrollgruppe ohne NAD<sup>+</sup>-Zugabe erkannt. Dazu muss man sagen, dass die interne Konzentration von NAD<sup>+</sup> bei *C. elegans* bisher noch unbekannt ist und daher auch die tatsächlich metabolisierte Menge unbekannt ist [Hashimoto et al. 2010].



#### 14 Erhöhung der Lebensspanne bei unterschiedlichen Konzentrationen von NAD [Hashimoto et al. 2010].

#### Lebensverändernde Wirkung auf molekularer Ebene nicht über Energierestriktion, sondern über den IIS

Gegen einen lebensverlängernden Effekt über Energierestriktion sprechen einerseits eine unveränderte Körperlänge und andererseits keine Veränderung der Reproduktionsleistung.

Bei RNA-i von Nematoden ohne *daf-16* und *sir-2.1* tritt keine positive Veränderung der Lebensspanne ein. Dieses Erkenntnis deutet auf einen lebensverlängernden Effekt über den IIS hin.

Bisher ist unbekannt, wie die  $\text{NAD}^+$ -Zugabe den Nucleus, in dem SIR-2.1 agiert, und die  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Rate in den Mitochondrien beeinflusst. Eine Zeit lang wurde angenommen, dass der lebensverlängernde Effekt über Energierestriktion stattfindet und dabei  $\text{NAD}^+$  und SIR-2.1 aktiviert.

Neue Erkenntnisse verbinden allerdings die positiven Effekte von  $\text{NAD}^+$  mit einer Wirkung über SIR-2.1, DAF-16 und deren Transkriptionsziele im IIS. Bei  $\text{NAD}^+$ -Zugabe bleibt die gesamte Menge von DAF-16 und SIR-2.1 gleich, nur die Menge der bekannten Transkriptionsziele, wie SOD-3 und FAT-7, steigen durch deren Akkumulation in den Zellkernen an.

Ein Grund, weshalb Energierestriktion aber trotzdem nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, ist dabei die vermehrte Transkription von SOD-4,

das normalerweise über PHA-4 bei Energierestriktion vermehrt transkribiert wird.

Bei Stämmen von *daf-16*-Mutanten bleibt die vermehrte Expression von SOD-4 erhalten, doch der lebensverlängernde Effekt von  $\text{NAD}^+$  bleibt aus.

Diese Erkenntnis lässt darauf schließen, dass der lebensverlängernde Effekt über den IIS stattfindet, jedoch andere Mechanismen wie z. B. Energierestriktion, durch die vermehrte Expression und die Unkenntnis der Regulation der  $\text{NAD}^+$ -Level nicht ausgeschlossen werden können.

Wenn SIR-2.1 durch  $\text{NAD}^+$  über diesen Pfad aktiviert wird, könnte so eine Reaktion auf Alterserscheinungen und -erkrankungen erfolgen [Hashimoto et al. 2010].

## Coenzym Q (CoQ)

CoQ ist in aeroben Organismen ein bedeutender Teil der mitochondrialen Atmungskette. Es ist am Elektronentransport bei der ATP-Generierung beteiligt. Dabei ist es beim Transport von Elektronen in den Komplexen I, II und III der Atmungskette aktiv.

Es gibt verschiedene Isoformen von CoQ, wobei in *C. elegans* die Form CoQ9 und beim Menschen CoQ10 selbst synthetisiert werden kann. *C. elegans* synthetisiert CoQ teilweise selber, erhält aber auch einen beträchtlichen Teil von Bakterien aus dem Nährmedium [Yang et al. 2009].

Lebensverändernde Mechanismen wurden insbesondere bei den Formen Demethoxy-Q9 (DMQ9) und Coenzym Q10 gefunden.

## Demethoxy-Q9 (DMQ9)

DMQ9 ist ein Zwischenprodukt der CoQ-Biosynthese. Bei *clk-1*-Mutanten von *C. elegans* mit einem Defekt in der CoQ-Biosynthese wird DMQ9 als Zwischenprodukt angehäuft. CLK-1-Mutanten zeigen neben verringerter Pharynxpumprate Abnormalitäten in der Bewegung, Zellzyklus und geringere Reproduktion. Auch eine verlängerte Lebensspanne im Vergleich zu N2-Würmern kann beobachtet werden [Rodriguez-Aguilera et al. 2004].

CLK-1-Nematoden, bei denen nur bis zum Erreichen des adulten Stadiums CoQ9 von außen durch Bakterien zugeführt wird, und die danach kein CoQ mehr erhalten, erreichen eine höhere Lebensdauer als *clk-1* -Mutanten, die zusätzlich durch *E. coli* zugeführte CoQ verschiedener Kettenlänge enthalten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass durch das angehäuften DMQ9 ein positiver Effekt auf die Lebensspanne des *clk-1* Typs von *C. elegans* erreicht werden kann [Larsen & Clarke 2002].

Jedoch kann bei CoQ10-Zugabe an *clk-1*-Würmern eine noch höhere Lebensspanne erreicht werden als bei Nematoden, die unter der DMQ9-„Diät“ aufgewachsen sind [Ishii et al. 2004].

Somit könnte der positive Effekt von DMQ9 dadurch zustande kommen, dass CoQ-Moleküle mit kürzeren Kettenlängen normalerweise negativ auf die Lebensspanne wirken und durch deren Abwesenheit ein positiver Effekt fälschlicherweise auf DMQ9 zurückführbar ist [Yang et al. 2009].

## Coenzym Q10

Die vom Mensch synthetisierbare Form CoQ10 zeigt auch bei Supplementation zu *C. elegans* eine positive Wirkung auf deren mittlere Lebensspanne. Bei einer Zugabe von 150 µg/ml zum für oxidativen Stress empfindlichen Typ *mev-1* kann eine Erhöhung der mittleren Lebensspanne um 18 % erreicht werden.

Auch im Vergleich mit Isomeren anderer Kettenlängen wird durch die Zugabe des Coenzym Q10 zu *C. elegans* ein signifikant positiver Effekt auf die mittlere Lebensspanne erreicht [Yang et al. 2009].

