

**Aktivierung der Proteostase durch Quercetin als  
molekularer Mechanismus der Prävention Glukose-  
induzierter Schädigungen - Untersuchungen an der  
*mev-1* Mutante des Nematoden *Caenorhabditis elegans***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich  
Biologie und Chemie  
an der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dorothe Jenni Eisermann

Gießen, März 2016

PROFESSUR FÜR MOLEKULARE ERNÄHRUNGSFORSCHUNG



**Aktivierung der Proteostase durch Quercetin als  
molekularer Mechanismus der Prävention Glukose-  
induzierter Schädigungen - Untersuchungen an der  
*mev-1* Mutante des Nematoden *Caenorhabditis elegans***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich  
Biologie und Chemie

an der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
M. Sc. Dorothe Jenni Eisermann

März 2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Wenzel  
Professur für Molekulare Ernährungsforschung  
Interdisziplinäres Forschungszentrum  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Heinrich-Buff-Ring 26-32  
35392 Gießen
  
2. Gutachter Prof. Dr. Adriaan Dorresteijn  
Professur für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Stephanstr. 24  
35390 Gießen

*„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden,  
wo sie aufhört.“*

*Justus Freiherr von Liebig (1803 -1873)*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>vi</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>viii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>x</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Glukosetoxizität</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Hyperglykämie und oxidativer Stress.....	2
1.1.2 Glukose-induzierte Schädigungen .....	3
<b>1.2 Proteostase</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 Chaperon-vermittelte Proteinfaltung .....	7
1.2.2 <i>Unfolded Protein Response</i> .....	9
1.2.2.1 <i>Unfolded Protein Response</i> im Mitochondrium.....	9
1.2.2.2 <i>Unfolded Protein Response</i> im ER.....	11
1.2.3 Autophagie.....	15
1.2.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System .....	18
<b>1.3 Das Polyphenol Quercetin</b> .....	<b>21</b>
1.3.1 Polyphenole .....	21
1.3.2 Quercetin.....	22
<b>1.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus</b> .....	<b>24</b>
1.4.1 Anatomie und Physiologie.....	25
1.4.1.1 Männliche <i>C. elegans</i> Nematoden.....	27
1.4.2 Fertilisation .....	28
1.4.3 Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> .....	29

1.4.4	Modellorganismus für die Untersuchung Glukose-induzierter Schädigungen.....	31
1.4.5	Proteostase in <i>C. elegans</i> .....	32
1.4.5.1	Proteinfaltung und Chaperone in <i>C. elegans</i> .....	33
1.4.5.2	UPR <sup>mt</sup> in <i>C. elegans</i> .....	33
1.4.5.3	UPR <sup>ER</sup> in <i>C. elegans</i> .....	34
1.4.5.4	Autophagie in <i>C. elegans</i> .....	34
1.4.5.5	UPS in <i>C. elegans</i> .....	35
<b>2</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Kultivierung von <i>C. elegans</i> .....</b>	<b>39</b>
3.1.1	Herstellung von NGM-Agarplatten .....	39
3.1.2	Kultivierung von <i>E.coli</i> OP50 .....	40
3.1.3	<i>Egg-Preparation</i> zur Synchronisation von <i>C. elegans</i> .....	40
3.1.4	Aufzucht synchronisierter <i>C. elegans</i> Larven in NGM .....	41
3.1.5	RNAi in <i>C. elegans</i> .....	42
3.1.6	Inkubation von <i>C. elegans</i> mit Glukose in Ab- und Anwesenheit von Quercetin.....	44
<b>3.2</b>	<b>Bestimmung der Überlebenszeit unter Hitzestress .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3</b>	<b>Fluoreszenzmikroskopische Bestimmungen .....</b>	<b>47</b>
3.3.1	Quantifizierung von Lysosomen mit LysoTracker® Red .....	47
3.3.2	Expressionsanalyse mit GFP-Reportergenen .....	48
<b>3.4</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>49</b>
3.4.1	Protein-Extraktion.....	49
3.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	49
3.4.3	Messung der spezifischen Proteasomaktivität .....	50
3.4.4	Bestimmung poly-ubiquitiniertes Proteine .....	51

3.4.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	51
3.4.4.2	Western-Blot.....	53
3.4.4.3	Immunodetektion poly-ubiquitinerter Proteine .....	53
3.4.4.4	Chemilumineszenz-Detektion.....	53
3.4.4.5	Strippen.....	54
3.4.4.6	Immunodetektion von $\beta$ -Aktin .....	54
<b>3.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>55</b>
3.5.1	Kreuzung transgener <i>C. elegans</i> Stämme mit dem Stamm TK22 .....	55
3.5.1.1	Herstellung und Kultivierung männlicher <i>C. elegans</i> Nematoden.....	55
3.5.1.2	Kreuzung und Selektion .....	56
3.5.1.3	Lyse.....	57
3.5.1.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	57
3.5.1.5	Restriktions-Verdau .....	58
3.5.1.6	DNA-Gelelektrophorese .....	59
3.5.1.7	Hitzestress.....	60
3.5.2	Quantitative Echtzeit-PCR.....	61
3.5.2.1	RNA-Isolierung .....	62
3.5.2.2	qRT-PCR .....	63
<b>3.6</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>65</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>66</b>
4.1	Quercetin interagiert mit der UPR <sup>mt</sup> .....	67
4.2	UPR <sup>ER</sup> -Zielgene des Quercetins.....	71
4.3	Kompensationsmechanismen im Rahmen der UPR <sup>ER</sup> .....	74
4.4	Die Hemmung des autophagosomalen Abbaus schützt vor einer Glukosetoxizität.....	78

<b>4.5</b>	<b>Das Proteasom als zentrales Ziel der Hemmung durch Glukose und der Aktivierung durch Quercetin.....</b>	<b>81</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
<b>A</b>	<b>Appendix: Material .....</b>	<b>126</b>
<b>A.1</b>	<b>Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>126</b>
<b>A.2</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>127</b>
<b>A.3</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien.....</b>	<b>129</b>
<b>A.4</b>	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>132</b>
<b>A.5</b>	<b>Medien .....</b>	<b>140</b>
<b>A.6</b>	<b><i>C. elegans</i> Stämme.....</b>	<b>142</b>
<b>A.7</b>	<b>Bakterien Stämme .....</b>	<b>142</b>
<b>A.8</b>	<b>RNAi-Klone.....</b>	<b>143</b>
<b>A.9</b>	<b>Kits.....</b>	<b>144</b>



<b>A.10</b>	<b>Enzyme und Antikörper .....</b>	<b>144</b>
<b>A.11</b>	<b>Oligonukleotide .....</b>	<b>145</b>
<b>A.12</b>	<b>Software.....</b>	<b>146</b>
<b>B</b>	<b>Appendix: Publikationen .....</b>	<b>147</b>
<b>B.1</b>	<b>Publikation 1.....</b>	<b>147</b>
<b>B.2</b>	<b>Publikation 2.....</b>	<b>159</b>
<b>B.3</b>	<b>Publikation 3.....</b>	<b>167</b>
<b>B.4</b>	<b>Publikation 4.....</b>	<b>176</b>
<b>B.5</b>	<b>Publikation 5.....</b>	<b>183</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>203</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>205</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Klassische Signalwege der Glukosetoxizität.....	5
Abbildung 1.2:	Schematische Darstellung der zellulären Proteostase .....	7
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung der UPR <sup>mt</sup> Signalkaskade in Säugerzellen .....	11
Abbildung 1.4:	Schematische Darstellung der UPR <sup>ER</sup> Signalkaskaden in Säugerzellen .....	14
Abbildung 1.5:	Schematische Darstellung der Autophagie in Säugerzellen.....	17
Abbildung 1.6:	Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Signalwegs.....	20
Abbildung 1.7:	Chemische Strukturformel des Quercetins.....	22
Abbildung 1.8:	Anatomie eines <i>C. elegans</i> Hermaphroditen im Längsschnitt .....	25
Abbildung 1.9:	Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> bei 22 °C.....	30
Abbildung 3.1:	Prinzip der RNA-Interferenz .....	42
Abbildung 3.2:	Verlauf einer Fluoreszenzkurve des Fluoroskan-Assay.....	46
Abbildung 3.3:	DNA-Gelelektrophorese eines <i>gfp</i> -Amplifikats sowie von <i>mev-1</i> - <i>l</i> -Amplifikaten nach anschließendem Verdau durch <i>Kpn2I</i> .....	60
Abbildung 3.4:	Mikroskopische Aufnahmen von <i>C. elegans</i> TK22, SJ4005xTK22 und SJ4058xTK22.....	61
Abbildung 4.1:	Quercetin verhindert die Glukose-induzierte Minderung der Stressresistenz von TK22 .....	66
Abbildung 4.2:	Quercetin verlängert die Überlebenszeit von TK22 nicht mehr nach <i>atfs-1</i> RNAi.....	68
Abbildung 4.3:	Quercetin verlängert die Überlebenszeit von TK22 auch nicht mehr nach verdünnter <i>hsp-60</i> RNAi.....	69
Abbildung 4.4:	Quercetin beeinflusst nicht die <i>hsp-60</i> Promotoraktivität in TK22 in Anwesenheit von Glukose .....	70
Abbildung 4.5:	RNAi von <i>hsp-4</i> verhindert die Glukosetoxizität in TK22 .....	71
Abbildung 4.6:	Quercetin beeinflusst nicht die <i>hsp-4</i> Promotoraktivität in TK22 in Anwesenheit von Glukose.....	72
Abbildung 4.7:	Quercetin verlängert die Überlebenszeit von TK22 nicht mehr nach <i>ire-1</i> RNAi .....	73
Abbildung 4.8:	Die Aktivierung von Kompensationsmechanismen durch RNAi von <i>hsp-4</i> in TK22 ist unabhängig von <i>pek-1</i> .....	74
Abbildung 4.9:	RNAi von <i>pek-1</i> verhindert die Glukosetoxizität in TK22 .....	75
Abbildung 4.10:	Doppel-RNAi von <i>ire-1</i> und <i>xbp-1</i> verlängert die Überlebenszeit von TK22.....	75

Abbildung 4.11:	XBP-1 als Transkriptionsfaktor des <i>hsp-4</i> Promotors in TK22 .....	76
Abbildung 4.12:	Die Verlängerung der Überlebenszeit von TK22 durch <i>ire-1</i> und <i>xbp-1</i> Doppel-RNAi wird verhindert durch <i>pek-1</i> RNAi .....	77
Abbildung 4.13:	Eine verminderte IRE-1/XBP-1 Signaltransduktion beeinflusst nicht die <i>pek-1</i> Expression .....	77
Abbildung 4.14:	Quercetin beeinflusst nicht die Lysosomenbildung in TK22 in Anwesenheit von Glukose .....	78
Abbildung 4.15:	RNAi von <i>lgg-2</i> verhindert die Glukosetoxizität in TK22 .....	79
Abbildung 4.16:	RNAi von <i>imp-2</i> verhindert die Glukosetoxizität in TK22 .....	80
Abbildung 4.17:	Quercetin verlängert die Überlebenszeit von TK22 nicht mehr nach <i>pbs-4</i> RNAi .....	81
Abbildung 4.18:	Quercetin aktiviert das Proteasom in TK22 in Anwesenheit von Glukose .....	82
Abbildung 4.19:	Die Steigerung der Proteasomaktivität in TK22 durch Doppel-RNAi von <i>ire-1</i> und <i>xbp-1</i> wird verhindert durch <i>pek-1</i> RNAi .....	83
Abbildung 4.20:	Eine Inhibierung der Autophagie steigert die Proteasomaktivität in TK22 .....	84
Abbildung 4.21:	Poly-ubiquitinierte Proteine in TK22 unter <i>imp-2</i> RNAi .....	84

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Zusammensetzung des 8,5 %igen Trenngels.....	52
Tabelle 3.2:	Zusammensetzung des 5 %igen Sammelgels.....	52
Tabelle 3.3:	Zyklusbedingungen der PCR.....	58
Tabelle 3.4:	Konditionen des Restriktionsverdau durch <i>Kpn2I</i> ( <i>BspEI</i> ) .....	59
Tabelle 3.5:	Zyklusbedingungen der qRT-PCR.....	63
Tabelle A.1:	Verbrauchsmaterialien.....	126
Tabelle A.2:	Geräte und Laborhilfsmittel .....	127
Tabelle A.3:	Chemikalien und Reagenzien.....	129
Tabelle A.4:	Stammlösungen .....	132
Tabelle A.5:	Bleichlösung .....	133
Tabelle A.6:	Einfrier-Puffer A .....	133
Tabelle A.7:	Einfrier-Puffer B.....	134
Tabelle A.8:	Ethanol:Tween®20.....	134
Tabelle A.9:	M9-Puffer .....	134
Tabelle A.10:	M9:Tween®20 .....	134
Tabelle A.11:	NaCl-Pepton .....	135
Tabelle A.12:	3x Lämmli-Puffer .....	135
Tabelle A.13:	10x Lauf-Puffer .....	135
Tabelle A.14:	10x TBS-Puffer .....	136
Tabelle A.15:	10x TBS-T-Puffer.....	136
Tabelle A.16:	Block-Puffer .....	136
Tabelle A.17:	Blot-Puffer nach Towbin.....	136
Tabelle A.18:	ECL-Lösung .....	137
Tabelle A.19:	Lyse-Puffer I.....	137
Tabelle A.20:	Proteasomaktivitäts-Messpuffer.....	138
Tabelle A.21:	Strip-Puffer .....	138
Tabelle A.22:	50x TAE-Puffer .....	138
Tabelle A.23:	DEPC-Wasser.....	139
Tabelle A.24:	Lyse-Puffer II .....	139
Tabelle A.25:	2x YT-Agar .....	140
Tabelle A.26:	2x YT-Medium.....	140
Tabelle A.27:	NGM-Agar .....	141
Tabelle A.28:	Flüssig-NGM.....	141
Tabelle A.29:	<i>C. elegans</i> Stämme .....	142
Tabelle A.30:	Bakterien Stämme .....	142

Tabelle A.31:	RNAi-Klone .....	143
Tabelle A.32:	Kits .....	144
Tabelle A.33:	Enzyme und Antikörper .....	144
Tabelle A.34:	Oligonukleotide .....	145
Tabelle A.35:	Software.....	146

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
<i>abu</i>	<i>activated in blocked UPR</i>
ADP	Adenosindiphosphat
<i>age-1</i>	<i>ageing alteration family member</i>
AGEs	<i>advanced glycation end products</i>
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATF4	<i>activating transcription factor 4</i>
ATF6	<i>activating transcription factor 6</i>
ATF-6	<i>ATF (cAMP-dependent transcription factor) family</i>
ATFS-1	<i>activating transcription factor associated with stress</i>
ATG	Autophagie-assoziiertes Protein
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
BAG1	<i>BCL-2 associate athanogene 1</i>
BEC1	Beclin 1
BEC-1	<i>beclin (human autophagy) homolog-1</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bZip	<i>basic leucine-zipper</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein <math>\beta</math></i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CGC	Caenorhabditis Genetics Center

CHOP	C/EBP homologes Protein
CLIPS	<i>chaperones linked to protein synthesis</i>
Clp	<i>caseinolytic peptidase family</i>
CMA	<i>chaperone mediated autophagy</i>
C <sub>T</sub>	<i>Cycle Threshold</i>
<i>daf-12</i>	<i>abnormal dauer formation</i>
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTC	<i>distal tip cell</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>dve-1</i>	<i>defective proventriculus in drosophila homologue</i>
e <sup>-</sup>	Elektron
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
ECL	<i>enhanced chemiluminescent</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>egg-prep</i>	<i>egg-preparation</i>
eIF2	<i>eukaryotic translational initiation factor 2</i>
Em	Emissionswellenlänge
EMS	Ethylmethansulfonat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>

---

ERSE	<i>ER stressresponse element</i>
Era	<i>estrogen receptor <math>\alpha</math></i>
ETC	<i>electron transport chain</i>
Ex	<i>excitation wave length</i>
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
F-Generation	Filialgeneration
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O bidest.	bidestilliertes H <sub>2</sub> O
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HAF-1	<i>HALF transporter (PGP related)</i>
HCS	<i>heat shock cognate protein</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIP	<i>hsc70-interacting protein</i>
HOP	<i>HSC70-HSP90 organizing protein</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSF1	<i>heat shock factor 1</i>
HSR	<i>heat shock response</i>
HtrA2	<i>high temperature requirement protein A2</i>
IGEPAL	Octylphenoxypoly(ethyleneoxy)ethanol
IGF	<i>insulin like growth factor</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IRE1	<i>inositol-requiring enzyme 1</i>
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B</i>
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>



LAMP2A	<i>lysosome-associated membrane protein type 2A</i>
LC3	<i>light chain 3</i>
LGG	<i>LC3, GABARAP and GATE-16 family</i>
MAP-LC3	<i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
<i>mdt</i>	<i>mediator</i>
<i>mev</i>	<i>abnormal methyl viologen sensitivity</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MURE	<i>mitochondrial unfolded protein response element</i>
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology</i>
NEF	<i>nucleotide exchanging factor</i>
NFY	<i>nuclear factor Y</i>
NF-κB	<i>nuclear transcription factor-κB</i>
NGM	<i>nematode growth medium</i>
NRF	<i>nuclear respiratory factor</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxid-Radikal
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAS	<i>proteasome alpha subunit</i>
PBS	<i>proteasome beta subunit</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEK-1	<i>human PERK kinase homolog-1</i>
PERK	<i>protein kinase RNA-like ER kinase</i>
P-Generation	Parenteralgeneration
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PI3K	Klasse III Phosphatidylinositol-3-Kinase

PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PKC	Proteinkinase C
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Coenzym Q
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S1P	<i>site-1 protease</i>
S2P	<i>site-2 protease</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>sel-1</i>	<i>suppressor/enhancer of lin-12</i>
SEPA-1	<i>suppressor of ectopic P granules in autophagy mutant</i>
sHSP	<i>small heat shock protein</i>
SIR-2.1	<i>yeast SIR related</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SKN-1	<i>skinhead family member</i>
Suc-LLVY-AMC	N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin
SW-PCR	<i>single worm PCR</i>
TBS	tris-buffered saline
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethyldiamin

TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
T <sub>m</sub>	<i>melting temperature</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktors- $\alpha$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>uba</i>	<i>UBA (human ubiquitin) related</i>
<i>ubl-5</i>	<i>ubiquitin-like protein</i>
UBQ	Ubiquitin
UDP	Uridindiphosphat
ULK	<i>uncoordinated 51-like kinase</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UPRE	<i>UPR element</i>
UPR <sup>ER</sup>	<i>unfolded protein response des ERs</i>
UPR <sup>mt</sup>	<i>unfolded protein response der Mitochondrien</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VPS-43	<i>related to yeast vacuolar protein sorting factor-43</i>
XBP-1	<i>x-box-binding protein 1</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Glukosetoxizität

Glukose stellt neben Fetten die wichtigste metabolische Energiequelle für den Organismus dar. Die Versorgung der Organe über das Blut bedarf daher eine genaue Regulation der Glukosekonzentration [1]. Glukose wird dem Organismus zum einen durch die Aufnahme von Kohlenhydraten mit der Nahrung, gefolgt von deren Verdauung und der anschließenden intestinalen Absorption der Glukose, bereitgestellt. Zum anderen ist eine endogene Verfügbarkeit durch die Glykogenolyse in der Leber sowie die Glukoneogenese in der Leber und den Nieren innerhalb von Fastenperioden sichergestellt [2–4]. Die Regulation der Blutglukosekonzentration wird primär durch Insulin gewährleistet, welches einerseits die Aufnahme von Glukose aus dem Blut in Muskel- und Fettgewebe induziert und andererseits, als Antagonist des Glukagons, die hepatische Glykogenolyse sowie die Glukoneogenese inhibiert [4, 5]. Eine Hyperglykämie ist dabei die typische Folge eines absoluten oder relativen Insulinmangels im Rahmen der Pathogenese des Diabetes mellitus vom Typ I beziehungsweise Typ II [6, 7]. Bereits im Jahr 1940 konnte erstmals ein pathologischer Effekt erhöhter Blutglukosekonzentrationen auf pankreatische  $\beta$ -Zellen festgestellt werden [8], der als „Glukosetoxizität“ bezeichnet [9] und im Folgenden besonders in Assoziation mit der Entstehung von Diabetes mellitus gebracht wurde [10, 11]. Heute werden die chronische Hyperglykämie und die damit einhergehende Glukosetoxizität als Hauptursache Diabetes-assoziiierter Komplikationen definiert [12, 13]. Neben den klassischen mikrovaskulären Komplikationen wie Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie wird auch die Entstehung der Arteriosklerose mit Diabetes mellitus in Verbindung gebracht und als makrovaskuläre Komplikation bezeichnet [14, 15]. Darüber hinaus wird die chronische Hyperglykämie mit dem frühzeitigen Tod von Individuen assoziiert [16].

### 1.1.1 Hyperglykämie und oxidativer Stress

Die Glukosetoxizität kann durch verschiedene Pathomechanismen erklärt werden. Die mitochondriale Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS; engl. *reactive oxygen species*) gilt dabei als Stimulator verschiedener Signalwege, die in die Entstehung Hyperglykämie-abhängiger Schädigungen involviert sind [7, 17–20]. Die intrazelluläre Oxidation der Glukose beginnt mit der Glykolyse im Cytoplasma, wodurch Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Pyruvat entstehen. Die Oxidation von Pyruvat innerhalb des Citratzyklus liefert weitere Reduktionsäquivalente in Form von NADH und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH<sub>2</sub>), welche in die mitochondriale Elektronentransportkette (ETC; engl. *electron transport chain*) eingeschleust werden [17]. Der mitochondriale Elektronen-Transport wird durch 4 Multi-Proteinkomplexe (Komplex I bis IV), die mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert sind, sowie Coenzym Q und Cytochrom c vermittelt [21]. NADH, welches als Hauptelektronendonator fungiert, überträgt Elektronen auf Komplex I, die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase [17, 22], wohingegen FADH<sub>2</sub> als Elektronendonator für Komplex II, die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase, fungiert. Beide Komplexe reduzieren schließlich Coenzym Q, welches als Elektronenüberträger durch Komplex III oxidiert wird [22, 23]. Die Elektronen werden im Folgenden von Cytochrom c und Komplex IV, der Cytochrom-c-Oxidase, letztendlich auf molekularen Sauerstoff übertragen, um diesen zu Wasser zu reduzieren [17, 22]. Durch den Elektronentransfer entsteht ein Protonengradient, dessen Energie für die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) durch die ATP-Synthase, auch als Komplex V bezeichnet, verwendet wird [21, 23]. Schon unter normalen physiologischen Bedingungen entstehen ROS durch die Übertragung von einem Elektron auf molekularen Sauerstoff innerhalb der mitochondrialen ETC [24], die als Hauptquelle endogen gebildeter ROS unseres Organismus definiert ist [25–29]. Besonders in Zellen ohne restriktive Glukoseaufnahme, die typischerweise durch eine Hyperglykämie geschädigt werden, steigt diese ROS-Produktion durch die vermehrte Verstoffwechslung der Glukose und die erhöhte Oxidation der Reduktionsäquivalente NADH und FADH<sub>2</sub> an [18, 30]. Die daraus resultierende Hyperpolarisation der mitochondrialen Membran inhibiert den Elektronentransport an Komplex III [23, 31]. Dadurch steigt die Halbwertszeit des Radikal-Zwischenprodukts von Coenzym Q, des Semichinons, Elektronen werden an dieser Stelle vermehrt auf molekularen Sauerstoff übertragen und erhöhen so die Generierung des Superoxid-Radikals (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) [18, 22, 30].

## 1.1.2 Glukose-induzierte Schädigungen

Durch die vermehrte Produktion von ROS in der mitochondrialen ETC werden bestimmte Signalwege aktiviert, die als Mediatoren diabetischer Komplikationen gelten [7, 17–20, 22]. Ausgangspunkt dafür ist die Hemmung der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), einem Enzym der Glykolyse, durch ROS [32]. Der dadurch bewirkte Anstieg der Glykolyse-Intermediate stromaufwärts von Glycerinaldehyd-3-phosphat führt zu einem verstärkten Flux der Intermediate in Signalwege, die mit der Entstehung diabetischer Komplikationen assoziiert werden. Dazu gehören der Polyol-Signalweg, der Hexosamin-Signalweg, die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) sowie die Entstehung von Glykierungsendprodukten (AGEs; engl. *advanced glycation end products*) [7, 18, 20, 22]. Abbildung 1.1 stellt schematisch die Zusammenhänge dar.

Innerhalb des Polyolwegs katalysiert die Aldose-Reduktase NADPH-abhängig die Reduktion von Glukose zu Sorbitol, gefolgt von dessen NAD<sup>+</sup>-abhängiger Oxidation zu Fruktose durch die Sorbitol-Dehydrogenase. Durch die dementsprechend geringe Verfügbarkeit von NADPH wird die Regeneration von reduziertem Glutathion, welches als wichtiger Radikalfänger für ROS fungiert, unterdrückt. Zusätzlich steigt die O<sub>2</sub><sup>-•</sup>-Bildung, denn die erhöhte NADH-Produktion durch die Oxidation der Fruktose resultiert in einer gesteigerten Aktivität der NADH-Oxidase [33]. Darüber hinaus ist die Akkumulation von Sorbitol [34] sowie der beschriebene oxidative Stress [35] mit einer osmotischen Dysregulation im Rahmen des diabetischen Katarakts assoziiert und auch die Entwicklung von vaskulären Erkrankungen scheint mit einer erhöhten Expression der Aldose-Reduktase in Verbindung zu stehen [36, 37].

Fruktose-6-phosphat wird innerhalb des Hexosaminwegs zunächst in Glucosamin-6-phosphat und anschließend in Uridindiphosphat (UDP)-N-Acetylglucosamin (GlcNAc), das als Substrat einer spezifischen O-GlcNAc-Transferase dient, konvertiert [7, 18, 22]. Dieses Enzym katalysiert die posttranslationale Modifikation von Proteinen in Form einer O-GlcNAcylierung an spezifischen Serin- und Threonin-Resten [38], die oft mit pathologischen Veränderungen des Expressionsmusters verschiedener Gene einhergeht [32, 39, 40]. Darüber hinaus ist die Inhibierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) durch O-GlcNAcylierung im Zusammenhang mit der Entstehung diabetischer vaskulärer Schädigungen beschrieben [41].

Innerhalb einer Hyperglykämie wird die chronische Aktivierung der PKC durch Diacylglycerol (DAG) vermittelt [42, 43]. Die gesteigerte *de novo* Synthese von DAG

resultiert dabei aus der Akkumulation des glykolytischen Intermediats Dihydroxyacetonphosphat. Dieses wird zu Glycerinaldehyd-3-phosphat reduziert, welches die DAG-Synthese positiv reguliert [20, 44]. Die Aktivierung des DAG-PKC-Signalwegs beeinflusst eine Reihe pathophysiologischer Prozesse, die mit mikro- und makrovaskulären Komplikationen des Diabetes mellitus assoziiert werden und durch eine veränderte Expression verschiedener Faktoren charakterisiert sind [45, 46]. Dazu gehört beispielsweise die verminderte Expression der eNOS mit gleichzeitig erhöhter Expression von Endothelin-1, resultierend in Durchblutungsstörungen, eine erhöhte Expression von *vascular endothelial growth factors* (VEGFs), einhergehend mit Veränderungen der vaskulären Permeabilität durch übermäßige Angiogenese, eine erhöhte Expression des *transforming growth factors- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) sowie des *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), die mit kapillaren bzw. vaskulären Verschlüssen assoziiert werden, sowie eine gesteigerte Expression des nukleären Transkriptionsfaktors  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B; engl. *nuclear transcription factor- $\kappa$ B*), der die Expression von pro-inflammatorischen Genen steigert. Darüber hinaus wird auch die Entstehung von oxidativem Stress durch eine verstärkte PKC-Aktivität begünstigt, denn die Expression der NAD(P)H-Oxidasen wird ebenfalls durch eine erhöhte DAG-PKC-Signaltransduktion gesteigert [18].

AGEs entstehen durch eine nicht-enzymatische Reaktion von Glukose, anderen reduzierenden Zuckern [47], oder reaktiven Dicarboxylen [48] mit Aminogruppen von intra- sowie extrazellulären Proteinen. Extrazellulär steht dabei besonders die Bildung von AGEs über Glycerinaldehyd-3-phosphat und daraus gebildeten Dicarboxylen, wie zum Beispiel Methylglyoxal, im Vordergrund. Die schädigende Wirkung der AGEs begründet sich besonders in der veränderten Funktion der modifizierten intrazellulären Proteine. Aber auch extrazellulär spielen AGEs eine Rolle im Rahmen diabetischer Komplikation, denn sie führen zu veränderten Interaktionen modifizierter extrazellulärer Matrixkomponenten mit anderen Matrixkomponenten und binden an entsprechende AGE-Rezeptoren. Letzteres resultiert in der Entstehung von ROS, welche wiederum NF- $\kappa$ B aktivieren und so zu einem veränderten Expressionsmuster von Genen, die in die pathophysiologischen Mechanismen diabetischer Komplikationen involviert sind, führen [18].

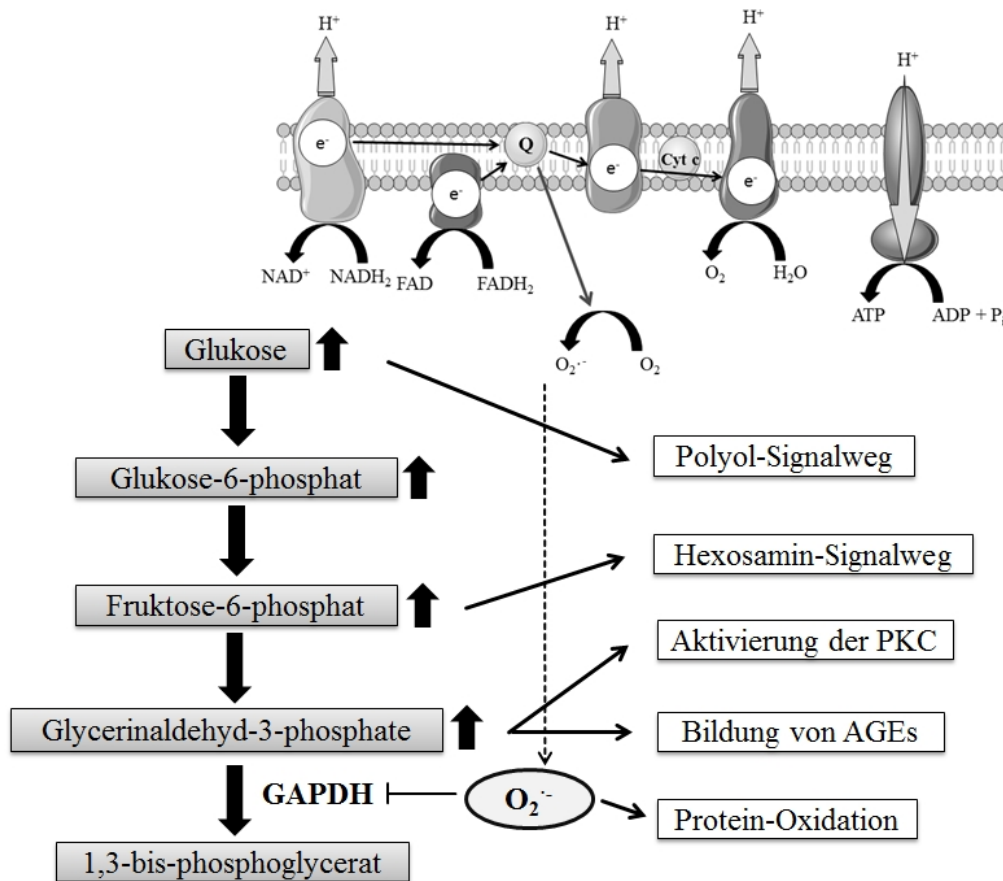


Abbildung 1.1: Klassische Signalwege der Glukosetoxizität

Neben der Aktivierung der beschriebenen Signalwege durch ROS führen diese zu einer direkten Schädigung aller Arten von Makromolekülen, wie zum Beispiel von Nucleinsäuren, Lipiden und Proteinen [49, 50]. Neben der Bildung von AGEs ist die Oxidation von Proteinen einer der Hauptgründe für ROS-abhängige Protein-Schädigungen, resultierend in einer Dysfunktion des Proteins bis hin zum Verlust der Funktionalität [49].



## 1.2 Proteostase

Proteine sind die Klasse der Makromoleküle mit der höchsten strukturellen Komplexität und Diversität [51]. Sie stellen die „molekularen Maschinen“ der Zelle dar. Ihre Hauptaufgaben sind unter anderem die Signaltransduktion, Transport, enzymatische Katalyse und Membranfusion [52]. Die Zellen und Gewebe eines Organismus stehen unter der stetigen Herausforderung, die Einwirkungen von akutem und chronischem Stress auszugleichen [53, 54]. Proteine sind dabei die Moleküle mit der höchsten Sensitivität gegenüber zellulärem Stress [55]. Die Belastung der Zelle durch physikalischen, chemischen, umweltbedingten oder metabolischen Stress kann die Entfaltung, Fehlfaltung und die unspezifische Aggregation von Proteinen bedingen [54, 56]. Dadurch wird die Funktionalität der Proteine, welche maßgeblich von der spezifischen dreidimensionalen Struktur abhängt [57], verändert und beeinträchtigt.

Die Homöostase des eukaryotischen Proteoms, der Gesamtheit zellulärer Proteine, wird als Proteostase bezeichnet. Sie wird durch ein komplexes Netzwerk molekularer Interaktionen, das Synthese, Faltung, Transport sowie Abbau der Proteine kontrolliert und koordiniert, charakterisiert [58]. Das Proteostase-Netzwerk stellt somit die Proteinqualitätskontrolle dar, welche fehlgefaltete oder geschädigte Proteine erkennt, rückfaltet oder deren Abbau initiiert. Damit existiert gleichzeitig ein Schlüsselmechanismus der zellulären Stressantwort [59], der unabdingbar für die Funktionalität der Zelle ist [60]. Das Netzwerk der zellulären Proteostase umfasst die Hitzeschockantwort im Cytosol, die *Unfolded Protein Response* in den Mitochondrien ( $UPR^{mt}$ ) und im endoplasmatischen Retikulum (ER) ( $UPR^{ER}$ ), die Autophagie und das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Eine schematische Darstellung der Proteostase findet sich in Abbildung 1.2.