### **Reduktion und Vorbeugung von oxidativem Stress in den Mitochondrien**

Die erkannte Lifespan-Erhöhung ging mit einer Wirkung gegen die zusätzlich produzierten ROS durch den Defekt der *mev-1*-Nematoden einher. Zusätzlich wurde durch NADH-Zugabe als Substrat zu Komplex I und Succinat zu Komplex II der Atmungskette die Reduktion von Superoxid-Anion gemessen. Dabei wurde besonders der durch Succinat bedingten Superoxid-Anion-Produktion im Komplex II der Atmungskette von *mev-1*-Mutanten durch CoQ10-Zugaben entgegengesteuert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Ergebnisse zeigen, dass CoQ10 nicht nur ein reiner Radikalfänger ist, sondern in einer noch ungeklärten Form der Produktion von Superoxid-Anion entgegenwirkt, die genauen molekularen Signalwege von CoQ10 bei *C. elegans* noch ungeklärt sind und in zukünftigen Studien weiter erforscht werden sollten [Ishii et al., 2004].



## **Kohlenhydrate**

### **Glucose**

*C. elegans* ist ein guter Modellorganismus, um die negativen Folgen von zu hohen Glucose-Konzentrationen zu erforschen [Schlotterer et al. 2009].

Bei Anreicherung einer externen Konzentration von 40 mmol/l Glucose auf Agarplatten zur Aufzucht von *C. elegans* konnte in den Nematoden eine interne Konzentration von 14 mmol/l gemessen werden. In derselben Höhe werden Konzentrationen in schlecht kontrollierten Diabetespatienten gemessen.

Bei Zugabe dieser Konzentration wurde ein signifikant verminderter maximaler und mittlerer Lifespan im Vergleich zu einer Gruppe von Nematoden, denen Sorbitol hinzugefügt wurde, gemessen.

Um ausschließen zu können, dass der Metabolismus der Bakterien für dieses Ergebnis verantwortlich ist, wurden ebenfalls Tests mit *C. elegans*, die als Nahrungsquelle mit UV-Licht getötete Bakterien erhielten, durchgeführt. Dabei wurde eine ähnliche Minderung der Lebensdauer der Nematoden festgestellt.

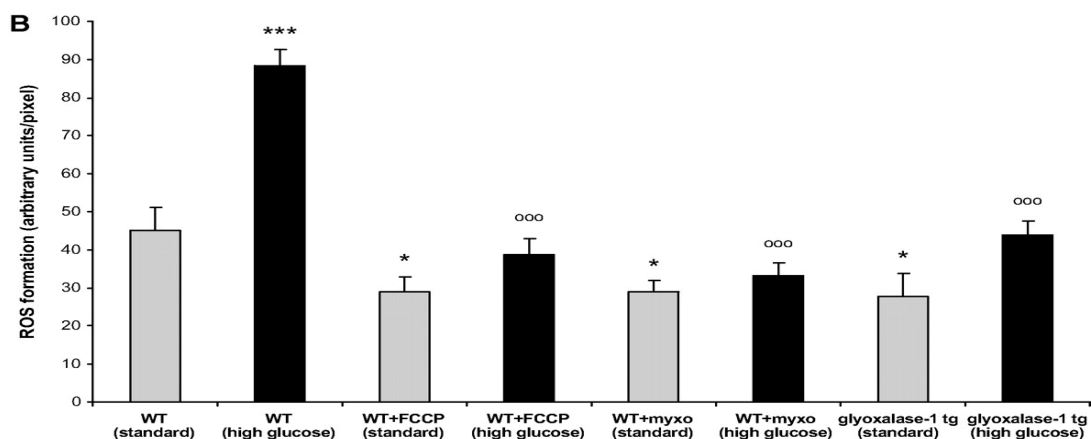
### **Molekulare Wirkungsweise von hohen Glucose-Konzentrationen**

Erhöhte Glucose-Konzentrationen bei *C. elegans* führen zu vermehrter ROS-Generation. Dabei nimmt die Aktivität des Enzyms Glyoxylase-1 ab und es kann sich Methylglyoxal anhäufen. Methylglyoxal kann Proteine in den Mitochondrien so modifizieren, dass diese wiederum mehr ROS erzeugen. Der dadurch erzeugte oxidative Stress hat negative Einflüsse auf den Lifespan der Nematoden [Schlotterer et al. 2009].

Der genaue molekulare Signalweg ist noch ungeklärt, jedoch zeigen zusätzlich negative Wirkungen von hohen Glucosekonzentrationen an *age-1*- und *daf-2*-Mutanten von *C. elegans*, dass dieser negative Effekt nicht durch Beteiligung des IIS erklärt werden kann.

Auch an *eat-2*-Mutanten war der zusätzlich negative Effekt signifikant. Dadurch können Signalwege der Energierestriktion ebenfalls ausgeschlossen werden.

In Zukunft sollten noch weitere Studien durchgeführt werden, um die Ergebnisse der Glucosetoxizität im Modelorganismus *C. elegans* auf Diabetespatienten übertragen zu können [Schlotterer et al. 2009].



**15 ROS Anhäufung bei hohem Glucoselevel [Schlotterer et al. 2009].**

## Trehalose

Trehalose ist ein Disaccharid aus zwei Glucose-Molekülen und kommt in verschiedenen Pflanzen und Pilzen vor.

Eine Erhöhung der mittleren Lebensspanne um 35 % bei einer optimal erkannten Konzentration von 5 mmol Trehalose wurde bei dessen Zugabe zu *C. elegans* des Wildtyps gemessen.

Dabei wurde die Wirkung ab dem jung adulten Stadium bis zum Tod der Nematoden gemessen [Honda et al. 2010].

Eine weitere Steigerung der Lebensspanne wurde bei Zugabe 10 Tage nach Erreichen der adulten Phase erkannt.

Hingegen bei Zugabe von Trehalose ab Tag 0 bis Tag 10 der adulten Phase wurde keine signifikante Steigerung der Lebensspanne festgestellt.

Bei Belastung durch thermalen Stress bei 35 °C über sieben Stunden wurde bei Nematoden, denen zuvor Trehalose zugegeben wurde, Polyglutamin als Marker für falsch gefaltete Proteine und zellbedingte Schäden vermindert gemessen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Trehalose Alterungsprozesse bei *C. elegans* nicht nur reparieren, sondern hauptsächlich hinauszögern kann. Als Vergleichsgruppe zu diesen Untersuchungen wurden jeweils N2-Nematoden ohne Trehalose-Zugabe verwendet [Honda et al. 2010].

### **Molekularer Wirkungsmechanismus der Lebensverlängerung durch Trehalose**

Eine hinausgezögerte Abnahme der pharyngealen Pumprate, sowie eine verringerte Lipofuscinanhäufung liefern weitere Indizien dazu, dass der Alterungsprozess durch Trehalose hinausgezögert werden kann.

Indirekte Energiereduktion kann als Wirkungsweise ausgeschlossen werden, weil Merkmale, wie verringerte pharyngeale Pumprate und verringerte Reproduktion, fehlen.

Keine Veränderung der Lebensspanne durch Trehalose nach Zugabe an *daf-2*-Mutanten, jedoch eine zusätzliche Wirkung an *daf-16*-Mutanten deuten auf eine Wirkung über reduzierte IIS-Signale unabhängig von DAF-16 hin.

Bei *daf-2*-Mutanten, bei denen zusätzlich durch RNAi *tps-1* und *tps-2* (Gene, die für die Biosynthese von Trehalose verantwortlich sind) inaktiviert wurden, ging die lebensverlängernde Wirkung über den reduzierten IIS-Pfad fast zur Gänze

verloren. Wenn nach deren Inaktivierung Trehalose zugefügt wurde, wurde diesem negativen Effekt stark entgegengewirkt.

Dieser Effekt zeigt, dass Trehalose bei der Wirkung über den reduzierten IIS-Pfad von Bedeutung ist [Honda et al. 2010].

Zusammenfassend kann man sagen, dass der lebensverlängernde Effekt durch Trehalose hauptsächlich über die Veränderung von Signalpfaden und der Prävention von altersbedingten Schäden stattfindet und weniger durch die Reparatur bereits vorhandener Schäden.

## **Schwefelhaltige Nahrungsbestandteile**

### **Taurin**

Bisher sind Funktionen von Taurin, wie z. B. Unterstützung der Zelle bei deren Regeneration, sowie Schutz gegen physiologischen Stress durch Erhaltung der osmotischen Balance, hauptsächlich bei in-vitro-Experimenten nachgewiesen worden.

*C. elegans* bietet eine Möglichkeit, die Wirkung von Taurin in vivo zu testen.

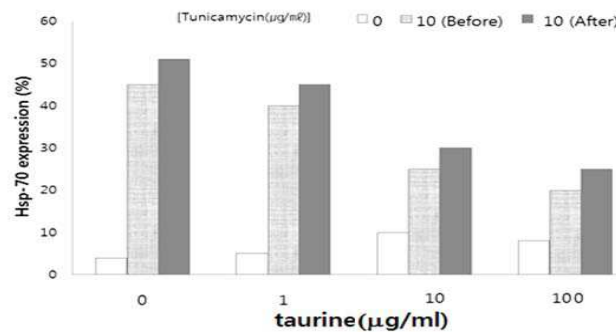
Dabei wurde erkannt, dass Taurin positiv auf Indikatoren von ER-Stress wirkt [Kim et al. 2009].

ER-Stress entsteht vermehrt im Alter durch den Abbau von falsch gefalteten Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum [Malhotra et al. 2007].

### **Mechanismen der Funktion von Taurin auf *C. elegans* gegen ER-Stress**

Die molekulare Wirkungsweise von ER-Stress in vivo wird bisher nur sehr schlecht verstanden. Bisher sind nur einige Indikatoren von ER-Stress bekannt, auf die Taurin positiv wirkt.

Eines davon ist das HSP-70, welches bei einer Zugabe durch Tunicamycin (erzeugt ER-Stress) ansteigt und in einer Dosis-Wirkungs-Beziehung durch Zugabe von Taurin wieder gesenkt werden kann.



### 16 Wirkung von Taurinzugabe auf durch Tunicamycin erhöhte Werte von HSP-70 [Kim et al. 2009].

Als möglichen Indikator für die Wirkung von Taurin bei *C. elegans* gegen ER-Stress wurde bei zugegebenen Konzentrationen von 10 und 100 µg von Taurin eine signifikante Erhöhung von SKN-1 im Nucleus der Zellen des Intestinaltrakts festgestellt, obwohl bei Nematoden, die vor der Zugabe von Tunicamycin mit Taurin aufgezogen wurden, signifikant höhere Werte von SKN-1 gemessen wurden, als bei *C. elegans*, denen vor Taurin-Zugabe Tunicamycin verabreicht wurde.

Die erhöhten SKN-1-Werte kommen vermutlich durch eine verstärkte Abwehrreaktion auf Tunicamycin nach Taurin-Zugabe zustande und gehen mit einer vermehrten Expression von Genen des Detoxifizierungssystems einher.

Möglicherweise gibt es aber auch einen noch unbekanntem molekularen Weg, der zusätzlich gegen den durch Tunicamycin produzierten oxidativen Stress wirkt [Kim et al. 2009].

Der mittlere Lifespan von *C. elegans* sinkt im Vergleich zu einer normal kultivierten Kontrollgruppe nach Tunicamycin-Zugabe um 50 %. Bei

gleichzeitiger Taurin-Zugabe von 10 oder 100 µg bleibt diese negative Veränderung aus.

Um den negativen Folgen durch Tunicamycin auf die Reproduktionsrate am besten entgegenwirken zu können, wurde eine präventative Zugabe von 100 µg Taurin als optimal ermittelt.

Gesenkte Motilität der Nematoden kann durch Taurin-Zugabe wiederhergestellt werden. Diese Beobachtung könnte mit einem Entgegenwirken der Folgen von ER-Stress auf die Muskelaktivität zusammenhängen.

Gesamt kann man sagen, dass diese Ergebnisse zeigen, dass Taurin auch in vivo die Symptome von ER-Stress lindert. Jedoch müssen zur kaum bekannten molekularen Wirkungsweise von Taurin in vivo noch weitere Studien durchgeführt werden [Kim et al. 2009].

### **Diallyltrisulfide (DATS)**

DATS kommen in größeren Mengen in Knoblauch vor und sind ein chemischer Bestandteil von Allicin, welches sehr instabil ist und neben DATS auch Diallylsulfide und Diallyldisulfide enthält. Diese Komponenten machen den Geruch und Geschmack von Gemüse der Allium-Gattung aus, wie z. B. Knoblauch und Zwiebel.

Ihnen werden verschiedene gesundheitsfördernde Eigenschaften nachgesagt, wie z. B. eine Wirkung gegen Krebs und Herzleiden, sowie gegen altersassoziierte Krankheiten wie Diabetes und verschiedene neurologische Leiden [Powolny et al. 2011].

### **Erhöhung des mittleren Lifespans von *C. elegans***

Bei einer Dosis von 5 und 10  $\mu\text{M}$  DATS konnte eine signifikante Steigerung der mittleren Lebensspanne von *C. elegans* des transgenen Stranges TJ1060 um 11,7 und 12,6 % im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit DMSO-Zugabe beobachtet werden. Bei einer Dosis von 20  $\mu\text{g}$  ging diese Wirkung verloren bzw. Dosen ab 100  $\mu\text{g}$  wirken bereits toxisch auf *C. elegans*. Die interne Absorptionsmenge von DATS in *C. elegans* ist hingegen unbekannt [Powolny et al. 2011].