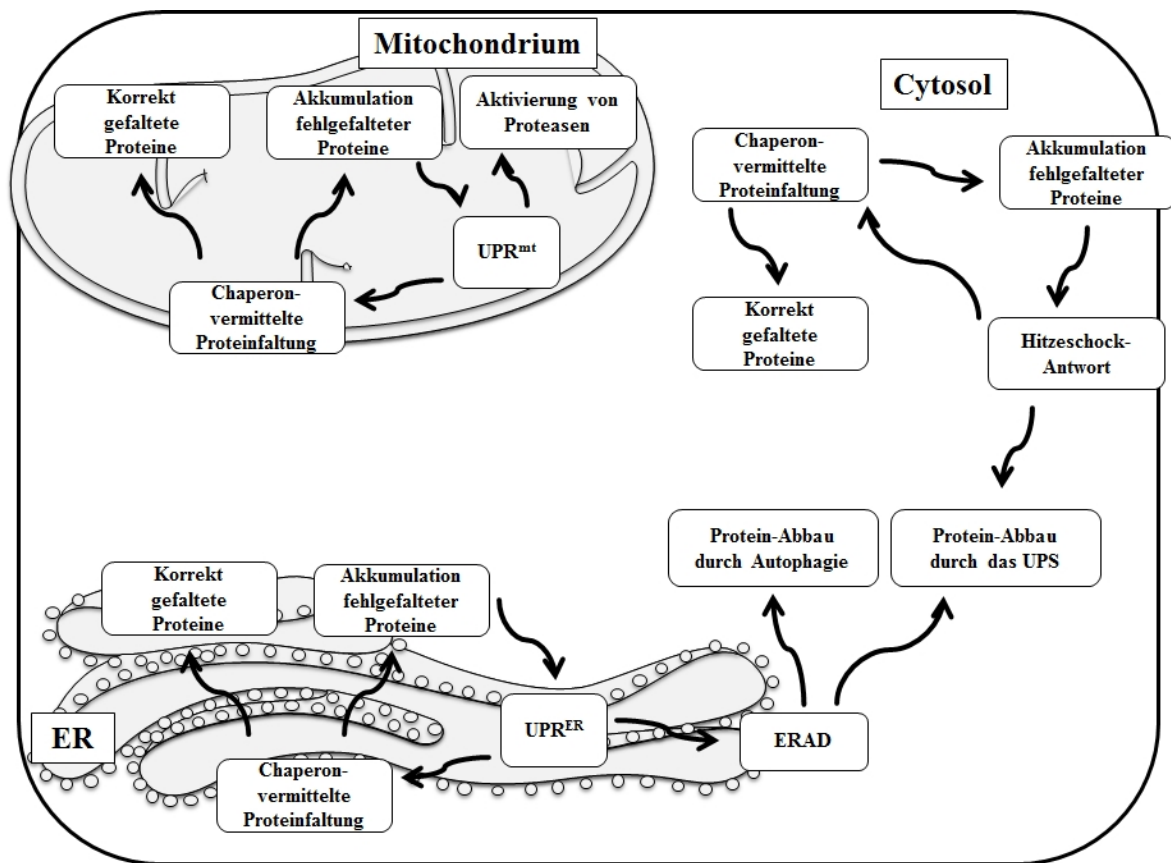


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der zellulären Proteostase

UPR<sup>mt</sup>: *unfolded protein response* im Mitochondrium; ER: endoplasmatisches Retikulum; UPR<sup>ER</sup>: *unfolded protein response* im ER; UPS: Ubiquitin-Proteasom-System; ERAD: *ER associated degradation*

### 1.2.1 Chaperon-vermittelte Proteinfaltung

Die zelluläre Proteostase hängt maßgeblich von der Aktivität molekularer Chaperone ab. Sie fördern die *de novo* Faltung neu-synthetisierter Proteine, sind aber ebenso an der Ent- und Neufaltung fehlgefalteter oder denaturierter Proteine beteiligt [61]. Vertreten in allen Zellkompartimenten [62] weisen sie neben der Proteinfaltung diverse weitere Funktionen innerhalb der Proteostase auf, die beispielsweise bei der Translokation von Proteinen über verschiedene zelluläre Kompartimente, der Stabilisierung der Protein-Konformation, dem Zusammenschluss von Protein-Komplexen sowie dem Abbau von Proteinen eine Rolle spielen [63]. In eukaryotischen Zellen werden diese Funktionen von zwei unterschiedlichen Chaperon-Netzwerken durchgeführt [64]. Zum einen sind das Chaperone, die physikalisch und funktionell mit der Translation assoziiert sind und die Faltung neu-synthetisierter Proteine unterstützen (*chaperones linked to protein synthesis*;

CLIPS). Zum anderen sind es die Hitzeschockproteine (HSPs) [61], welche die Hauptklasse bilden [62]. HSPs sind stressresponsive Chaperone, deren Expression durch Hitzeschock, aber ebenso durch verschiedene andere Stresskonditionen, die zu einer Fehlfaltung oder Schädigung von Proteinen führen, induziert wird [56, 65]. In Eukaryoten wird diese hochkonservierte Gruppe von Proteinen entsprechend ihrer molekularen Masse in die Klassen HSP-40, HSP-60, HSP-70, HSP-90 und HSP-100 sowie kleine HSPs (sHSP; engl. *small heat shock protein*) eingeteilt [53, 61, 66]. Innerhalb der Proteostase sind die unterschiedlichen Klassen an unterschiedlichen Prozessen beteiligt. Die HSP-70 Chaperone sind am weitesten verbreitet [67]. In Gegenwart von Stressoren sind sie verantwortlich für die Prävention der Protein-Aggregation und die Neufaltung fehlgefalteter Proteine. Darüber hinaus spielen sie unter physiologischen Bedingungen eine Rolle innerhalb der *de novo* Faltung, der Protein-Translokation durch Membranen von Zellorganellen, dem Abbau von oligomeren Proteinstrukturen, der proteolytischen Degradierung von instabilen Proteinen sowie der Kontrolle der biologischen Aktivität von regulatorischen Proteinen [68]. Sie weisen eine ATPase-Domäne sowie eine Substrat-Bindungs-Domäne auf. Ihre Aktivität läuft in Zyklen der Protein-Bindung und ATP-Hydrolyse ab und endet mit der Freisetzung des Proteins [67], wobei Ihre Aktivität abhängig von der Interaktion der beiden Domänen untereinander sowie der Interaktion der Domänen mit anderen Cofaktoren ist. Dazu gehören zum Beispiel die HSP-40 Chaperone, die auch als Co-Chaperone bezeichnet werden, sowie verschiedene Nukleotidaustauschfaktoren (NEF; engl. *nucleotide exchanging factor*) [62].

Die Aktivität der Mitochondrien-spezifischen HSP-60 Chaperone, auch bekannt als Chaperonine, ist ebenfalls ATP-abhängig, unterscheidet sich in ihrem Reaktions-Mechanismus jedoch von den HSP-70 Chaperonen. Chaperonine sind Doppelring-Komplexe, die in ihrem Zentrum eine Art Reaktionshöhle beherbergen. Hydrophobe Wechselwirkungen bewirken die Bindung des Protein-Substrats, gefolgt von dessen Translokation in das Zentrum des Chaperonins, in dem es, geschützt vor Aggregation mit anderen Proteinen, gefaltet wird [69]. Zusätzlich werden für diese Reaktion HSP-10 Co-Chaperone benötigt, denn sie fungieren als eine Art molekularer Deckel, der die Reaktionshöhle schließt [70].

Des Weiteren sind die hochkonservierten HSP-90 Chaperone zu nennen. Sie sind Cytosol-spezifisch und ihre Substrate sind vor allem Signaltransduktions-Proteine, wie zum Beispiel Steroid-Hormon-Rezeptoren, für deren Konformations-Stabilisierung sie verantwortlich sind. Ihre Aktivität ist ebenfalls ATP-abhängig [71].

Die Chaperone der HSP-100 Klasse sind vor allem für die Entfaltung fehlgefalteter Proteine sowie die Auflösung von Protein-Komplexen oder -Aggregaten zuständig [62, 66, 69].

Zuletzt sind die sHSPs zu nennen. Sie binden unspezifisch vor allem partiell denaturierte Proteine, um diese vor irreversibler Aggregation zu schützen [67] und ihre Ent- und Neufaltung, zum Beispiel durch HSP-70 Chaperone, einzuleiten [72].

### **1.2.2 *Unfolded Protein Response***

Naszierende Proteine sind im Cytosol, im ER sowie im Mitochondrium präsent und erfordern Mechanismen der Proteinfaltung. Wird die Kapazität der Proteinfaltung durch eine stressbedingte Akkumulation un- oder fehlgefalteter Proteine überstiegen, entsteht eine Stresssituation, an welche die Aktivität der Faltungs-Mechanismen angepasst werden muss [73].

Die eukaryotische Hitzeschockantwort (HSR; engl. *heat shock response*) stellt dabei die Proteinqualitätskontrolle für das Cytosol dar, mit dem Hitzeschockfaktor 1 (HSF1; engl. *heat shock factor 1*) als zentrales Element. Unter physiologischen Bedingungen liegt dieser Transkriptionsfaktor gebunden an cytosolische Chaperone vor. Wird die Kapazität der Faltungsmechanismen durch Akkumulation fehlerhafter Proteine überstiegen, transloziert HSF1 in den Nukleus und reguliert die Expression von Genen, die in die HSR involviert sind. Dazu gehören verschiedene, im Cytosol sowie im Nukleus lokalisierte Chaperone, aber ebenso Komponenten des UPS [73].

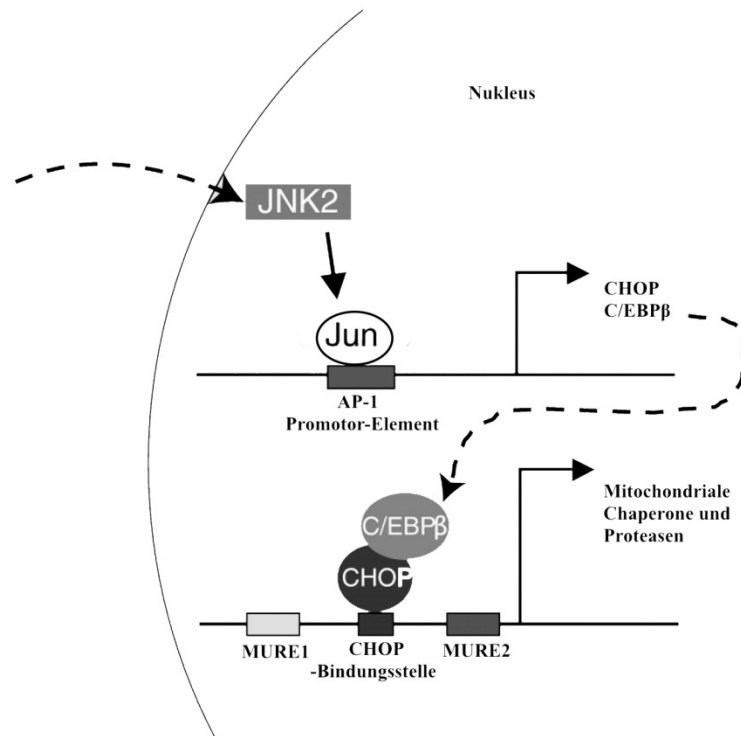
Die entsprechenden Signalwege im ER und im Mitochondrium werden im Folgenden erläutert.

#### **1.2.2.1 *Unfolded Protein Response im Mitochondrium***

Zelluläre Stresssituationen, wie erhöhte Temperaturen, oxidativer Stress oder die Akkumulation von mutierten Proteinen, fordern die mitochondriale Proteostase heraus und führen zu einer Situation, in der eine Proteinqualitätskontrolle unabdingbar ist [74]. Die UPR<sup>mt</sup> ist eine Stressantwort, welche die Proteostase innerhalb des Organells aufrecht erhält [75]. Sie stellt einen Signalweg zwischen Mitochondrium und Nukleus dar, der zunächst die Stresssituation im Mitochondrium erkennt, um ein Signal aus diesem über das Cytosol in den Nukleus abzugeben, um dort die Transkription von mitochondriale

Chaperone und Proteasen der Qualitätskontrolle kodierenden Genen zu erhöhen und so die mitochondriale Proteostase wiederherzustellen [73].

Obwohl das Mitochondrium sein eigenes Genom beherbergt, wird der größte Teil mitochondrialer Proteine im Cytosol exprimiert und ins Mitochondrium importiert. Für eine effiziente Translokation über die engen Poren der beiden mitochondrialen Membranen müssen die Vorläufer-Proteine in einem relativ ungefalteten Stadium importiert werden, in welchem sie die mitochondriale Matrix erreichen. Dadurch ist auch unter physiologischen Bedingungen im Mitochondrium die Aktivität von Faltungsmechanismen nötig [76], die, wie in Abschnitt 1.2.1 bereits erläutert wurde, von Chaperonen abhängig sind. Die Chaperone mtHSP70, HSP-60 und HSP-10 sind für die Faltung von Proteinen, die ins Mitochondrium importiert wurden, sowie für die Ent- und Neufaltung von beschädigten mitochondrialen Proteinen verantwortlich. Überschüssige Proteine, die nicht von Chaperonen als Substrat erkannt werden unterlaufen dem proteolytischen Abbau durch spezifische Proteasen, zu denen beispielsweise verschiedene Peptidasen aus der *caseinolytic peptidase family* (Clps) und die Lon-Protease gehören. Infolge von proteotoxischem Stress werden diese spezifischen Chaperone und Proteasen durch die UPR<sup>mt</sup> verstärkt aktiviert [77]. Die Expression der entsprechenden Ziel-Gene der UPR<sup>mt</sup> wird dabei durch ein Dimer der Transkriptionsfaktoren C/EBP homologes Protein (CHOP) und *CCAAT-enhancer-binding protein β* (C/EBPβ) koordiniert, das an eine spezifische CHOP-Bindungsstelle in der Promotorregion der Gene bindet [77–79]. Diese Bindungsstelle wird von zwei UPR<sup>mt</sup> Respons-Elementen (MUREs; engl. *mitochondrial unfolded protein response elements*), die in verschiedenen Ziel-Genen der UPR<sup>mt</sup> identifiziert wurden [80], flankiert [77, 79]. Für die Expression von CHOP und C/EBPβ ist wiederum die Aktivität der c-Jun N-terminalen Kinase 2 (JNK2; engl. *c-jun N-terminal kinase 2*) nötig. Diese wird durch Peptide, welche bei dem proteolytischen Abbau fehlerhafter Proteine in der mitochondrialen Matrix vermehrt entstehen und ins Cytosol transportiert werden, aktiviert. JNK2 transloziert in den Nukleus und phosphoryliert c-Jun, das an den Transkriptionsfaktor AP-1 bindet und diesen aktiviert. AP-1 steigert schließlich die Transkription von CHOP und C/EBPβ [77]. Eine schematische Darstellung der Signalwege findet sich in Abbildung 1.3.



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der UPR<sup>mt</sup> Signalkaskade in Säugerzellen**

JNK2: *c-jun N-terminal kinase 2*; CHOP: C/EBP homologes Protein; C/EBP $\beta$ : *CCAAT-enhancer-binding protein  $\beta$* ; MURE: *mitochondrial unfolded protein response element*. Modifiziert nach Haynes und Ron, 2010 [75].

Neben der Aktivierung der beschriebenen Signaltransduktion existiert eine weitere separate Stressantwort innerhalb der UPR<sup>mt</sup>, die sich auf den mitochondrialen Intermembranraum beschränkt und über die Aktivierung der Proteinkinase B vermittelt wird. Durch Phosphorylierung des Östrogenrezeptors *estrogen receptor  $\alpha$*  (Era) wird beispielsweise die Transkription der Serin-Protease *high temperature requirement protein A2* (HtrA2), die im mitochondrialen Intermembranraum aktiv ist, gesteigert [73, 79].

### 1.2.2.2 *Unfolded Protein Response im ER*

In eukaryotischen Zellen wird der größte Teil sekretorischer und transmembraner Proteine im Lumen des ERs gefaltet [81]. Im Anschluss an die Translation an den Ribosomen erreichen die genannten Proteine das ER als ungefaltete Polypeptide. Dort herrscht eine optimale Umgebung für die Faltung sowie die post-translationale Modifizierung der Polypeptidketten, die für die Reifung zu Proteinen der Plasmamembran, intrazellulärer Organellen oder auch der extrazellulären Umgebung bestimmt sind [82]. Der Flux in das ER ist sehr variabel und kann sich in Abhängigkeit des Status der Zelldifferenzierung, wechselnder umweltbedingter Konditionen sowie des physiologischen Zustands der Zelle

verändern [81]. Zudem ist eine Beeinträchtigung der Proteinfaltung durch eine Vielzahl zellulärer Stresskonditionen, zu denen Nährstoffmangel, Störungen des Redox-Status, Veränderungen der Calcium-Konzentration, eine fehlerhafte post-translationale Modifizierung oder eine Erhöhung in der Protein-Synthese gehören, ständig präsent und führt weiterhin zu einer Akkumulation un- oder fehlgefalteter Proteine im ER Lumen [83]. Um die Proteostase innerhalb des ERs in solchen Situationen aufrechtzuerhalten, existieren spezifische Signalkaskaden im Rahmen der UPR<sup>ER</sup> [81, 82, 84]. Die UPR<sup>ER</sup> reduziert Translationsprozesse und den Flux von naszierenden Proteinen ins ER, bedingt die Erhöhung der Expression von Chaperonen sowie die Aktivierung des *ER-associated degradation* (ERAD)-Systems [83]. Letzteres vermittelt den Transport von Proteinen, die im ER nicht korrekt gefaltet werden können, in das Cytosol, wo sie ubiquitiniert und durch das UPS degradiert werden [85] oder dem lysosomalen Abbau als Folge der Autophagie unterliegen [86].