### **Wirkungsmechanismen von DATS**

Die positive Wirkung von DATS durch dessen antimikrobielle Eigenschaften kann ausgeschlossen werden, da an durch Hitze getöteten Bakterien ein signifikant lebensverlängernder Effekt im selben Ausmaß beobachtet werden kann.

Die entstandene Annahme, dass Energierestriktion für die Lebensverlängerung durch DATS verantwortlich ist, bedingt durch eine fehlende Wirkung von DATS auf *eat-2*-Mutanten, kann dadurch widerlegt werden, dass die pharyngeale Pumprate nach DATS-Zugabe unverändert bleibt.

Tests an *daf-16*- und *daf-2*-Mutanten zeigten eine zusätzliche Lebensverlängerung und können damit in Bezug auf die Lebensverlängerung durch DATS ausgeschlossen werden.

Eine Microarrayanalyse des Genoms nach DATS-Zugabe ergab, dass die Gene *skn-1* und *gst-4* vermehrt exprimiert wurden. Es ist bekannt, dass SKN-1 für die Expression von GST-4 verantwortlich ist.

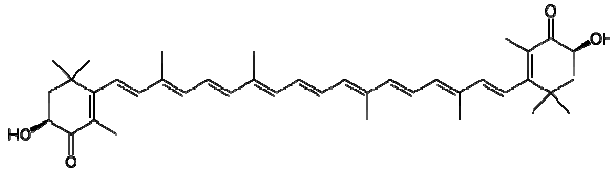
Bestätigt wird diese Erkenntnis dadurch, dass bei *skn-1*-Mutanten gebunden an ein Green Fluorescent Protein keine erhöhten GST-4-Werte verzeichnet werden konnten und die lebensverlängernde Wirkung ausblieb [Powolny et al. 2011].

Außerdem wurde erkannt, dass für die lebensverlängernde Wirkung über SKN-1 dessen Akkumulation im Nukleus der Zellen des Intestinaltrakts, sowie in den

ASI-Neuronen von *C. elegans*, benötigt wird. Wenn in einem dieser Bereiche keine Akkumulation erfolgt, fällt auch die lebensverlängernde Wirkung aus.

In Zukunft sollten Studien mit weiteren Organosulfiden an höheren Organismen durchgeführt werden, um deren mögliche positive Eigenschaften genauer erforschen zu können [Powolny et al. 2011].

## Karotinoide



### Astaxanthin

Astaxanthin ist ein Karotinoid, das hauptsächlich von marinen Tieren produziert wird. Es hat starke Radikalfängereigenschaften, die mit dem Quenchen von Singulett-Sauerstoff und dem Auffangen von durch Lipidperoxidation produzierten Radikalen in Verbindung gebracht werden [Yazaki et al. 2011].

### Erhöhung des mittleren und maximalen Lifespans bei *C. elegans*

Bei Zugabe einer Konzentration von 1mM zu N2-Nematoden konnte eine Erhöhung der mittleren Lebensspanne von 16-30 % im Vergleich zu einer Astaxanthin-freien Kontrollgruppe erkannt werden. Außerdem konnte auch der maximale Lifespan nach Astaxanthin-Zugabe dosisabhängig signifikant gesteigert werden.



## **Molekulare Wirkungsweise von Astaxanthin**

Bei einer RT-PCR-Messung nach Astaxanthin-Zugabe konnten erhöhte mRNA-Werte verschiedener Gene die Superoxid- und Katalase regulieren festgestellt werden.

Außerdem wurde eine vermehrte Akkumulation von DAF-16, gebunden an ein GFP in den Intestinalzellen von *C. elegans*, beobachtet, dessen Transkriptionsziele unter anderem Katalase- und SOD-Mimetika sind. Unterstützt wird die vermutete Beteiligung von DAF-16 an der lebensverlängernden Wirkung von Astaxanthin durch eine fehlende Steigerung der mittleren Lebensspanne bei Zugabe von Astaxanthin an *daf-16*-Mutanten.

Eine direkte Wirkung von Astaxanthin kann bei der Verminderung von freien Radikalen in den Mitochondrien beobachtet werden.

Eine Wirkung von Astaxanthin gebunden an Phospholipidmembranen über das Quenchen von einfachem Sauerstoff und dem Abfangen von freien Radikalen, die durch Lipidperoxidation entstanden sind, wird dabei vermutet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die positiven Eigenschaften von Astaxanthin nicht nur auf dessen direkte Radikalfängereigenschaften zurückzuführen sind, sondern auch eine indirekte Regulation über den IIS und DAF-16 eine Rolle spielt [Yazaki et al. 2011].

## **Metalle**

### **Lithium**

Lithium ist ein Spurenelement und wird hauptsächlich über Trinkwasser und pflanzliche Nahrungsmitteln vom Menschen aufgenommen.

Die genaue Wirkungsweise von Lithium im Körper ist noch unerforscht, jedoch zeigen sich bei hohen Dosen von Lithium neuroprotektive Eigenschaften [McColl et al. 2008].

Bei *C. elegans* kann die Lebensspanne durch Lithiumchlorid-Zugabe erhöht werden. Dabei wurde als optimale Dosis die Zugabe von 10 mM erkannt, die mit dem Anstieg einer mittleren Lebensspanne um 46 % einherging. Dabei wurde auch in den Würmern ein deutlicher Anstieg der Lithiumkonzentration in den Zellen gefunden. Diese Werte wurden mit einer Kontrollgruppe von N2-Nematoden verglichen [McColl et al. 2008].

Dazu muss man sagen, dass die Dosis von 10 mM die Werte in Nahrungsmitteln deutlich übersteigt. Jedoch konnte auch bei Konzentrationen von 10  $\mu$ m eine erhöhte mittlere Lebensspanne festgestellt werden [Zarse et al. 2011].

Negative Effekte auf die Lebensspanne konnten ab einer Dosis von 100 mM beobachtet werden, sowie ein deutlicher Rückgang der Fertilitätsrate bei einer Konzentration von 10 mM [Zarse et al. 2011].

### **Wirkungsweise der Li-induzierten Lebensverlängerung**

Energierestriktion kann durch die zusätzliche Wirkung bei Lithium-Zugabe an *clk-1*- und *eat-2*-Mutanten ausgeschlossen werden.

Auch die Beteiligung von Komponenten des IIS-Pfades, wie *daf-2*, *daf-16* und *sir-2.1*, an der lebensverlängernde Wirkung von  $\text{Li}^+$ , kann wegen einer zusätzlichen Wirkung als maßgebliche Ursache ausgeschlossen werden.