Drei integrierte Signalkaskaden, die parallel zueinander interagieren, wurden innerhalb der UPR<sup>ER</sup> identifiziert. Eine schematische Darstellung der wichtigsten Interaktionen findet sich in Abbildung 1.4. Die Induktion der Signalkaskaden beginnt mit der Aktivierung sogenannter Stresssensoren, den drei Transmembranproteinen *inositol-requiring enzyme 1* (IRE1), *protein kinase RNA-like ER kinase* (PERK) und *activating transcription factor 6* (ATF6), die ER-Stress in Form von einer Akkumulation un- oder fehlgefalteter Proteine erkennen [81, 87–89]. Die Aktivierung aller drei Stresssensoren ist abhängig von dem Chaperon *immunoglobulin binding protein* (BiP). Unter basalen Konditionen bindet BiP an die luminal Domäne eines jeden der drei Stresssensoren, wodurch diese in ihrer inaktiven Form vorliegen. Infolge der Akkumulation un- oder fehlgefalteter Proteine im ER binden diese über ihre hydrophoben Domänen an BiP und bewirken dessen Dissoziation von den Stresssensoren, die dadurch aktiviert werden [87, 90].

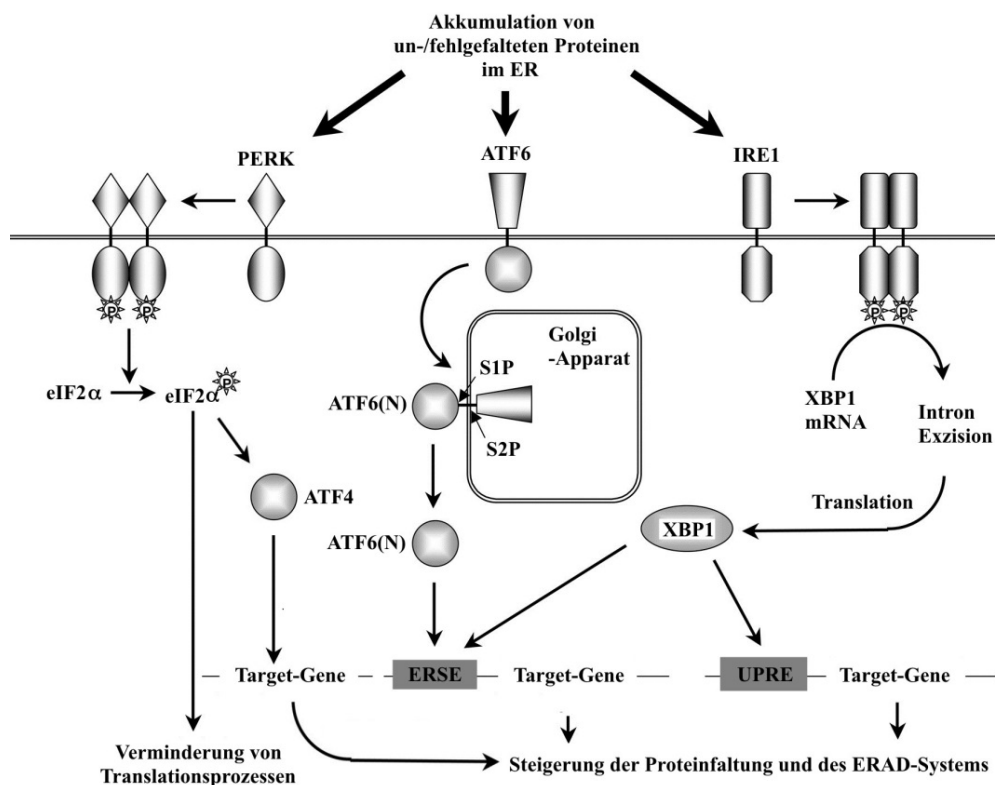
Die Aktivierung der IRE1-Signalkaskade induziert den am stärksten konservierten Signalweg innerhalb der UPR<sup>ER</sup> [81, 87–89]. IRE1 ist ein bifunktionales Transmembranprotein mit einer Kinase- sowie einer Endoribonuklease/RNase-Aktivität [89], das durch die luminal Aktivierung zunächst dimerisiert und trans-autophosphoryliert wird. Die dadurch herbeigeführte Konformationsänderung induziert die Aktivierung der cytosolischen RNase-Domäne, welche die Exzision eines Introns der mRNA des UPR<sup>ER</sup>-spezifischen Transkriptionsfaktors *x-box-binding protein 1* (XBP1) bewirkt [90]. Die gespleißte mRNA wird in den aktiven Transkriptionsfaktor translatiert. XBP1 transloziert

in den Nukleus und reguliert die Transkription einer breiten Vielfalt von Genen, die Proteine kodieren, welche in die ER-Membran-Biogenese, die Protein-Faltung, das ERAD-System und die zelluläre Protein-Sekretion involviert sind [87].

PERK weist strukturelle Ähnlichkeiten zu IRE1 auf, denn es beherbergt eine ER-luminale dimerisierende Domäne sowie eine cytosolische Kinase-Domäne. Der unmittelbare Effekt der Aktivierung von PERK resultiert in der selektiven Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit des *eukaryotic translational initiation factor 2* (eIF2). Dadurch wird der eIF2B-Translations-Initiations-Komplex, der in die Regeneration von eIF2 involviert ist, inhibiert, wodurch die ribosomale Translation und somit der Import neu-synthetisierter Proteine in das ER vermindert wird. Darüber hinaus resultiert die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  in der Transkription selektiver stressresponsiver Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel dem *activating transcription factor 4* (ATF4), der die Expression von verschiedenen proteostatischen Genen reguliert [81, 87–89]. Dazu zählen solche, die für Chaperone, Elemente des ERADs, antioxidative Enzyme sowie Proteine, welche in die Biosynthese und den Transport von Aminosäuren involviert sind, kodieren [82].

Die Aktivierung des ATF6-Signalwegs erfolgt durch einen ungewöhnlichen Mechanismus, der als „regulierte intramembrane Proteolyse“ bezeichnet wird. Dabei transloziert ATF6 infolge einer Aktivierung vom ER zum Golgi-Apparat, um dort der proteolytischen Prozessierung durch die *site-1 protease* (S1P) und die *site-2 protease* (S2P) zu unterlaufen [91, 92]. Durch diese Prozessierung werden die luminale Domäne sowie der transmembrane Anker entfernt, woraufhin das freigesetzte N-terminale Fragment (ATF6(N)) in den Nukleus transloziert, wo es als aktiver Transkriptionsfaktor die Expression von UPR<sup>ER</sup> Ziel-Genen reguliert [89]. Dies geschieht in Gegenwart des Transkriptionsfaktors *nuclear factor Y* (NFY), auch bekannt als *CCAAT-box binding factor*, durch die Bindung an sogenannte *ER stressresponse elements* (ERSEs), die in der Promotorregion vieler ER-stressresponsiver Gene identifiziert wurden. Dazu gehören molekulare Chaperone sowie Elemente des ERADs, aber auch CHOP, der als Transkriptionsfaktor stromabwärtsliegende proapoptische Gene reguliert [91]. Die Transkriptions-Regulation durch XBP1 wird ebenfalls über dessen Bindung an ERSEs vermittelt. Darüber hinaus aktiviert XBP1 stressresponsive Gene über die Interaktion mit Promotormotiven, die als *UPR elements* (UPREs) bezeichnet werden [91] und vor allem in der Promotorregion von Genen, die Chaperone kodieren, vorzufinden sind [88]. Die Bindung an UPREs ist dabei als XBP-1-Homodimer oder in Assoziation mit ATF6(N) als Heterodimer möglich [91].





**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der UPR<sup>ER</sup> Signalkaskaden in Säugerzellen**

PERK: *protein kinase RNA-like ER kinase*; eIF2: *eukaryotic translational initiation factor 2*; ATF4: *activating transcription factor 4*; ATF6: *activating transcription factor 6*; ATF6(N): ATF6 N-Terminus; S1P: *site-1 protease*; S2P: *site-2 protease*; ERSE: *ER stressresponse element*; IRE-1: *inositol-requiring enzyme 1*; XBP-1: *x-box-binding protein 1*; UPRE: *UPR element*; ERAD: *ER associated degradation*. Modifiziert nach Kitamura, 2008 [93].

Die UPR<sup>ER</sup> benötigt gewisse Rückkopplungsmechanismen, um sicherzustellen, dass ihre Aktivität weder hyperaktiviert noch frühzeitig abgeschwächt wird. Zwei negative Rückkopplungen sind bekannt und werden von GADD34, ein Mitglied der *DNA-damage and growth-arrest-inducible gene family*, und dem Co-Chaperon p58<sup>IPK</sup> vermittelt. Beide bedingen die Dephosphorylierung und somit die Inaktivierung von eIF2α beziehungsweise PERK [94]. Als positive Rückkopplung scheint eine Aktivierung der Transkription des XBP1 Gens durch das XBP1 Protein möglich zu sein. XBP1 bindet dabei an identische Promotorregionen (ERSEs [95]) wie ATF6(N) in Assoziation mit NFY. Dadurch entsteht eine autoregulatorische Rückkopplung, welche die IRE1-Signalkaskade, auch bei verminderter PERK- und ATF6-Aktivität, aufrechterhält [94].

Proteine, die im ER nicht korrekt gefaltet werden können, werden vom ERAD-System erkannt, ins Cytosol transportiert und dort durch das UPS degradiert [96]. Vor allem wenn das UPS durch die Akkumulation ubiquitiniertes Proteine überlastet ist, findet ein Abbau dieser durch Autophagie statt [86].

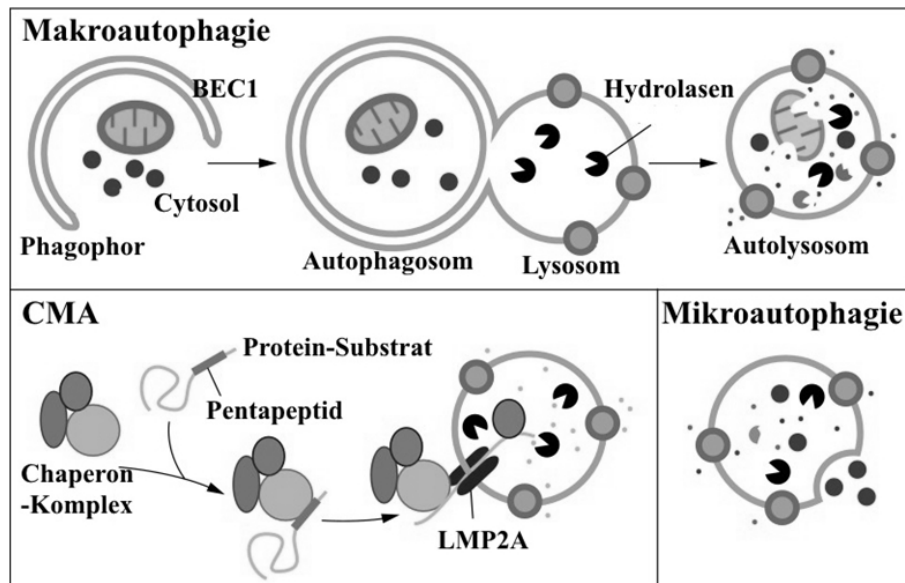
### 1.2.3 Autophagie

Die Autophagie ist ein evolutionär konservierter Prozess in eukaryotischen Zellen, der dem lysosomalen Abbau von Proteinen oder vollständigen Zellorganellen dient [97]. Sie ist ein selbst-degradierender Prozess mit einer wichtigen Funktion bei der Kontrolle über die Verwendung von Energie-Ressourcen innerhalb kritischer Entwicklungsphasen oder Nahrungsmangel. Die Autophagie ist aber ebenso in die Entfernung von fehlgefalteten oder aggregierten Proteinen, die Wiederherstellung von beschädigten Organellen sowie die Eliminierung von Pathogenen involviert [98] und wird in bestimmten Situationen durch die UPR aktiviert [86]. Weitere zelluläre Stresskonditionen, die zur Aktivierung der Autophagie führen, sind ein Mangel an Wachstumsfaktoren, DNA-Schäden, oxidativer Stress oder Hypoxie [99]. Dementsprechend stellt sie einen fundamentalen Mechanismus innerhalb der zellulären Proteostase unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen dar [100].

Der Begriff Autophagie stammt von den griechischen Worten für „selbst“ und „essen“ ab [98, 100] und ist der Oberbegriff für eine von Lysosomen abhängige Degradierung. Abhängig von der Art und Weise, wie das zu degradierende Material in das Lysosom transportiert wird, lassen sich drei Formen der Autophagie unterscheiden. In Säugerzellen werden sie bezeichnet als Makroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA; engl. *chaperone mediated autophagy*) und Mikroautophagie. Innerhalb der Makroautophagie wird das zu degradierende Material zunächst in ein durch eine Doppelmembran umgebenes Autophagosom eingeschlossen, das anschließend mit einem Lysosom verschmilzt. Innerhalb der CMA wird ein für die Degradierung bestimmtes Protein anhand eines spezifischen Signals durch ein Chaperon erkannt und durch dieses zum Lysosom transportiert. Als Mikroautophagie wird die Umschließung kleiner Teile des Cytoplasmas durch die lysosomale Membran selbst bezeichnet [100]. Abbildung 1.5 zeigt eine schematische Darstellung der drei Formen der Autophagie.

Die molekularen Mechanismen der Makroautophagie, meist als Autophagie bezeichnet, sind am besten erforscht. Auch wenn eine basale Aktivität der Makroautophagie besteht, ist die Regulation dieser abhängig vom gegenwärtigen Niveau an Aminosäuren, Nährstoffen und Wachstumsfaktoren [101] sowie an Sauerstoff und Energie. Da die Produkte der Autophagie vor allem durch die Degradierung zellulärer Proteine entstandene Aminosäuren sind, wird die Autophagie besonders durch einen Mangel an Aminosäuren gesteigert [102]. Die Signale, welche die Makroautophagie regulieren, sind sehr

unterschiedlich. Eine Induktion durch Nahrungsmangel wird beispielsweise durch die Inaktivierung der Serin/Threonin Proteinkinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR) vermittelt [103]. Die stromabwärts von mTOR integrierten *uncoordinated 51-like kinases* (ULKs) stellen Schlüsselemente der Induktion der Makroautophagie im Rahmen des Nährstoffmangels dar. Bei ausreichender Nährstoffversorgung interagiert der mTOR-Komplex 1 mit einem Komplex in dem ULK gebunden vorliegt und inhibiert diesen durch Phosphorylierung. Infolge von Nährstoffmangel wird der Energie- und Nährstoffsensor mTOR inhibiert und dissoziiert von ULK ab, wodurch letzterer dephosphoryliert wird und die Makroautophagie durch Förderung der Autophagosomen-Bildung induziert [99, 104]. Die Makroautophagie beginnt immer mit der Bildung einer Isolationsmembran, dem sogenannten Phagophor. Dieses kann ausgehend von verschiedenen Quellen generiert werden, zu denen das ER, die äußere Mitochondrienmembran sowie die Plasmamembran gehören [99]. Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P) wird beispielsweise für die Synthese von Omegasomen, den initialen Strukturen des Autophagosoms, die bei der Vesikel-Knospung ausgehend vom ER entstehen, benötigt. Für die Bildung von PI3P ist der Zusammenschluss verschiedener Autophagie-assoziiierter Proteine (ATGs) zu einem Komplex Voraussetzung [99]. Zu diesem gehören Beclin 1 (BEC1), das die Klasse III Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Vsp34 in den Komplex rekrutiert, um PI3P zu synthetisieren und die Bildung des Phagophors zu initiieren [99, 104, 104]. Die Elongation des Phagophors sowie die Schließung der Membranen und somit die Fertigstellung des reifen Autophagosoms wird durch zwei Ubiquitin-ähnliche Moleküle, Atg12 und die *light chain 3* (LC3)-Lipase, und zwei Konjugations-Systeme realisiert [104]. Ausgehend von BEC1 führt dieser Prozess somit zur Ausbildung naszierender Autophagosommembranen, die sich um die zu degradierenden Substrate schließen und diese in einem Vesikel, dem Autophagosom, verpacken. Letzteres verschmilzt mit einem Lysosom, wodurch das Autolysosom entsteht. Die Degradierung wird von lysosomalen Proteasen, Lipasen, Nukleasen und Glycosidasen katalysiert. Lysosomale Permeasen vermitteln den Transport der Abbauprodukte, zu denen Aminosäuren, Lipide, Nukleoside und Kohlenhydrate gehören, in das Cytosol, wo sie für verschiedenste synthetische und metabolische Signalwege zur Verfügung stehen [104].



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Autophagie in Säugerzellen**

BEC1: Beclin 1; CMA: *chaperone mediated autophagy*; LAMP2A: *lysosome-associated membrane protein type 2A*. Modifiziert nach Parzych und Klionsky, 2014 [97].

Während die Makroautophagie unspezifische Teile des Cytoplasmas in verhältnismäßig großen Mengen aufnehmen kann, ist der Degradierungsmechanismus der CMA hochspezifisch [97]. Durch die CMA werden cytosolische Proteine, die ein spezifisches Pentapeptid als Erkennungsmotiv aufweisen, selektiv durch ein Chaperon der *heat shock cognate protein* (HSC)-70 Familie im Cytosol erkannt [105, 106]. HSC-70 bildet in Interaktion mit den Co-Chaperonen HSP90, HSP40, *BCL-2 associate athanogene 1* (BAG1), *HSC70-HSP90 organizing protein* (HOP) und *hsc70-interacting protein* (HIP) einen Komplex mit dem Protein-Substrat, um dieses zu einem Lysosom zu transportieren [105]. Der Chaperon-Protein-Komplex bindet über den Membranrezeptor *lysosome-associated membrane protein type 2A* (LAMP2A) an die lysosomale Membran und das Protein-Substrat wird entfaltet und ins Lysosom verlagert [105, 106]. Auch die Aktivität der CMA zeigt ein sehr niedriges basales Niveau und wird, wie die Makroautophagie, vor allem durch einen Mangel an Aminosäuren aktiviert. Während die Makroautophagie als erste Reaktion auf Nahrungsknappheit aktiviert wird und ihr Maximum nach etwa 4 bis 6 h erreicht, beginnt eine schrittweise Aktivierung der CMA allerdings erst etwa 8 bis 10 h nach Beginn der Nahrungsknappheit und hält bis zu 3 Tage an. Darüber hinaus wird auch die CMA innerhalb der Proteinqualitätskontrolle aktiviert, um zum Beispiel durch oxidativen Stress beschädigte Proteine zu entfernen [106]. Beide Formen der Autophagie,

die Makroautophagie sowie die CMA, werden somit unter Stresskonditionen aktiviert [107].

Als dritte Form der Autophagie ist die Mikroautophagie hauptsächlich an der kontinuierlichen, basalen Umsetzung zellulärer Komponenten unter physiologischen Bedingungen beteiligt [108]. Durch Invagination werden konstitutiv ganze Teile des Cytoplasmas direkt durch das Lysosom aufgenommen und degradiert. Die Mikroautophagie dient hauptsächlich der Aufrechterhaltung der Masse und Form von zellulären Organellen sowie der Membran-Homöostase. In Situationen der Nahrungsknappheit ist eine Aktivierung der Mikroautophagie über das basale Niveau in Kooperation mit der Makroautophagie und der CMA ebenfalls möglich [109].

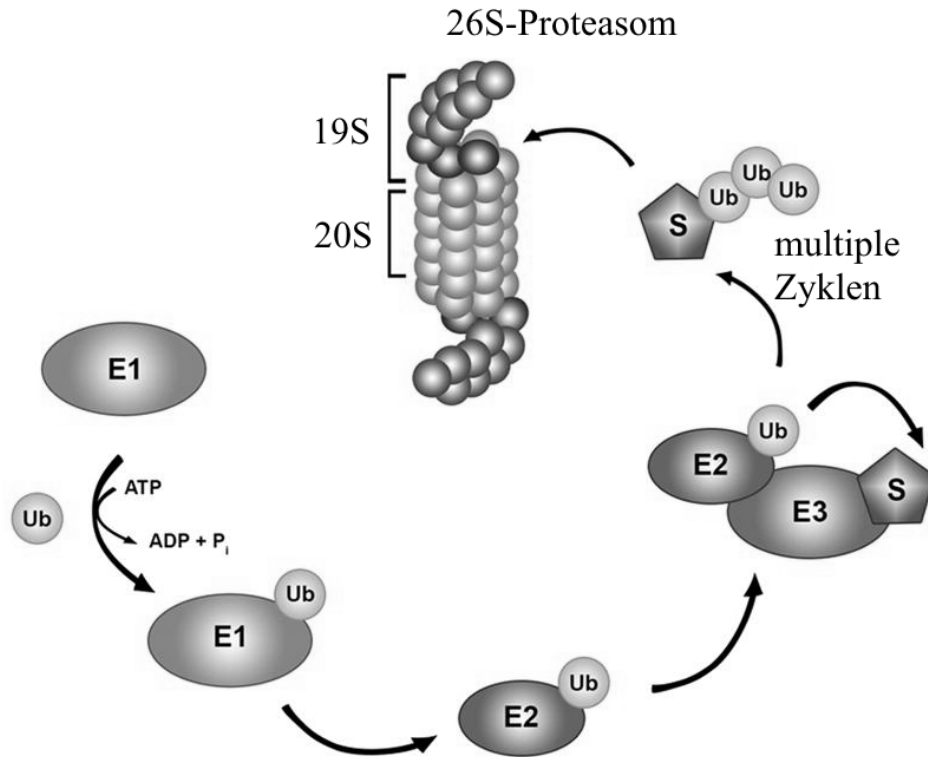
#### **1.2.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System**

Ein weiterer Degradierungs-Mechanismus innerhalb der Proteostase ist das UPS. Es stellt das primäre System für die selektive Degradierung im Nukleus sowie im Cytosol der eukaryotischen Zelle dar und vermittelt den Abbau kurzlebiger regulatorischer Proteine sowie die Entfernung beschädigter löslicher Proteine [110]. Es ist ein sorgfältig und präzise terminierter Mechanismus mit einer entscheidenden Bedeutung für die Aufrechterhaltung der korrekten Konzentration vieler regulatorischer Proteine, die in den Zellzyklus, die Funktionalität von Stammzellen, die Entwicklung und Signaltransduktion sowie die metabolische Aktivität involviert sind. Auch Proteine, die Funktionen innerhalb der Transkription sowie der DNA-Reparatur übernehmen und den Prozess der Apoptose oder auch inflammatorische Prozesse vermitteln, werden durch das UPS in ihrer Menge reguliert [52, 111]. Aufgrund der breiten Vielfalt an durch das UPS regulierten Prozessen können Veränderungen in diesem System zu der Entwicklung verschiedenster Pathologien führen [111]. Auch die Hyperglykämie sowie oxidativer Stress wurden als Faktoren, welche das UPS modulieren, beschrieben [112].

Die Degradierung eines Proteins durch das UPS beinhaltet zwei Schritte: in einem ersten Schritt wird das Protein-Substrat durch eine kovalente Bindung multipler Ubiquitin-Moleküle markiert, um in einem nächsten Schritt durch das 26S-Proteasom erkannt und degradiert zu werden [111]. Ubiquitin ist ein evolutionär konserviertes Polypeptid bestehend aus 76 Aminosäuren, das in der koordinierten Wirkung einer Kaskade aus drei unterschiedlichen Enzymen, einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1), einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) sowie einer Ubiquitin-Ligase (E3), an das Protein-Substrat

gebunden werden kann [52]. Ubiquitin wird dabei über eine kovalente Isopeptidbindung zwischen seinem C-terminalen Lysin-Rest und einer  $\epsilon$ -Aminogruppe eines internalen Lysin-Rests des Protein-Substrats auf dieses übertragen [111]. Dafür wird Ubiquitin zunächst unter ATP-Verbrauch über eine energiereiche Thioesterbindung an seinem C-terminalen Glycinrest von E1 gebunden, um sogleich auf E2 übertragen zu werden. E3 vermittelt die Isopeptidbindung zwischen Ubiquitin und dem Protein-Substrat [52]. Dieser Prozess wird mehrfach wiederholt, denn für die proteasomale Degradierung ist eine Poly-Ubiquitinierung über die Bindung eines jeweils nächsten Ubiquitin-Moleküls an einen Lysin-Rest des bereits gebundenen Ubiquitins nötig [113]. Das 26S-Proteasom ist eine multikatalytische Protease [111], die im Zellkern und Cytoplasma einer jeden eukaryotischen Zelle exprimiert wird [114] und den Abbau der poly-ubiquitinierten Proteine zu kleinen Peptiden katalysiert [111]. Es besteht aus einer 20S- und ein bis zwei 19S-Untereinheiten, wobei erstere das katalytische Zentrum darstellt. Die beiden regulatorischen 19S-Untereinheiten, auch oft als „Boden“ und „Deckel“ bezeichnet, da sie beide Enden des katalytischen Zentrums begrenzen, sind für die Erkennung und Bindung der Poly-Ubiquitin-Kette sowie deren Abspaltung vom Protein-Substrat zuständig. Das Substrat wird denaturiert und an die katalytische 20S-Untereinheit weitergegeben [114]. Die 20S-Untereinheit weist eine zylindrische Form auf, bestehend aus zwei äußeren  $\alpha$ - und zwei inneren  $\beta$ -Ringen, die jeweils wiederum aus 7 Untereinheiten aufgebaut sind [115]. Die  $\alpha$ -Ringe komplexieren jeweils mit einer 19S-Untereinheit, um einen schmalen Kanal zu formen, der ausschließlich von denaturierten Proteinen passierbar ist [114]. Das katalytische Zentrum wird durch die beiden  $\beta$ -Ringe gebildet, wobei die 3 Untereinheiten  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , und  $\beta_5$  eines jeden Ringes unterschiedliche katalytische Aktivitäten aufweisen, die sich durch ihre Substrat-Spezifität unterscheiden. Dementsprechend werden sie als Chymotrypsin-artig, Trypsin-artig und Caspase-artig beschrieben [115]. Das Protein-Substrat wird durch die 20S-Untereinheit in kurze Peptide gespalten, die anschließend freigegeben werden [114]. Ubiquitin wird ebenfalls freigesetzt und kann erneut für die Ubiquitinierung verwendet werden [111].

Die Selektion der UPS-Substrate wird durch die E3-Spezifität vermittelt. E3-Ligasen bilden eine große Protein-Familie, wobei die einzelnen Ligasen eine streng limitierte Substrat-Spezifität aufweisen und jeweils nur ein oder wenige Peptide erkennen [111, 114]. Diese hohe Spezifität ist essentiell, um eine streng regulierte und koordinierte Degradierung durch das UPS zu gewährleisten [114].



**Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Signalwegs**

Ub: Ubiquitin; E1: Ubiquitin-aktivierendes Enzym; E2: Ubiquitin-konjugierendes Enzym; E3: Ubiquitin-Ligase; S: Substrat. Modifiziert nach Üstün und Börnke, 2014 [116].

## 1.3 Das Polyphenol Quercetin

### 1.3.1 Polyphenole

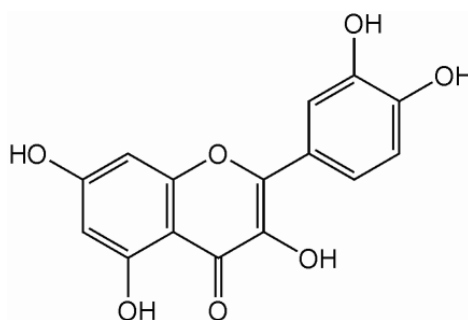
Als sekundäre Pflanzenmetabolite werden eine heterogene Klasse von Molekülen mit mehr als 10000 unterschiedlichen Vertretern bezeichnet, die sich in der Natur und somit auch in unserer Nahrung wiederfinden [117]. Diese Komponenten dienen der Pflanze nicht der Deckung des Bedarfs an Energie und biosynthetischen Produkten, sondern sind hauptsächlich in Schutzsysteme der Pflanze gegenüber verschiedensten umweltbedingten Stresskondition involviert [118]. Polyphenole sind die größte und am besten erforschteste Gruppe der sekundären Pflanzenmetabolite. Sie sind reichlich in pflanzlichen Lebensmitteln vorhanden und machen den Hauptteil ihrer Antioxidantien aus. Mehrere hundert verschiedene Polyphenole wurden identifiziert [119]. Äpfel, Weintrauben oder verschiedene Beerensorten enthalten 200 bis 300 mg Polyphenole pro 100 g Frischgewicht. Durch den Konsum eines Glas Rotweins oder einer Tasse Tee beträgt die Aufnahme etwa 100 mg. Getreide, Schokolade und Gemüse tragen ebenso zur täglichen Aufnahme von Polyphenolen bei, die bei einer ausgewogenen Ernährung etwa 1 g pro Tag entspricht [120]. Polyphenole werden anhand der Anzahl ihrer Phenolringe und der strukturellen Elemente, die diese miteinander verbinden, in unterschiedliche Subklassen eingeteilt [119]. Die Flavonoide stellen dabei eine der Hauptklassen dar [121]. Sie werden strukturell durch das Vorhandensein von 2 aromatischen Ringen und einem O-heterozyklischen Ring charakterisiert. Der O-heterozyklische Ring ist durch eine C-C-Brücke mit einem aromatischen Ringe verknüpft [122]. Die Flavonoide werden unterteilt in Flavone, Flavonole, Flavanole (Catechine), Flavanone, Isoflavone und Anthocyanine. Einige der am häufigsten vorkommenden Flavonoide sind Quercetin (Abbildung 1.7), ein reichlich in Zwiebeln, Äpfeln und Tee vorhandenes Flavonol, Catechin, ein Flavanol, das in Tee und verschiedenen Früchten vorkommt, Hesperitin, ein Flavanon aus Zitrusfrüchten, Cyanidin, ein Anthocyan mit farbgebenden Funktionen in vielen roten Früchten, Daidzein, das wichtigste Isoflavon der Sojabohne, sowie verschiedene Catechin-Oligomere, die für den adstringierenden oder bitteren Charakter in pflanzlichen Lebensmitteln verantwortlich sind [120]. In Pflanzen üben Flavonoide verschiedene, evolutionär verankerte Funktionen aus. Beispielsweise regulieren sie die Bildung von Auxinen, den Regulatoren des Wachstums und der Differenzierung. Sie wirken antifungal sowie bakterizid und stellen einen gewissen Fraßschutz dar, denn sie sind für die organoleptischen Eigenschaften der Pflanze



verantwortlich. Sie dienen darüber hinaus der Farbgebung von bestimmten Pflanzen, welche unter anderem im Zusammenhang mit dem Bestäubungsverhalten von Insekten steht. In pflanzlichen Lebensmitteln sind die Flavonoide ebenfalls für die Farbgebung, aber auch für die Textur und den Geschmack ausschlaggebend [123]. Neben ihrer Funktion als sekundärer Pflanzenmetabolit wird den Polyphenolen ein Potential in der Reduzierung, der Prävention sowie der Therapie chronischer Erkrankungen zugesprochen, zu denen beispielsweise Krebs, kardiovaskuläre Erkrankungen, Adipositas, Diabetes sowie neurologische Dysfunktionen gehören [120]. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit Quercetin, das am häufigsten vorkommende Polyphenol in pflanzlichen Lebensmitteln und Getränken, fokussiert.

### 1.3.2 Quercetin

Quercetin (3,3',4,5,7-Pentahydroxyflavon) weist die charakteristische Form eines Flavonoids auf (Abbildung 1.7) [124]. In der Pflanze existiert es ausschließlich als Aglykon [123–125].



**Abbildung 1.7: Chemische Strukturformel des Quercetins**

Neben Zwiebeln, Äpfeln und Tee sind weitere Quellen Kopfsalat, Chillischoten, Aroniabeeren, Preiselbeeren, Brokkoli und Tomaten [125]. Die durchschnittliche Aufnahme von Quercetin beträgt 5 bis 40 mg pro Tag, wobei eine Erhöhung auf 200 bis 500 mg pro Tag ernährungsabhängig möglich ist [117].

Die Mechanismen, durch die Quercetin als potentielle Substanz mit verschiedensten Gesundheitsnutzen definiert wird, sind sehr unterschiedlich. Wie Polyphenole allgemein [126] wird auch Quercetin als hoch wirksames Antioxidans beschrieben. Innerhalb der Flavonoide ist Quercetin der potenteste Scavenger von ROS und reaktiven

Stickstoffspezies (RNS; engl. *reactive nitrogen species*) *in vitro* [127]. Der antioxidative Effekt konnte auch *in vivo* gezeigt werden [128]. Darüber hinaus wird Quercetin als stark antiinflammatorisch, antifibrotisch, antikoagulativ, antibakteriell, anthiatherogen, antihypertensiv und antiproliferativ sowie proapoptotisch beschrieben [127]. Aufgrund dieser Eigenschaften wird das Polyphenol mit präventiven und therapeutischen Effekten im Hinblick auf verschiedene Erkrankungen diskutiert. Quercetin wird zum Beispiel als antikarzinogen beschrieben, denn es kann die Induktion des Zelltods oder des Zellzyklus-Arrestes durch verschiedene Prozesse, welche die Herunterregulierung selektiver Onkogene sowie die Hochregulierung verschiedener Tumorsuppressorgene involvieren, vermitteln und dadurch die Elimination von Krebszellen herbeiführen [117, 129].

Unterschiedliche Studien weisen auf protektive Effekte von Quercetin im Rahmen diabetischer Komplikationen hin. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Quercetin in verschiedenen diabetischen Tier-Modellen zu einer Senkung der nüchternen und postprandialen Hyperglykämie und dadurch zu einer Hemmung der  $\alpha$ -Glukosidase führte [130]. In einer Studie mit  $\beta$ -Zellen des Pankreas wurde die durch Glukose stimulierte Insulin-Sekretion durch Quercetin verbessert, was zudem im Zusammenhang mit einer Veränderung der Expressionsmuster verschiedener Schlüssel-Gene der  $\beta$ -Zell Funktion sowie regulatorischer Gene, unter anderem Chaperone kodierende, stand [131]. In einer weiteren Zellkultur-Studie verminderte Quercetin verschiedene Parameter, die mit Glukose-induzierten Schädigungen assoziiert werden, wie zum Beispiel die ROS-Spiegel oder die Inhibierung von eNOS und der NO-Produktion, in Abhängigkeit von dem Sirtuin Sirt1 [132]. In einem diabetischen Tier-Modell wurden die antiinflammatorischen Eigenschaften des Quercetin anhand reduzierter Entzündungsparameter nachgewiesen, begleitet von einer Verminderung des durch Glukose erhöhten Blutdrucks, der Glukose-induzierten Vasokonstriktion sowie der Diabetes-assoziierten, adventitialen Leukozyten-Infiltration und der endothelialen Pyknose [133]. Auch in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) konnte gezeigt werden, dass Quercetin (Publikation 1; Appendix B.1), verschiedene Polyphenol-reiche Pflanzenextrakte (Publikation 2; Appendix B.2) sowie ein mit Catechinen angereicherter Grüntee-Extrakt (Publikation 3; Appendix B.3) Glukose-induzierte Schädigungen vermindern, wodurch die Bedeutung des Nematoden als Modellorganismus für die Untersuchungen solcher Schädigungen (vergleiche Abschnitt 1.4.4) sowie deren Prävention durch Quercetin bereits dargestellt wurde.