GSK-3 $\beta$ -Mutanten zeigen keine zusätzliche Lebensverlängerung durch  $\text{Li}^+$ -Zugabe. Dieses Ergebnis ist verwunderlich, da normalerweise  $\text{Li}^+$  ein Inhibitor von GSK-3 ist und durch die gewonnene Erkenntnis GSK-3 für seine lebensverlängernde Wirkung bei *C. elegans* benötigt wird.

Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass eine komplette Entfernung von GSK-3β negative Folgen, jedoch eine teilweise Inhibition durch bestimmte Stoffe wiederum einen positiven Effekt hat.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass GSK-3β in verschiedenen Geweben verschiedene Eigenschaften besitzt und somit dessen Blockierung nur in bestimmten Geweben positiv auf die Lebensspanne wirkt.

Ein Beispiel dafür wäre, dass GSK-3 in den Intestinalzellen normalerweise SKN-1 hemmt, jedoch bei einer Inhibition von GSK-3 durch  $\text{Li}^+$  kann SKN-1 vermehrt in den Zellen des Intestinaltrakts akkumulieren und lebensverlängernde Pfade stimulieren.

In Neuronen wiederum wurde GSK-3 als lebensverlängernder Faktor identifiziert [McColl et al. 2008].

Eine andere wichtige lebensveränderte Eigenschaft von  $\text{Li}^+$  bei *C. elegans* ist die Erhaltung der Chromatinstruktur bei der Replikation.

Bei einer Microarray-Analyse wurden erniedrigte Werte des Gens-T08D 10.2 einem Ortholog des LSD-1-Proteins beim Menschen gefunden. Dieses Protein modelliert normalerweise Chromatin bei *C. elegans* und diese Eigenschaft wird mit Altern in Verbindung gebracht.

Im Gesamten kann man sagen, dass *C. elegans* ein brauchbares Modell ist, um die Effekte von  $\text{Li}^+$  zu identifizieren. Weitere Studien zu den molekularen Signalwegen durch die  $\text{Li}^+$ -induzierte Histonmethylierung und Veränderung der Chromatinstruktur sollten in Zukunft noch durchgeführt werden [McColl et al. 2008].

## **Mangan**

Mangan ist ein essentielles Spurenelement mit bedeutenden Funktionen im menschlichen Körper, wie z. B. bedeutende Radikalfängereigenschaften und

Funktionen im Gehirn. Im Gegensatz zu anderen Spurenelementen sind die Funktionen von Mangan in-vivo noch kaum bekannt. Am häufigsten kommt es in biologischen Systemen im +2-Oxidationsstatus vor [Lin et al. 2006].

### **Wirkungsweise von Mangan bei *C. elegans***

*C. elegans* ist ein guter Modellorganismus, um die Radikalfängereigenschaften von Mangan in-vivo zu erforschen.

Bei Mangan-Zugabe zu *C. elegans* ist zu beachten, dass der Wert, der internen weit unter dem der externen Konzentration liegt, jedoch in einer von der Dosis abhängigen Beziehung ansteigt.

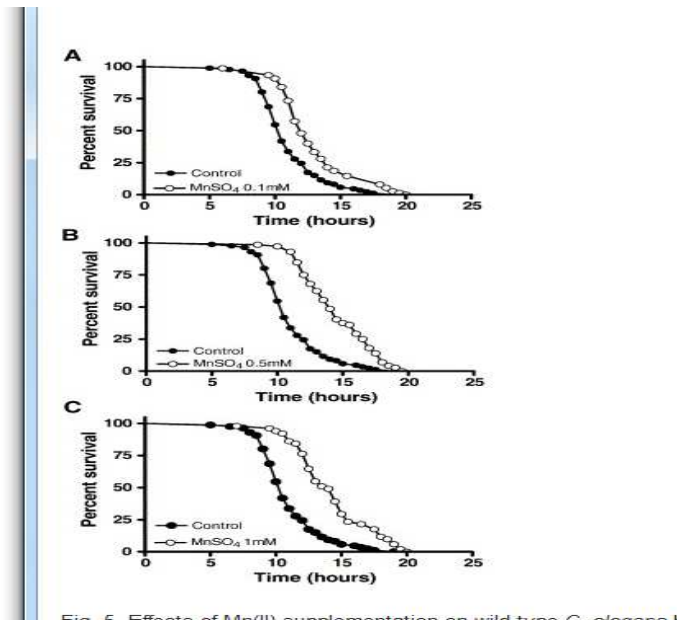
Beispielsweise beträgt bei einer Zugabe von 0,5 mM Mangan auf NGM-Platten zur Aufzucht von *C. elegans* die interne Konzentration von Mangan ca. 70 pM, hingegen bei einer Zugabe von 0,1 mM nur mehr ca. 20 pM.

Bis zu einer zugegebenen Menge von 2 mM konnte keine toxische Wirkung bei *C. elegans* beobachtet werden. Im Gegenteil, es konnte sogar ein beschleunigtes Wachstum beobachtet werden. Konzentrationen darüber sind mit den derzeitigen Mitteln nur schwer zu erreichen [Lin et al. 2006].

Bei Zugabe einer Konzentration von 0,5 mM zu N2-Nematoden und 1mM zu *mev-1*-Mutanten konnte außerdem ein signifikant erhöhter Brood-size beobachtet werden.

Aufgrund dieser Erkenntnisse kann Energierestriktion bei Mn-Zugabe als dessen positive Wirkung ausgeschlossen werden.

Ab einer Zugabe von über 0,1 mM Mangan war der mittlere Lifespan bei *mev-1*-Nematoden signifikant erhöht. Bei N2-Würmern blieb dieser Effekt aus. Daraus kann man schließen, dass diese Lifespanerhöhung über die Radikalfängereigenschaften von Mangan zustande kommt.



### 17 Auswirkungen verschiedener Mangankonzentration auf die Lebensspanne von mev-1-Mutanten [Lin et al. 2006].

Im Test an N2-Nematoden gegen thermalen Stress bei 35 °C konnte nach Manganzugabe eine längere Überlebensdauer festgestellt werden, was wieder auf eine direkt positive Eigenschaft von Mangan gegenüber den durch thermalen Stress produzierten Radikalen zurückzuführen ist.

Diese Erkenntnisse deuten auf eine positive Wirkung von Mangan in-vivo hin. In Zukunft sollten jedoch weitere Studien zu der genauen molekularen Wirkungsweise von Mangan bei *C. elegans* durchgeführt werden. Dabei sollte im Detail erforscht werden, ob Mangan direkt als Radikalfänger wirkt oder antioxidative Schutzmechanismen über verschiedenste molekulare Signalwege aktiviert [Lin et al. 2006].

## Amide

### Acrylamid

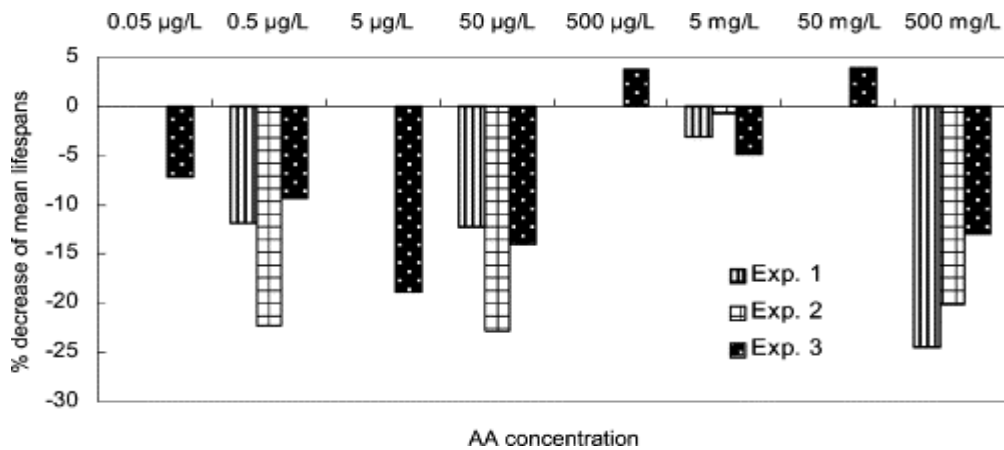
Acrylamid ist ein Produkt der Maillard-Reaktion, die während des Frittierens und Backens kohlenhydratreicher Nahrungsmittel abläuft, und wird mit verschiedensten negativen Folgen auf den menschlichen Körper in Verbindung gebracht. Gemessene Konzentrationen in Nahrungsmitteln liegen zwischen 30 und 2300 µg/kg.

Bei *C. elegans* wurden schon bei Konzentrationen von 0,5 µg/L negative Folgen entdeckt [Hasegawa et al. 2004].

### Negative Folgen von Acrylamid bei *C. elegans*

Konzentrationen von 0,5 µg/L bis 5 mg/L hatten keine Auswirkungen auf Broodsize und Körperlänge von *C. elegans*. Jedoch bei Konzentrationen von 500 mg/L waren Broodsize und Körperlänge drastisch reduziert. Der Broodsize der nachfolgenden Generation von *C. elegans* war auch ohne Acrylamid-Zugabe noch drastisch reduziert, was bedeutet, dass auch nachfolgende Generationen von den Auswirkungen betroffen sind [Hasegawa et al. 2004].

Bei der Lebensspanne waren 2-phasische Auswirkungen zu erkennen. Bei Konzentrationen von 0,5 µg/L bis 50 µg/L waren negative auf die mittlere Lebensspanne signifikant zu erkennen, hingegen bei moderaten Konzentrationen von 500 µg/L bis 5 mg/L fielen diese negativen Auswirkungen wieder weg. Jedoch bei 500 mg/L konnten wiederum signifikant negative Auswirkungen auf den mittleren Lifespan von *C. elegans* beobachtet werden [Hasegawa et al. 2004].



### 18 Negative Folgen von Acrylamidkonzentrationen auf die mittlere Lebensspanne [Hasegawa et al. 2004].

### Molekulare Mechanismen, die für die negative Wirkung von Acrylamid auf *C. elegans* verantwortlich sind

Eine Erklärung für die negativen Wirkungen auf die mittlere Lebensspanne bei niedrigen und hohen Konzentrationen, jedoch nicht bei mittleren Dosen von Acrylamid, könnte sein, dass bei mittleren Konzentrationen bereits mehrere Gene zur Stressabwehr hinaufreguliert werden und diese den negativen Eigenschaften von Acrylamid entgegenwirken können. Bei hohen Konzentrationen, wie z. B. bei 500 mg/L überwiegen wiederum die negativen Eigenschaften von Acrylamid und die Lebensspannen der Würmer sinken wieder [Hasegawa et al. 2008].

Bei einer Microarray-Analyse des Genoms von *C. elegans* nach Acrylamid-Zugabe wurde erkannt, dass die Detoxifikationsenzyme Glutathion-S-Transferasen (GST) und Uridin-Diphosphat-Glucuronosyl/glucosyltransferasen (UGT) am häufigsten hinaufreguliert wurden.

Es ist bekannt, dass diese Enzyme bei verschiedenen Formen von Stress verstärkt exprimiert werden.

Im Detail wurde *gst-4* als das am häufigsten hinaufregulierte Gen bei Acrylamid-Zugabe erkannt. Bei einem Knockdown von *skn-1* wurde GST-4 gebunden an ein GFP nur mehr im Pharynx und an den Körperwänden vermehrt beobachtet. Bei Vorhandensein von SKN-1 wurde es im ganzen Körper von *C. elegans* vermehrt exprimiert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei Acrylamid-Zugabe in höheren Konzentrationen und über eine vermehrte Akkumulation von SKN-1 durch Stress verstärkt Enzyme des Detoxifikationssystems exprimiert werden, was als ein Anzeichen für die negative Wirkung von Acrylamid bei *C. elegans* gilt [Hasegawa et al. 2008].



## 5. Schlussbetrachtung

Abschließend kann man sagen, dass Nahrungsinhaltsstoffe auf vielfältige Art und Weise bei *C. elegans* wirken können. Dabei erfolgt die Wirkung nicht nur indirekt über Energierestriktion, sondern auch über molekulare Signalpfade, die stimuliert werden und dann z.B. über gesteigerte Immunantwort oder über erhöhtes antioxidatives Potential lebensverändert wirken können.

Ein weiterer Ansatz der Wirkungsweise verschiedener Nahrungsinhaltsstoffe auf *C. elegans* wurde durch einen hormetischen Effekt erkannt. In diesem Fall bewirkt eine geringe Dosis einer sonst toxischen Substanz einen positiven Effekt auf Parameter, wie z.B. die Lebensspanne.

Die Interpretation der Ergebnisse aus einzelnen Studien gestaltet sich durch einige Unsicherheitsfaktoren oft sehr schwierig. Diese sind z.B. die mögliche Beeinflussung des Nematoden *C. elegans* durch Bakterien und Antibiotika, sowie die unterschiedlichen Aufzugsmethoden in den verschiedenen Studien.