## 1.4 *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

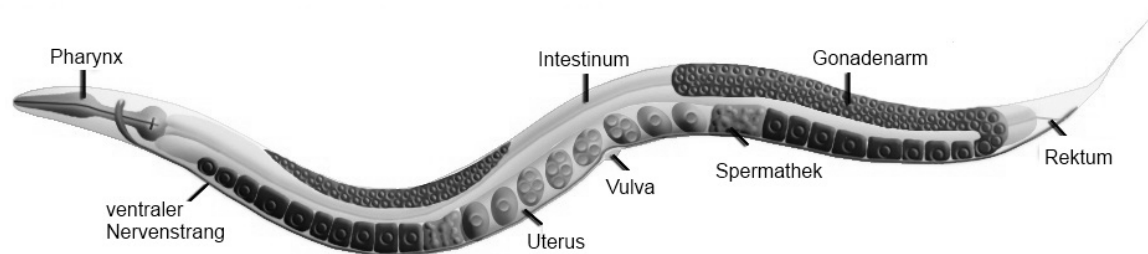
*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) ist ein Fadenwurm aus dem Phylum Nematoda, die eine der arten- und individuenreichsten Metazoen-Gruppe darstellt [134]. Nematoden sind überwiegend freilebend in terrestrischen und aquatischen Gebieten, wobei auch Arten existieren, die parasitäre Eigenschaften aufweisen und Pflanzen, Tiere und Menschen befallen [135]. *C. elegans* wurde Mitte der 60er Jahre von dem Biologen Sydney Brenner in Cambridge/England als ein im Erdboden freilebender Nematode, der sich hauptsächlich von *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien ernährt, entdeckt [136]. Er ist ein Vertreter der Klasse der *Secernentea* und der Familie der *Rhabditidae* [137].

Die Etablierung von *C. elegans* als Modellorganismus resultierte aus der Vorstellung Sydney Brenners einen weniger komplexen Organismus als Forschungsmodell der Organentwicklung und des programmierten Zelltods zur Verfügung zu haben als den der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* [136]. *C. elegans* existiert als Hermaphrodit (XX) und als männliches Tier (X0) [138]. Der adulte Hermaphrodit besteht aus 959 somatischen Zellen, die seinen Organismus in einem verhältnismäßig strukturell einfachen Aufbau organisieren, der dennoch spezialisierte Zellen und Gewebe beherbergt. Besonders die Einfachheit des aus 302 Neuronen organisierten Nervensystems [139] hat dazu beigetragen, dass *C. elegans* von Brenner als biologisches Forschungsmodell etabliert wurde [136]. Heute wird der Nematode vor allem in den Bereichen Zellbiologie, Genomik, Neurowissenschaft und Alterungsforschung eingesetzt [138]. Neben seinem einfachen Körperaufbau bringt *C. elegans* weitere Vorteile mit sich, die ihn als Modellorganismus attraktiv machen. Dazu gehört der kurze Lebenszyklus, eine kurze Generationszeit mit einer hohen Anzahl an Nachkommen, die einfache Kultivierung unter Laborbedingungen und die geringe Größe (etwa 1 mm) [138, 139]. Die selbstfertile Eigenschaft der Hermaphroditen macht eine Generierung homozygoter Populationen einfach durchführbar [138]. Die männlichen Tiere sind für die Erzeugung genetischer Kreuzungen einsetzbar [136, 140]. Darüber hinaus besteht durch die Transparenz des Nematoden in jedem Lebenszyklus die Möglichkeit mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen oder Reportergenen zelluläre Ereignisse *in vivo* zu untersuchen [139]. Auch das seit 1998 vollständig sequenzierte Genom von *C. elegans* [141] definiert einen experimentellen Nutzen genetischer Tiermodelle, denn es weist für eine Vielzahl der menschlichen Gene, die mit der Entstehung verschiedener Erkrankungen assoziiert werden, homologe Sequenzen auf [142]. Die physische Manipulierbarkeit von *C. elegans*, beispielsweise durch die RNA-

Interferenz (RNAi) [143], und der Einsatz von Mutanten sowie von transgenen Stämmen erlaubt dabei die gezielte Untersuchung von Gen-Funktionen. Unter Laborbedingungen ist die Kultivierung von *C. elegans* auf Agarplatten oder in Flüssigmedium mit *E. coli* als Nahrungsquelle einfach durchführbar [144]. Eine Langzeitlagerung ist ebenfalls möglich, da *C. elegans* eingefroren und wieder aufgetaut werden kann [136, 144].

### 1.4.1 Anatomie und Physiologie

*C. elegans* zeichnet sich durch die für Nematoden charakteristische Körperform aus (siehe Abbildung 1.8). Der unsegmentierte, zylindrische Körper, der sich zu den Seiten hin verjüngt, besteht aus einer äußeren und einer inneren Röhre, die durch den pseudocoleomischen Raum voneinander getrennt sind. Die äußere Röhre, fungierend als Körperwand, setzt sich zusammen aus der Kutikula und der Hypodermis, an die ein exkretorisches System sowie Neuronen und die Muskulatur der Körperwand anschließen. Die innere Röhre beherbergt das Verdauungssystem, bestehend aus Pharynx und Intestinaltrakt, und im adulten Nematoden das Reproduktionssystem [138, 139]. Durch den hydrostatischen Druck, aufgebaut durch das Pseudocoleum, wird das Hydroskelett stabil gehalten [138].



**Abbildung 1.8: Anatomie eines *C. elegans* Hermaphroditen im Längsschnitt**

Anatomie eines *C. elegans* Hermaphroditen modifiziert nach Altun und Hall, 2009 [138].

Die kollagene Kutikula von *C. elegans* hält die Körperform aufrecht und grenzt den Nematoden von der Umwelt ab. Sie fungiert als eine Art äußeres Skelett, wodurch der Nematode seine Motilität erlangt. Sezerniert wird die Kutikula von den außen aufliegenden Epithelzellen der Hypodermis und der Saumzellen sowie von den interfaszialen Zellen, welche die vier Hauptöffnungen der Kutikula (Pharynx, Anus, Vulva und exkretorische Pore) auskleiden [145].

*C. elegans* besitzt als adulter Hermaphrodit 302 Neuronen, die zwei spezialisierte und voneinander unabhängige Nervensysteme organisieren: ein aus 282 Neuronen bestehendes somatisches Nervensystem sowie ein kleines pharyngales Nervensystem aus 20 Neuronen [146–148]. Innerhalb des somatischen Nervensystems sind die Neuronen sowie die von ihnen gesteuerten Prozesse zwischen Hypodermis und Körperwandmuskulatur platziert. Die Hypodermis und das somatische Nervensystem teilen sich dabei eine Basallamina, die beide von der Muskulatur isoliert. Die pharyngalen Neuronen hingegen sind nicht durch eine Basallamina von der Muskulatur getrennt und liegen direkt auf den entsprechenden Zielmuskeln auf [146]. Insgesamt sind die Zellkörper der meisten Neuronen in Ganglien im Kopf- und Schwanzbereich von *C. elegans* organisiert und werden von 56 neuronalen Stützzellen umgeben [149]. Die Innervation der quergestreiften Körperwandmuskulatur ist die Hauptaufgabe des Nervensystems von *C. elegans* [139]. Sie wird als somatisches Muskelsystem bezeichnet und verläuft in zwei dorsalen und zwei ventralen Quadranten über die gesamte Körperlänge [148], wodurch das sinusoidale Bewegungsmuster des Nematoden entsteht [139]. Kleinere, nicht gestreifte Muskelpartien befinden sich im Pharynx, in der Region der Vulva, des Darms und des Rektums und bilden das glatte Muskelsystem. Die Muskelkontraktion wird hauptsächlich durch die Impulsübertragung von Nerven auf die Muskelzellen ausgelöst, wodurch die koordinierte Bewegung der Muskeln möglich ist [150].

Die Nahrungsaufnahme von *C. elegans* erfolgt über den in zwei Bulbi aufgeteilten Pharynx, der ein nahezu autonomes Organ mit eigenem neuronalen System, Muskulatur und Epithel darstellt. Das Lumen des Pharynx geht in das intestinale Lumen über. Die aufgenommene Nahrung wird im hinteren Bereich des Pharynx konzentriert, durch ein Mahlwerk, den sogenannten *grinder*, fein zerrieben und über ein pharyngales Ventil in das Intestinum transportiert [138]. Dieses besteht aus 20 epithelialen Zellen, die einen großen Zellkern, eine hohe Dichte an Mitochondrien, membrangebundene Vesikel und Vakuolen sowie ein ausgedehntes raues ER beherbergen. In ihrer Anordnung formen die epithelialen Zellen eine Röhre um das zentrale Lumen [151]. Die apikale Seite dieser Zellen trägt eine Vielzahl an Mikrovilli, die einen Bürstensaum bilden. Der intestinale Inhalt wird über ein Ventil, das den Darm mit Rektum und Anus verbindet, weitergeleitet und so letztendlich ausgeschieden [138]. Die Hauptfunktion der intestinalen Zellen ist die Sekretion von Verdauungsenzymen in das Lumen sowie die Absorption von Nährstoffen aus diesem. Darüber hinaus scheint das Intestinum eine Art Speicherorgan darzustellen, denn es verfügt

über unterschiedliche Speichergranula [151]. Die zentrale Bedeutung des Intestinums für den Metabolismus von *C. elegans* wird deutlich durch seine Vielzahl an Funktionen, die in höheren Organismen von unterschiedlichen Organen ausgeführt werden [151]. Dazu gehören neben der Verdauung der Nahrung und der Nährstoffabsorption zum Beispiel auch die Initiierung eines angeborenen Immunsystems [152], die Nährstoffversorgung von Keimzellen [153] sowie die Regulation des Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus [151, 154].

Das Reproduktionssystem des *C. elegans* Hermaphroditen produziert reife Gameten und stellt den Ort der Fertilisation und Eiablage dar [155]. Es besteht aus somatischen Gonaden, Keimbahnen und einem Eiablageapparat. Die Gonaden formen mit der darunterliegenden Keimbahn zwei symmetrische, U-förmige Gonadenarme, die jeweils durch eine Spermathek mit einem gemeinsamen Uterus verbunden sind und in diesen münden [138, 155]. Die somatischen Gonaden setzen sich zusammen aus einer am distalen Ende platzierten, speziellen somatischen Zelle (DTC; engl. *distal tip cell*), der Gonadenscheide, der Spermathek, der Spermathek-Uterus-Klappe sowie dem Uterus, der gleichzeitig Bestandteil des Eiablageapparates ist [155, 156]. Dieser wiederum besteht aus Uterus und uteriner Muskulatur, Vulva und vulvaler Muskulatur sowie einem Neutropil, das durch die Neuronen, welche die Eiablage kontrollieren, geformt wird [157].

#### **1.4.1.1 Männliche *C. elegans* Nematoden**

Männliche *C. elegans* Nematoden unterscheiden sich von den Hermaphroditen in ihrer Morphologie, in einigen Aspekten der Anatomie sowie in ihrem Verhalten [158]. Mit Hilfe eines Stereomikroskops lassen sich die männlichen Nematoden deutlich von den Hermaphroditen unterscheiden [158]. Sie weisen einen vergleichsweise schlanken Körper, transparent bis weiße Gonaden und einen fächerartig (*peloderan*) geformten Schwanzbereich auf. Letzterer beherbergt die kopulative Vorrichtung des Nematoden [158]. Die männlichen Nematoden haben einen kleineren Körperumfang und eine geringere Körperlänge als die Hermaphroditen [159], wobei dies hauptsächlich durch das Fehlen voluminöser Gonadenarme bedingt wird [158]. Ein weiterer Unterschied besteht in der Anzahl der somatischen Zellen. Der männliche *C. elegans* Nematode beherbergt 1031, wohingegen der Hermaphrodit 959 somatische Zellkerne aufweist [139, 159].

Das Reproduktionssystem eines männlichen *C. elegans* Nematoden wird analog zu dem des Hermaphroditen in eine somatische Gonade und die entsprechenden innervierenden

somatischen Neuronen, die Keimbahn und das Proctodaeum unterteilt. Zusammen mit der Keimbahn bildet die Gonade einen J-förmigen Arm, der mit der Kloake des Proctodaeums verbunden ist [160]. Die Keimbahn des männlichen Nematoden produziert ausschließlich männliche Keimzellen, wobei die aus der Gametogenese hervorgehenden Spermatiden in einer Samenblase gespeichert werden [161–163]. Die Spermiogenese findet im Anschluss an die Kopulation in der Spermathek des Hermaphroditen statt [164].

### 1.4.2 Fertilisation

Die Keimbahn des *C. elegans* Hermaphroditen produziert Spermatozoen und Oocyten. Die Oogenese findet im adulten Stadium statt. Die Spermatozoen hingegen werden im L4-Stadium gebildet und in der Spermathek gespeichert, um der Fertilisation der Oocyten des adulten Hermaphroditen zu dienen [165, 166]. Die am distalen Ende eines jeden somatischen Gonadenarms befindliche DTC reguliert Mitose und Meiose in der Keimbahn, beginnend mit der mitotischen Proliferation der angrenzenden Keimbahn-Stammzellen [162, 167]. Eine Abnahme des DTC-Signals lässt die Keimzellen in die Meiose eintreten [162]. Entsprechend der distal-proximalen Polarität der Keimbahn des Hermaphroditen [165] befinden sich somit in proximaler Richtung meiotische Zellen, die zu charakteristischen Zeiten zu Spermatozoen oder Oocyten differenzieren [166]. Eine Keimbahn produziert etwa 150 Spermatiden [168], die sich im proximalen Ende des Gonadenarms konzentrieren und bei der ersten Ovulation in die Spermathek transportiert werden. Dort durchlaufen sie die Spermiogenese und reifen zu Spermatozoen [169, 170]. Die Reifung der Oocyten findet ebenfalls in direkter Nähe der Spermathek statt und wird hormonell durch die in der Spermathek befindlichen Spermatozoen stimuliert. Die Oocyten-Reifung wiederum initiiert die Kontraktion der Gonadenscheide [171] und die gleichzeitige Dilatation der Spermathek, sodass die reife Oocyte aufgenommen werden kann [165]. Meiotische Reifung, Ovulation und Fertilisation sind somit zeitlich gekoppelt. Reife Spermatozoen lösen hormongesteuert die meiotische Reifung der Oocyten aus. Die reifende Oocyte wiederum bewirkt eigens ihre Ovulation und ermöglicht somit letztendlich die Fertilisation [166, 166].