Zusätzlich sind gewisse molekulare Pfade, deren Komponenten durch Zugabe von bestimmten Stoffen aus der Nahrung stimuliert werden, noch unerforscht. Dadurch treten oft Unklarheiten in der Interpretation von Ergebnissen einiger Einflußgrößen, wie z.B. einer erhöhten Lebensspanne, auf.

In Bezug auf die Bedeutung der Ergebnisse für den Menschen müssen die oft doch sehr hoch gewählten Konzentrationen der zugefügten Stoffe kritisch betrachtet werden.

Zusammenfassend kann man folglich sagen, dass *C. elegans* als ein geeigneter Organismus für die Erforschung verschiedener molekularer Signalwege, die durch Nahrungsinhaltsstoffe beeinflusst werden, genutzt werden kann und in Zukunft ein breites Forschungsfeld bietet.

## Appendix

### Zusammenfassung

Die Analyse und die Identifikation von Nahrungsinhaltsstoffen, die das Altern hinauszögern und die Lebensspannen erhöhen, ist ein wichtiges Thema in der Altersforschung.

Ein bedeutender Modelorganismus namens *C. elegans* ist eine kleine frei im Boden lebende Nematode. Dessen kostengünstige und einfache Kultivierung von synchronisierten Kulturen auf festem sowie flüssigem Nährmedium macht ihn zu einem geeigneten Organismus zur Erforschung der Effekte einzelner Nahrungsinhaltsstoffe. Dieses Review setzt sich kritisch mit Studien, bei denen die Wirkung von Nahrungsinhaltsstoffen auf *C. elegans* getestet wird, auseinander.

Es gibt viele verschiedene molekulare Effekte durch die Zugabe von Nahrungsinhaltsstoffen zu den Nematoden, wovon die wichtigsten in dieser Arbeit, geordnet nach deren chemischer Zugehörigkeit, zusammengefasst sind. Die Beschreibung der bedeutendsten molekularen Pfade, welche in die Wirkungsweise dieser Nahrungsinhaltsstoffe auf *C. elegans* involviert sind, stellt einen weiteren großen Teilbereich dieser Arbeit dar.

Zusätzlich wurden über die Zeit verschiedene Theorien des Alterns aufgestellt. Diese Theorien können dabei behilflich sein die lebensverändernden Effekte der Nahrungsinhaltsstoffe auf *C. elegans* zu klassifizieren und daraus bestimmte Kategorien zu bilden.

Außerdem sind für das Experimentieren mit *C. elegans* einige wichtige Kriterien zu beachten. Diese Arbeit fasst unter anderem die wichtigsten Faktoren, die berücksichtigt werden müssen, zusammen.

## **Abstract**

The analysis and identification of components in the nutrition which delay aging and increase the lifespan is an important subject in the gerontology research.

An important model organism is the small in soil living nematode *C. elegans*. A easy and cheap cultivation of synchronised cultures on plates or liquid medium is ideal to research the multiple effects of nutritional components. This review is a critical view to studies in which *C. elegans* has been used to test the effects of components in the nutrition.

There are pretty different molecular effects from nutritional ingredients to these nematodes. In this review the most important ones are summarized and classified by the chemical groups, to which the nutritional components belong.

Further there are different molecular pathways which are involved in the mode of action of these substances to *C. elegans*. These most important pathways are also described in this review.

Also there are some theories of aging which are helpful to classify and make categories of these effects.

For working with *C. elegans* there are some issues that have to be attentioned. This work summarizes the most important things that have to be considered.

## Lebenslauf

Matthias Foller

---

Otto Probst Straße 5/44/1  
 1100 Wien  
 ☎ (01) 616 49 07  
 mobil: 0650 98 108 70  
 mailto: mfolger@gmx.at



### Persönliche Angaben

Geburtstag	25. Februar 1985
Geburtsort	Wien/Österreich
Staatsbürgerschaft	Österreich
Religion	evangelisch-HB
Familienstand	ledig
Präsenzdienst	abgeleistet

### Schulische Ausbildung

1991-1995	Volksschule
1995-1999	Realgymnasium Wien 10 Ettenreichgasse
1999-2004	BHAK Wien 11 Geringergasse
2005-2012	Studium der Ernährungswissenschaften

### Absolvierte Praktika

2003	bei B&M Logistik im Innendienst
2008-2011	Durch Dick und Dünn: Gesundheitsprogramm für übergewichtige Kinder und Jugendliche in NÖ
Oktober 2010	Praktikum in der Abteilung für Nutrigenomics (Uni Wien)
September 2011	Manner AG im Qualitätsmanagement

### Besondere Kenntnisse:

Office, Microsoft Access, Grundkenntnisse im Programmieren, Englisch, Französisch, Erfahrung in Laboranalysen

## Literatur

Adachi H. et Ishii N.; Effects of Tocotrienols on Life Span and Protein Carbonylation in *Caenorhabditis elegans*; Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES 2000; 55A(6):280–285

Braeckman B.; Houthoofd K.; Vanfleteren J.; Energy metabolism, anti-oxidant defense and aging in *Caenorhabditis elegans*; Model Systems in Aging 2004; 3:99-144

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

Butov A, Johnson T., Cypser J., Sannikov I., Volkov M., Sehl M., Yashin A; Hormesis and debilitation effects in stress experiments using the nematode worm *Caenorhabditis elegans* the model of balance between cell damage and HSP levels 2001; Exp Gerontol 37:57-66

Collins J., Evason K., Kornfeld K. ; Pharmacology of delayed aging and extended lifespan of *Caenorhabditis elegans*; Experimental Gerontology 2006; Volume 41 Issue 10: 1032-1039

Gems D. et McElwee J.; Broadspectrum detoxification: the major longevity assurance process regulated by insulin/IGF-1 signaling?; Mechanism of Ageing and Development; 3:381-387

Gruber J., Tang S., Halliwell B.; Evidence for a Trade-Off between Survival and Fitness Caused by Resveratrol Treatment of *Caenorhabditis* Annals of the New York Academy of Sciences 2007; 1100; 1: 530–54

Gruber J., NG L., Poovathingal S., Halliwell B.; Deceptively simple but simply deceptive - *Caenorhabditis elegans* lifespan studies: Considerations for aging and antioxidant effects; *FEBS Letters* 2009; 583 (21): 3377-3387.