Beide *C. elegans* Geschlechter, die selbstfertilisierenden Hermaphroditen und die Männchen, sind diploid für die fünf autosomalen Chromosomen [172]. Der Hermaphrodit unterscheidet sich jedoch von dem männlichen Nematoden durch seine zwei

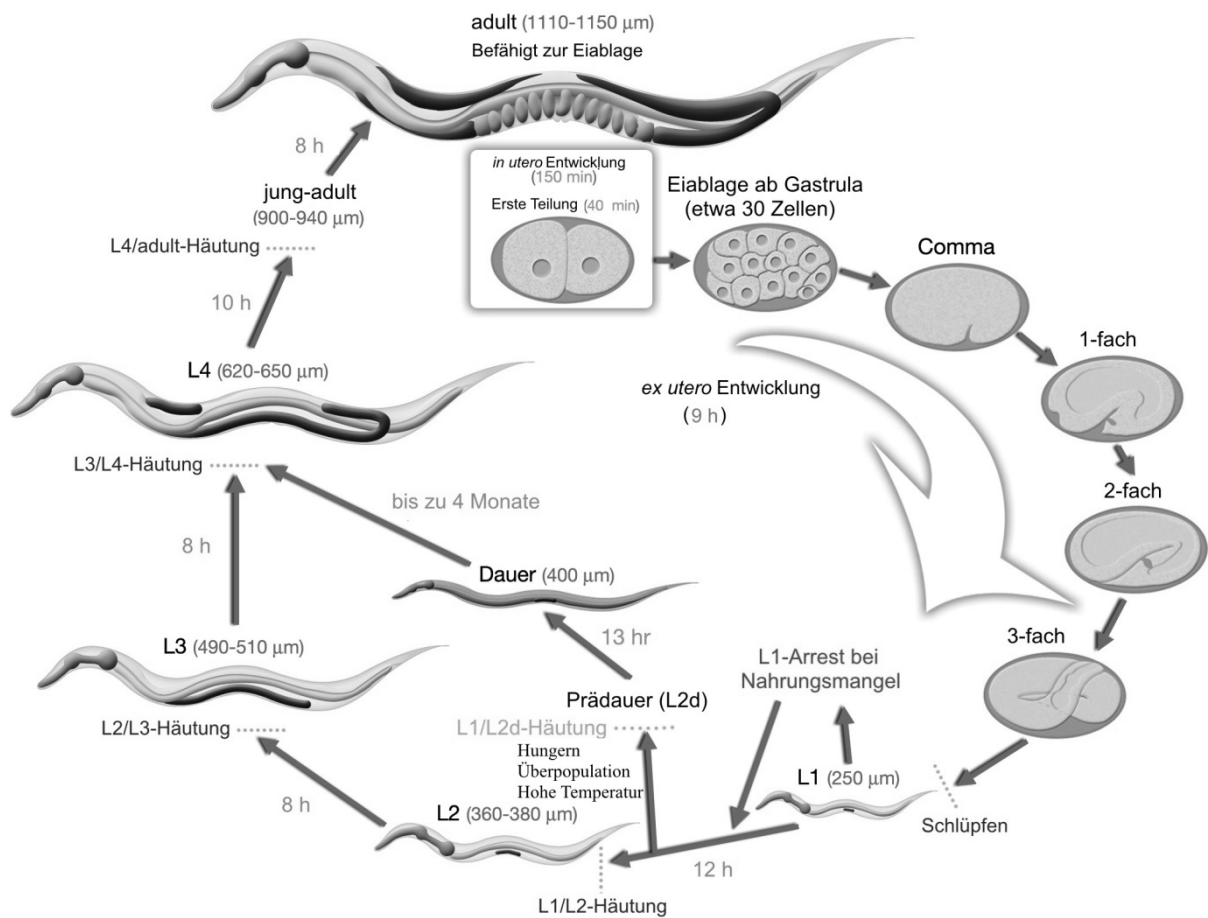
X-Chromosomen (5AA;XX). Die männlichen Nematoden (5AA;X0) entstehen durch eine fehlerhafte X-Chromosomen Segregation (*non-disjunction*), einem spontanen Verteilungsfehler der X-Chromosomen während der Meiose in der Keimbahn des Hermaphroditen. Diese Fehlverteilung führt zum Verlust eines X-Chromosoms, wodurch der Genotyp der männlichen Nematoden als X0 bezeichnet wird [158, 172]. Die Fusion eines sogenannten „Null-X-Gameten“ mit einem X-Chromosom-tragenden Gameten in der Keimbahn des Hermaphroditen findet sporadisch statt. Infolgedessen treten männliche *C. elegans* Nematoden lediglich mit einer Häufigkeit von etwa 0,1 % bis 0,2 % auf [164, 173]. Durch die Kopulation kann die Anzahl der männlichen Nachkommen auf etwa 50 % [138] ansteigen, denn die männlichen Nematoden tragen „Null-X-Gameten“ in gleicher Häufigkeit wie X-Chromosom-tragende Gameten [164]. Zudem werden die Spermatozoen des Männchens für die Fertilisation präferiert genutzt [164]. Männliche Spermatozoen weisen größere Pseudopodien auf und übersteigen die des Hermaphroditen in ihrer gesamten Größe [174, 175]. Diese Eigenschaft scheint einer der Hauptgründe für die Präferenz der männlichen Spermatozoen darzustellen, denn die dadurch vergleichsweise gesteigerte Motilität führt dazu, dass die Spermatozoen des Hermaphroditen aus der Spermathek verdrängt werden. Die tatsächliche Auskreuzung eines männlichen *C. elegans* Nematoden mit einem Hermaphroditen ist somit bei erfolgreicher Verpaarung durch diese Präferenz sichergestellt [175].

### 1.4.3 Lebenszyklus von *C. elegans*

Der Lebenszyklus von *C. elegans* lässt sich in die Embryogenese, vier Larvenstadien (L1 bis L4) und das adulte Stadium unterteilen [138]. Eine schematische Darstellung findet sich in Abbildung 1.9. Unabhängig davon, ob die Oocyte durch die Spermathek des Hermaphroditen oder durch Kopulation mit einem männlichen Nematoden befruchtet wurde [139], beginnt die Embryogenese *in utero* [138, 139]. Sie ist in eine Proliferationsphase und eine Phase der Organogenese/Morphogenese unterteilt [138, 153]. Die Proliferationsphase ist durch die Zellteilung einer einzelnen Zelle bis hin zu 550 überwiegend undifferenzierten Zellen gekennzeichnet. Die Eiablage erfolgt sobald der Embryo ein 30-Zell-Stadium erreicht hat. Am Ende der Proliferationsphase, die sich *extra uterin* fortsetzt, ist der Embryo ein Sphäroid, dessen Zellen in verschiedenen Keimschichten organisiert sind. Während der Organogenese/Morphogenese findet eine terminale Differenzierung ohne weitere Teilung der Zellen statt. Der Embryo verlängert



sich um das Dreifache und erhält seine endgültige Form mit differenzierten Geweben und Organen. Etwa 800 min nach der ersten Zellteilung schlüpft der Embryo [138].



**Abbildung 1.9: Lebenszyklus von *C. elegans* bei 22 °C**

Lebenszyklus von *C. elegans* bei 22 °C modifiziert nach Altun und Hall, 2009 [138].

Die postembryonale Entwicklung von *C. elegans* beginnt bei einem ausreichenden Nahrungsangebot 3 h nach dem Schlüpfen und lässt sich in vier Stadien einteilen [176]. Die L1-Larven entwickeln sich in Gegenwart von günstigen Umweltbedingungen über die Stadien L2 bis L4 bis hin zu adulten Tieren, wobei das Ende eines jeden Larvenstadiums durch einen Häutungsprozess gekennzeichnet ist [138]. Das Zellteilungsmuster ist dabei zeitlich sowie räumlich invariant zwischen den Individuen [148]. Unter Nahrungsmangel stellt die L1-Larve die Entwicklung vollständig ein und verbleibt bis zu zehn Tage in dieser Entwicklungspause [177]. Durch die Normalisierung des Nahrungsangebots kann dieser Zustand unterbrochen und eine normale Weiterentwicklung herbeigeführt werden [178]. Befindet sich die Larve vor Eintritt in das L2-Stadium in Nahrungsmangel, Temperaturstress oder in Überpopulation, geht der Entwicklungsprozess in das sogenannte

Dauer-Stadium über [179, 180]. Dabei wird die Nahrungsaufnahme vollständig eingestellt und die Fortbewegung stark reduziert. Durch Verbesserung der Umweltbedingungen wird das Dauer-Stadium beendet. Die Larve beginnt mit der Nahrungsaufnahme und nach etwa zehn Stunden findet die Häutung, die den Übergang zum L4-Stadium herbeiführt, statt. Larven, die das Dauer-Stadium durchlaufen, umgehen somit das L3-Stadium. Die post-dauer Lebensspanne wird nicht durch die Länge des Dauer-Stadiums beeinflusst, das deswegen als Nicht-Alterungsstadium bezeichnet wird [138]. Ohne den Eintritt in das Dauer-Stadium ist etwa 45 bis 50 Stunden nach dem Schlüpfen und in Gegenwart einer Temperatur von 22 °C bis 25 °C der jung-adulte Hermaphrodit vollständig entwickelt und beendet seinen dreitägigen Reproduktionszyklus [181]. Die erste Eiablage findet statt, wobei der adulte Nematode etwa vier Tage lang Oocyten produziert. Der selbstfertile Hermaphrodit produziert etwa 300 genetisch identische Nachkommen. Die Anzahl der Spermatozoen stellt dabei den limitierenden Faktor dar und so steigt die Anzahl der Nachkommen durch die Kopulation mit einem männlichen Nematoden auf etwa 1000 [172] bis 1400 an [138] (vergleiche Abschnitt 1.4.2). Unter standardisierten Laborbedingungen lebt der Hermaphrodit nach seiner reproduktiven Phase noch etwa 10 bis 15 Tage.

#### **1.4.4 Modellorganismus für die Untersuchung Glukose-induzierter Schädigungen**

Die Relevanz von *C. elegans* als Modellorganismus für die Untersuchung Glukose-induzierter Schädigungen wurde mehrfach gezeigt. So stellten Schlotterer *et al.* eine Glukose-induzierte Lebenszeitverkürzung in dem Nematoden dar, die von einer erhöhten ROS-Produktion und einer gesteigerten AGEs-Bildung begleitet wurde [182]. Lee *et al.* zeigten eine verkürzte Lebensspanne des Nematoden nach Glukose-Applikation, die mit einer Glukose-abhängigen Inhibierung der Transkriptionsfaktoren DAF-16 (*abnormal dauer formation*), der innerhalb des Insulin/*insulin like growth factor* (IGF)-1 Signalwegs eine Rolle spielt, und HSF-1 einherging. Beide werden als lebensverlängernde Faktoren beschrieben [183]. Fitzenberger *et al.* führten Untersuchungen zur Glukosetoxizität in *C. elegans* mit dem Stamm TK22 durch. Sie zeigten eine Lebenszeitverkürzung des Nematoden, die unabhängig von der Veränderung klassischer Hyperglykämie-Marker, wie ROS und AGEs war. Stattdessen wurden Glukose-induzierte Schädigungen des Proteostase-Netzwerks, insbesondere des Proteasoms, postuliert [184]. Auch in der

vorliegenden Arbeit wurde der *C. elegans* Stamm TK22 mit dem Genotyp *mev-1 (kn-1)* als Diabetes-relevantes Modell herangezogen. Die *C. elegans mev-1* Mutante TK22 wurde im Jahr 1990 von Naoaki Ishii unter der Verwendung von Ethylmethansulfonat (EMS) hergestellt [185]. Das *mev-1 (abnormal methyl viologen sensitivity)* Gen kodiert die Cytochrom-b-Untereinheit des Enzyms Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase, das den Komplex II der mitochondrialen ETC darstellt [186]. Die in dieser Mutante vorhandene Punktmutation in *mev-1* [186] resultiert in einer vermehrten Produktion von ROS, einer Hypersensitivität gegenüber oxidativem Stress sowie einer vierfach erhöhten Sensitivität gegenüber Methylviologen im Vergleich zum Wildtyp. Die Lebensspanne sowie die Nachkommenschaft sind ebenfalls verkürzt beziehungsweise vermindert [185]. Die Produktion von  $O_2^{\bullet}$  innerhalb der mitochondrialen ETC findet unter physiologischen Konditionen hauptsächlich an Komplex I und III statt [17]. In *C. elegans* TK22 scheint sich dieser Prozess jedoch auf Komplex II zu konzentrieren [185, 186]. Die ROS-Produktion an Komplex II konnte ebenfalls in einer Insulin-resistenten Zellkultur-Linie gezeigt werden [17] und wird im Zusammenhang mit ischämischen Reperfusionsschäden diskutiert [187]. Generell wird eine erhöhte ROS-Produktion mit der Schädigung verschiedenster zellulärer Komponenten assoziiert und gilt als Mediator von lebensstil-abhängigen Erkrankungen, wie Diabetes und Arteriosklerose, aber auch Alterungs-abhängigen Krankheitsbildern, wie neurodegenerative Erkrankungen und bestimmte Arten von Krebs [188].

Die im *C. elegans* Wildtyp (Publikation 2; Appendix B2 und Publikation 3; Appendix B3) sowie in TK22 (Publikation 1; Appendix B1 und Publikation 4; Appendix B4) dargestellten Untersuchungen Glukose-induzierte Schädigungen zeigen, wie bereits erwähnt, die Relevanz des Nematoden als Modellorganismus in diesem Kontext. Die Aktivierung des Proteasoms wurde dabei als Mechanismus der Prävention der Glukosetoxizität durch Quercetin (Publikation 1; Appendix B1), Polyphenol-reiche Pflanzenextrakte (Publikation 2; Appendix B2) und einen mit Catechinen angereicherten Grüntee-Extrakt (Publikation 3; Appendix B3) postuliert.

### 1.4.5 Proteostase in *C. elegans*

Das Proteostase-Netzwerk in *C. elegans* weist grundlegende Ähnlichkeiten zu dem des Menschen auf. Der Nematode besitzt eine zelluläre Proteinqualitätskontrolle, die zur Aufrechterhaltung der Proteostase besonders in Situationen zellulären Stresses nötig ist

[189]. Das Proteostase-Netzwerk in *C. elegans* beinhaltet ebenfalls molekulare Chaperone, eine Hitzeschockantwort, eine mitochondriale sowie ER-spezifische UPR und die Degradierungssysteme der Autophagie und des UPS. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Elemente des Proteostase-Netzwerks in *C. elegans* beschrieben.

#### 1.4.5.1 Proteinfaltung und Chaperone in *C. elegans*

In *C. elegans* wurden die beiden Chaperone HSP-6 [190] und HSP-60 als UPR<sup>mt</sup>-spezifische Chaperone identifiziert. Sie stellen die Homologe zu HSP-70 und HSP-60 im menschlichen Organismus dar [191]. Weiterhin werden die Chaperone HSP-3 [190, 192] und HSP-4 [192] als ER-Stress sensitive Chaperone in *C. elegans* beschrieben. Beide werden als Homologe zu BiP angesehen [192, 193], wobei *hsp-3* Hitzestress-unabhängig exprimiert wird. Die Transkription von *hsp-4* ist jedoch durch Hitze steigerbar [192] und HSP-4 wird als zentrale, stromaufwärts liegende Komponente der UPR<sup>ER</sup> bezeichnet [193].

#### 1.4.5.2 UPR<sup>mt</sup> in *C. elegans*

Die Induktion der UPR<sup>mt</sup> in *C. elegans* ist abhängig von der in der mitochondrialen Matrix lokalisierten Protease ClpP1. Diese erkennt fehlgefaltete Proteine und vermittelt deren Abbau zu Peptiden, die anschließend durch den *ATP binding cassette* (ABC)-Transporter *HAF transporter (PGP related)* (HAF-1) in das Cytosol transportiert werden [75]. Analog zur Situation beim Menschen wird durch dieses, vom Mitochondrium induzierte Signal, eine Signalkaskade über das Cytoplasma bis zum Nukleus aktiviert. Der stromabwärts von HAF-1 identifizierte Transkriptionsfaktor *activating transcription factor associated with stress-1* (ATFS-1) wird als Folge der Degradierung fehlgefalteter Proteine, dem Transport der Degradierungsprodukte über die mitochondrialen Membranen sowie der Peptid-Akkumulation im Cytosol aktiviert und transloziert in den Zellkern [194]. Der exakte Mechanismus der Aktivierung von ATFS-1 ist dabei noch unbekannt. Allerdings wird ATFS-1 als potentiell Ortholog von CHOP diskutiert [73].

Die Akkumulation fehlgefalteter Proteine in der mitochondrialen Matrix führt außerdem zu einer verstärkten Expression der Gene *ubl-5 (ubiquitin-like protein-5)* und *dve-1 (defective proventriculus in drosophila homologue-1)* sowie der Translokation entsprechender Transkriptionsfaktoren in den Nukleus beziehungsweise deren Relokalisierung im Nukleus. Dort komplexieren sie miteinander [195] und binden an die Promotorregion von *hsp-60*. Diese Bindung scheint in einer Remodellierung der Chromatin-Struktur zu

resultieren, die wiederum die Bindung von ATFS-1 forciert. Als Resultat der UPR<sup>mt</sup>-Signalkaskade werden vermehrt spezifische Chaperone ins Mitochondrium importiert, um die Proteostase aufrechtzuerhalten [75, 196].

#### 1.4.5.3 UPR<sup>ER</sup> in *C. elegans*

Auch in *C. elegans* wird die UPR<sup>ER</sup> als spezifische Antwort auf ER-Stress durch eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine induziert und die entsprechende Signalkaskade kommt der in Säugerzellen gleich. In *C. elegans* wird die UPR<sup>ER</sup> ebenfalls durch drei Signalkaskaden vermittelt, induziert durch die Aktivität von IRE-1, dem PERK-Homolog *human PERK kinase homolog* (PEK-1) sowie dem Transkriptionsfaktor *ATF (cAMP-dependent transcription factor) family* (ATF-6) [197]. Die Aktivierung von IRE-1 resultiert auch in *C. elegans* im Spleißen der *xbp-1* mRNA. Der funktionelle *basic leucine-zipper* (bZip) Transkriptionsfaktor XBP-1 transloziert in den Zellkern und aktiviert die Transkription von weiteren UPR<sup>ER</sup>-relevanten Genen, die Chaperone und Proteine des ERADs kodieren [193, 197]. PEK-1 hingegen wird nicht für eine transkriptionelle Aktivierung innerhalb der UPR<sup>ER</sup> benötigt [197], sondern vermittelt die Phosphorylierung von eIF-2 $\alpha$ , um die Translation und somit die Proteinbiosynthese zu vermindern [198, 199]. Die Aktivität von ATF-6 reguliert hauptsächlich die Expression von konstitutiv exprimierten Genen und weniger solche, die durch ER-Stress induziert werden [200]. Die Expression von ER-spezifischen Chaperonen ist somit unabhängig von ATF-6 [197] und der Großteil der innerhalb der UPR<sup>ER</sup> induzierten Gene ist abhängig von *xbp-1*. Wird die IRE-1/XBP-1-Signaltransduktion blockiert, werden die Gene der *abu (activated in blocked UPR)*-Familie aktiviert. Diese besteht aus neun sehr ähnlichen Transmembranproteinen, die eine wichtige Funktion innerhalb einer gestörten UPR<sup>ER</sup> zu haben scheinen [201].

#### 1.4.5.4 Autophagie in *C. elegans*

Autophagie findet in *C. elegans* in verschiedensten Zelltypen statt und spielt in vielen entwicklungsrelevanten und physiologischen Prozessen eine Rolle. Dazu gehören das Überleben der Nematoden unter Nahrungsmangel, die Entfernung von Protein-Substraten, der Prozess des Dauer-Stadiums und der Alterung sowie die Prävention bakterieller Infektionen [202]. Sie ist involviert in das reproduktive Wachstum, kontrolliert das Zellwachstums, aber auch den Zelltod [203] und vermittelt die Resistenz gegenüber verschiedenen Stresskonditionen, zu denen auch der oxidative Stress gehört [204]. Durch genetische Studien konnten vor allem in *Saccharomyces cerevisiae* zahlreiche Autophagie-

relevante Gene, die eine Orthologie zu solchen in *C. elegans* aber auch in Säugerzellen aufweisen, identifiziert werden [203]. Die Beschreibung dieser Autophagie-spezifischen Elemente in *C. elegans* hat zu einem starken Fortschritt des molekularen Verständnisses der Autophagie in höheren Eukaryoten beigetragen [202].