Harman D.; Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span.; *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1:10-21

Hasegawa K, Miwa S, Tsutsumiuchi K, Taniguchi H, Miwa J. Extremely low dose of acrylamide decreases lifespan in *Caenorhabditis elegans*.; *Toxicol Lett.* 2004; 152(2):183-9

Hasegawa K., Miwa S., Isomura K., Tsutsumiuchi K., Taniguchi H., Miwa J.; Acrylamide-responsive genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*; *Toxicol Science* 2008; 101(2):215-25

Hashimoto T., Horikawa M., Nomura T., Sakamoto K.; Nicotinamide adenine dinucleotide extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* mediated by sir-2.1 and daf-16; *Biogerontology* 2010; 11:31–43

Hobert O. et Loria P.; Uses of GFP in *Caenorhabditis elegans*; *Methods of Biochemical Analyses* 2006; 47: 203-226

Honda Y., Tanaka M., Honda S., Trehalose extends longevity in the nematode *Caenorhabditis elegans*; *Aging Cell* 2010; 9: 558–56

Ishii N, Senoo-Matsuda N, Miyake K, Yasuda K, Ishii T, Hartman PS, Furukawa S.; Coenzyme Q10 can prolong *C. elegans* lifespan by lowering oxidative stress.; *Mech Ageing Dev.* 2004 Jan;125(1):41-6

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

Jia K., Chen D., Riddle D.; The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span ; *Development* 2004;131: 3897-3906

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

Kampkötter A, Timpel C, Zurawski R, Ruhl S, Chovolou Y, Proksch P, Wätjen W. ;Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin; *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008 Feb; 149(2): 314-23.

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

Kim H., Do C., Lee D.; Taurine reduces ER stress in *C. elegans*; *J Biomed Science* 2010; 17/24:26

Larsen L., Clarke C., Extension of life-span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q; *Science* 2002; 295: 120–123

Liao V., Yu C., Chu Y., Li W., Hsieh Y., Wang T.; Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*; *Mechanisms of Ageing and Development* 2011; 132/10: 480–487

Lin Y., Hoang H., Hsieh S., Rangel N., Foster A., Sampayo J., Lithgow G., Srinivasan C.; Manganous ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a short-lived *Caenorhabditis elegans* mutant.; *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(7):1185-93

Maine E.; Studying gene function in *Caenorhabditis elegans* using RNA-mediated interference; *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 2008; 7 (3): 184-194

Malhotra J.D., Kaufman R.J.; The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response; *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2007, 18 (6): 716-731

McColl G., Killilea D., Hubbard A., Vantipalli M., Melvov S., Lithgow G.; Pharmacogenetic analysis of lithium-induced delayed aging in *Caenorhabditis elegans*; *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 350–357

Oliveira R., Abate J., Dilks K., Landis J., Ashraf J., Murphy C., Blackweel K.; Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf; *Aging Cell* 2009; 8: 524–541

Pietsch K., Saul N., Menzel R., Stephen R., Stürzenbaum C., Steinberg W.; Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by *age-1*, *daf-2*, *sek-1* and *unc-43*; *Biogerontology* 2010; 10:565–578

Pietsch K., Saul N., Chakrabarti S., Stephen R., Sturzenbaum C., Mensal R., Christian E., Steinberg W.; Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. *Biogerontology* 2011; 12: 329–347



Powolny A., Singh S., Melov S., Hubbard A., Fisher A., The garlic constituent diallyl trisulfide increases the lifespan of *C. elegans* via *skn-1* activation; *Exp Gerontol.* 2011; 46(6):441-52

Rodriguez-Aguilera J.; Gaviklan A., Asencio C., Navas P.; The role of ubiquinone in *Caenorhabditis elegans* longevity; *Ageing Res Rev* 2004; 4:41–53  
Sakaguchi A., Matsumoto K., Hisamoto N.; Roles of MAP Kinase Cascades in *Caenorhabditis elegans*; *J Biochem* 2004; 136 (1): 7-11

Saul N., Pietsch K., Menzel R., Steinberg C; The Longevity Effect of Tannic Acid in *Caenorhabditis elegans*: Disposable Soma Meets Hormesis; *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010; 65A(6): 626-635

Saul N., Pietsch K., Menzel R., Sturzenbaum S.R., Steinberg C; Catechin induced longevity in *C. elegans*: from key regulator genes to disposable soma; *Mech. Ageing Dev.* 2009; 130: 477–489

Schlotterer A., Kukudov G., Bozorgmehr F., Hutter H., Du X., Oikonomou D.; *C. elegans* as model for the study of high glucose- mediated life span reduction; *Diabetes* 2009; 58:2450–2456

Solomon A., Bandhakavi S., Jabbar S., Shah R., Beitel G., Morimoto R.; *Caenorhabditis elegans* OSR-1 Regulates Behavioral and Physiological Responses to Hyperosmotic Environments; *Genetics* 2004; 167: 161–170

Sunagawa T, Shimizu T, Kanda T, Tagashira M, Sami M, Shirasawa T.; Procyanidins from apples (*Malus pumila* Mill.) extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*; *Planta Med.* 2011;77(2): 122-7

Tullet J., Hertweck M., An JH., Baker J., Hwang J., Liu S., Oliveira R., Baumeister R., Blackwell T.; Direct Inhibition of the Longevity-Promoting Factor SKN-1 by Insulin-like Signaling in *C. elegans*; *Cell* 2008; 132:1025-1038.

Viswanathan M., Kim K., Berdichevsky A., Guarente L.; A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span; *Dev Cell*. 2005; Nov9(5):605-15

Vrablik T.; Huang L., Lange S., Hann-Rose W.; Nicotinamidase modulation of NAD<sup>+</sup> biosynthesis and nicotinamide levels separately affect reproductive development and cell survival in *C. elegans*; *Development*. 2009; 136(21): 3637–3646

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

Yang Y. ; Gangoiti J.; Sedensky M.; Morgan P.; The effect of different ubiquinones on lifespan in *Caenorhabditis elegans*; *Mechanisms of Ageing and Development* 2009; 130/6: 370–376

Yazaki K.,Yoshikoshi C; Oshiro S., Yanase S., Supplemental Cellular Protection by a Carotenoid Extends Lifespan via Ins/IGF-1 Signaling in *Caenorhabditis elegans*; *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2011; 596240:9

Zarse K., Terao T., Tian J., Iwata N., Ishii N., Ristow M.; Low-dose lithium uptake promotes longevity in humans and metazoans; *Eur. J .Nutr.* 2011; 50:387–389

Zhang L., Jie G., Zhang J., Zhao B.; Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress; *Free Radical Biology & Medicine* 2009; 46: 414–421

Zhou K., Pincus Z., Slack F.; Longevity and stress in *Caenorhabditis elegans*; *AGING* 2011; 3/8: 733-753