Auch in *C. elegans* ist die Makroautophagie abhängig von der Bildung eines Autophagosoms, das cytoplasmatisches Material einschließt und anschließend mit einem Lysosom zu einem Autophagolysosom verschmilzt [205]. Das Homolog für Beclin-1 wird in *C. elegans* als *beclin (human autophagy) homolog-1* (BEC-1) bezeichnet und ist zusammen mit dem *related to yeast vacuolar protein sorting factor-43* (VPS-43), auch bezeichnet als LET-512 und homolog zu PI3K, für die initiale Autophagosom-Bildung notwendig [206]. Die autophagosomale Elongation und Schließung wird unter Beteiligung der ATG-Homologe LGG-1 und LGG-2, die beide der *LC3, GABARAP and GATE-16 family* angehören, vermittelt. Sie werden als homolog zu Atg8 in *Saccharomyces cerevisiae*, aber auch zu dem *human microtubule-associated protein 1 light chain 3* (MAP-LC3) beschrieben [207].

Für *C. elegans* existiert keine funktionelle Beschreibung der CMA. Allerdings wurden zwei Strukturhomologe zu LAMP2A identifiziert. *LAMP (lysosome-associated membrane protein) homolog-2* (LMP-2) und *uncoordinated-46* (UNC-46) werden als Transmembranproteine mit strukturellen Ähnlichkeiten zu LAMP2A beschrieben [208], das in Säugerzellen innerhalb der CMA an der Aufnahme der zu degradierenden Proteine in das Lysosom beteiligt ist (vergleiche Abschnitt 1.2.3).

#### 1.4.5.5 UPS in *C. elegans*

Die durch Ubiquitin vermittelte Proteolyse ist einer der wichtigsten Signalwege innerhalb der Degradierung von nukleären und cytosolischen Proteinen. Durch die damit essentielle Funktion innerhalb einer Vielzahl von zellulären Vorgängen sind durch Ubiquitin vermittelte Prozesse auch in *C. elegans* essentiell für multiple Aspekte der Entwicklung sowie der zellulären Physiologie. In dem Nematoden existieren ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym, 20 vermeintliche Ubiquitin-konjugierende Enzyme sowie hunderte potentielle Ubiquitin-Ligasen, die final die Markierung des Protein-Substrats mit Ubiquitin vermitteln [209]. Für Ubiquitin (UBQ) gibt es zwei Loci in *C. elegans*, *ubq-1* und *ubq-2* [210]. Die prädominant gespleißte Form von *ubq-1* kodiert ein aus 838 Aminosäuren bestehendes Peptid, das 11 Tandem-Ubiquitin-Sequenzen enthält und post-translational durch Ubiquitin-Hydrolasen in individuelle Ubiquitin-Peptide gespalten wird [211, 212]. *Ubq-2*

kodiert ein Fusions-Protein bestehend aus Ubiquitin und einer ribosomalen Untereinheit. Nach Abspaltung des Ubiquitins steht dieses für die Markierung von Protein-Substraten zur Verfügung [213, 214]. Wie bereits erwähnt, existiert nur ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym in *C. elegans*, das von *uba-1* (*UBA (human ubiquitin) related*) kodiert wird [209, 215]. UBA-1 vermittelt die Aktivierung des Ubiquitins, indem es dieses auf E2 überträgt, von welchem es letztendlich durch E3 an das Protein-Substrat gebunden wird [216] (vergleiche Abschnitt 1.2.4). Der Abbau der ubiquitinierten Proteine erfolgt über das 26S-Proteasom. In *C. elegans* sind die 14  $\alpha$ -Untereinheiten des 20S-katalytischen Zentrums ebenfalls zu zwei äußeren Ringen, die strukturelle und regulatorische Funktionen ausführen, organisiert. Die Untereinheiten eines jeden Rings werden als *proteasome alpha subunit* (PAS)-1 bis PAS-7 beschrieben. Die beiden inneren  $\beta$ -Ringe bestehen in *C. elegans* jeweils aus den Untereinheiten *proteasome beta subunit* (PBS)-1 bis PBS-7 [217]. Alle  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten weisen signifikante Homologien zu den entsprechenden Untereinheiten in Säugerzellen auf. Beispielsweise kodiert *pbs-4* eine Untereinheit, die als homolog zur zweiten  $\beta$ -Untereinheit des 20S-Zentrums in Säugerzellen beschrieben wurde [216].

## 2 Zielsetzung

Hyperglykämische Konditionen sind ein Charakteristikum des Diabetes mellitus. Die erhöhten Glukosekonzentrationen sind mit der Entstehung diabetischer Komplikationen sowie einer reduzierten Lebensspanne von Organismen assoziiert. Neben der medikamentösen Therapie metabolischer Erkrankungen steht die nutritive Beeinflussbarkeit, zum Beispiel in Form pflanzlicher Polyphenole, immer häufiger im Fokus der Forschung. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bedeutung von Elementen der Proteostase für die Stressantwort gegenüber Glukose-induzierten Schädigungen sowie deren Beeinflussbarkeit durch das Polyphenol Quercetin auf molekularer Ebene zu untersuchen. Dafür wurde der stressensitive *C. elegans* Stamm TK22 als Modellorganismus herangezogen.

Dass die Stressresistenz des Nematoden durch die Applikation einer Hyperglykämie-simulierenden Glukosekonzentration reduziert wird, konnte in vorangegangenen Studien bereits gezeigt werden. Die simultane Gabe von Quercetin resultierte in der Prävention der Glukose-abhängigen Verkürzung der Überlebenszeit bei 37 °C und somit in der Wiederherstellung der originären Stressresistenz (Publikation 1; Appendix B1). Um die Bedeutung von Elementen der Proteostase vor allem für die Erhöhung der Stressresistenz durch Quercetin, aber auch ihrer Verminderung durch Glukose zu untersuchen, wurden zentrale Proteine der Proteostase mittels RNA-Interferenz (RNAi) in ihrer Expression vermindert. Im Einzelnen waren dies zentrale Gene der *Unfolded Protein Response* im Mitochondrium (UPR<sup>mt</sup>) sowie im ER (UPR<sup>ER</sup>), der Autophagie und des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS). Die Stressresistenz wurde wiederum anhand der Überlebenszeit unter Hitzestress (37 °C) bestimmt.

Um die Wirkung von Glukose und Quercetin auf die Expression UPR<sup>mt</sup>- und UPR<sup>ER</sup>-spezifischer Chaperone in TK22 zu untersuchen, wurde dieser Stamm mit transgenen Stämmen, die GFP unter der Kontrolle des Promotors entsprechender Chaperone exprimieren, gekreuzt und nach Exposition gegenüber Glukose in Ab- und Anwesenheit von Quercetin fluoreszenzmikroskopisch evaluiert. Die Beeinflussung der Autophagie und des UPS durch Glukose in Ab- und Anwesenheit von Quercetin wurde zudem durch die Quantifizierung der Lysosomenbildung beziehungsweise die Ermittlung der proteasomalen Aktivität unter Verwendung eines fluoreszenzoptisch nachweisbaren Substrats untersucht.



Abschließend erfolgte die Ermittlung von Interaktionen einzelner Elemente des Proteostase-Netzwerks, indem der Einfluss einer verminderten Expression von UPR<sup>ER</sup>- und Autophagie-spezifischen Genen auf die proteasomale Aktivität ermittelt wurde.

## 3 Methoden

Alle *C. elegans* und *E. Coli* Stämme sowie sämtliche RNAi-Klone, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind in Appendix A aufgeführt. Ebenso findet sich dort eine tabellarische Auflistung von allen in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Geräten und Materialien unter Angabe des Herstellers und der Artikel-Nummer sowie die Zusammensetzung sämtlicher selbst hergestellten Lösungen und Puffer.

### 3.1 Kultivierung von *C. elegans*

*C. elegans* wurde unabhängig vom Stamm auf *nemtole growth medium* (NGM)-Agarplatten (Tabelle A.27), die mit aufkonzentrierter *E. coli* OP50 Tagkultur (Absatz 3.1.2) beschichtet waren, kultiviert. Die Kultivierung fand bei 20 °C statt. Um das Verhungern der Nematoden zu vermeiden und die fortlaufende Kultivierung aufrecht zu erhalten, wurden die Nematoden in regelmäßigen Abständen auf eine frische, mit *E. Coli* OP50 beschichtete NGM-Agarplatte überführt. Dafür wurde unter sterilen Bedingungen mit einem ausgeglühten Skalpell ein Stück der mit Nematoden bewachsenen Agar-Platte herausgeschnitten und kopfüber auf der frischen Agar-Platte platziert, die anschließend bei 20 °C gelagert wurde.

Eine Langzeitlagerung von *C. elegans* ist bei -80 °C möglich. Dafür wurden Agarplatten, die mit angehungerten L1- und L2-Larven besetzt waren, benötigt. Die Larven wurden mit Einfrier-Puffer A (Tabelle A.6) von der Platte heruntergewaschen. Die gleiche Menge Einfrier-Puffer B, der 30 % Glycerin enthielt (Tabelle A.7), wurde hinzugegeben und die Larven wurden bei -80 °C eingefroren. Um einen gleichmäßigen Abfall der Temperatur um 1 °C pro Minute zu gewährleisten, geschah das Einfrieren in einem mit Isopropanol gefüllten Behältnis (Tabelle A.2).

#### 3.1.1 Herstellung von NGM-Agarplatten

Der für das Gießen der NGM-Agarplatten benötigte NGM-Agar wurde, wie in Tabelle A.27 beschrieben, hergestellt. Im Anschluss an das Autoklavieren und anschließende Abkühlen auf 60 °C in einem Wasserbad wurde der flüssige NGM-Agar in Petrischalen gegossen,

wobei etwa 9 ml Agar in eine Petrischale mit 9,2 cm Durchmesser gegeben wurden. Für die Kultivierung von männlichen *C. elegans* Nematoden (Abschnitt 3.5.1.1) wurden Petrischalen von 3,5 cm Durchmesser mit etwa 3 ml Agar befüllt. Nach dem Aushärten der Platten wurden diese mit jeweils 600 µl aufkonzentrierter *E. Coli* OP50 Tagkultur (100 µl für Kultivierung der männlichen Nematoden) beschichtet. Nach dem Trocknen des Bakterienrasens waren die NGM-Agarplatten einige Tage bei Raumtemperatur (RT) lagerfähig, um für die Kultivierung von *C. elegans* verwendet zu werden.

### 3.1.2 Kultivierung von *E.coli* OP50

Der *E. coli* Stamm OP50 (Tabelle A.30) ist Uracil-auxotroph, wodurch sein Wachstum auf den NGM-Agarplatten limitiert werden kann [136]. Er wurde vom Caenorhabditis Genetics Center (CGC, University of Minnesota, St. Paul, USA) bezogen. Für seine Kultivierung, deren einzelne Schritte stets unter sterilen Bedingungen stattfanden, wurden aus einer Glycerin-Kultur stammende Bakterien mittels des Drei-Ausstrich-Prinzips auf 2x YT-Agarplatten (Tabelle A.25) vereinzelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 3 ml 2x YT-Medium (Tabelle A.26) mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über Nacht auf einem Schüttelinkubator bei 300 rpm und ebenfalls 37 °C inkubiert, um so eine Übernachtskultur zu erhalten. Zur Herstellung einer aufkonzentrierten Tagkultur wurden zunächst 200 ml 2x YT-Medium mit 500 µl der Übernachtskultur beimpft. Im Anschluss an die 6-stündige Inkubation auf dem Schüttelinkubator bei 300 rpm und 37 °C wurde die Tagkultur in 4 x 50 ml aufgeteilt und bei 5100xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jedes der Bakterienpellets in 5 ml 2x YT-Medium resuspendiert. Die aufkonzentrierte Tagkultur war bei 4 °C lagerfähig und 1 Woche haltbar.

Zur Langzeitlagerung von *E. coli* bei -80 °C wurden Glycerin-Kulturen, bestehend aus 800 µl Übernachtskultur und 200 µl Glycerin, hergestellt.

### 3.1.3 *Egg-Preparation zur Synchronisation von C.elegans*

Um eine homogene Population gleichaltriger Nematoden zu erhalten, wurde eine Synchronisation von *C. elegans* durch eine *egg-preparation* (*egg-prep*) durchgeführt. Die Synchronisation mittels dieser Bleich-Methode erfolgte unter sterilen Bedingungen. Dafür

wurden zunächst mit adulten Nematoden dicht bewachsene NGM-Agarplatten mit M9-Puffer (Tabelle A.9) überschichtet. Die Nematoden wurden in dem M9-Puffer mittels einer Glaspasteurpipette in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und noch zweimal gewaschen. Es erfolgte die Abnahme des Überstands bis auf 3,5 ml mit anschließender Zugabe von 1,5 ml Bleichlösung (Tabelle A.5). Durch kräftiges Schütteln wurden die adulten Nematoden aufgelöst und ihre Eier freigesetzt. Um diese zu pelletieren wurde das Zentrifugenröhrchen vollständig mit M9-Puffer aufgefüllt und anschließend bei 2800xg für 2 min zentrifugiert. Nach dem zweimaligen Waschen des Pellets mit M9-Puffer erfolgte das Auffüllen des Zentrifugenröhrchens auf 10 ml und die Zugabe von 10 µl Cholesterollösung (Tabelle A.4). Um das Schlüpfen der Larven zu ermöglichen, wurde das Zentrifugenröhrchen über Nacht auf einem Überkopfschüttler bei 25 rpm und RT inkubiert. Die synchronisierten Larven wurden anschließend bei 1200xg zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Larven-Pellet noch einmal mit M9-Puffer gewaschen.

### **3.1.4 Aufzucht synchronisierter *C. elegans* Larven in NGM**

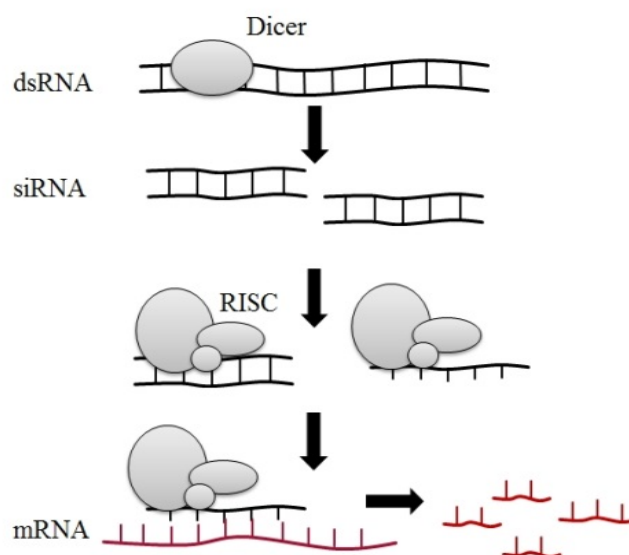
Die Aufzucht der synchronisierten L1-Larven erfolgte stets in mit Bakterien versetztem, flüssigem NGM (Tabelle A.28) in 96- oder 24-Well-Mikrotiterplatten. Dafür wurden zunächst 30 µl einer aufkonzentrierten *E. coli* OP50 Tagkultur bei 5100xg für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml NGM resuspendiert und die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) wurde mit Hilfe eines Eppendorf Biophotometer plus (Tabelle A.2) auf 1,0 eingestellt. Für einen Versuchsansatz in einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden in eine Plattenvertiefung 10 bis 15 synchronisierte L1-Larven in 10 µl M9-Puffer pipettiert, gefolgt von der Zugabe von 46 µl der NGM-Bakterien-Suspension. Für eine Behandlungsgruppe wurden 10 Plattenvertiefungen nach dem beschriebenen Prinzip angesetzt. Die Inkubation der Mikrotiterplatte erfolgte geschützt vor Licht und Verdunstung, schüttelnd bei 150 rpm und 20 °C bis zum Erreichen des jung-adulten Stadiums der Nematoden.

Für Experimente mit *C. elegans*, die eine Proteinextraktion voraussetzten, wurden die Versuche in 24-Well-Mikrotiterplatten mit einem 10-fachen Volumen der einzelnen Bestandteile pro Plattenvertiefung angesetzt, wobei mindestens drei 24-Well-Mikrotiterplatten pro Behandlungsgruppe benötigt wurden. Für die Isolierung von RNA

aus *C. elegans* wurde pro Behandlungsgruppe mindestens eine 24-Well-Mikrotiterplatte angesetzt.

### 3.1.5 RNAi in *C. elegans*

Um die Expression bestimmter Gene in *C. elegans* zu vermindern, wurde die RNAi durchgeführt. Diese Methode, bei der das sogenannte *gene silencing* durch den gezielten Abbau von *messenger RNA* (mRNA) stattfindet, wurde erstmals in *C. elegans* beschrieben [143]. Dafür muss zunächst doppelsträngige RNA (dsRNA) in den Organismus eingebracht werden. Eine dsRNA-spezifische Endonuklease (Dicer) spaltet diese in Fragmente einer Größe von 25 bis 30 Basenpaaren (bp) mit 3'-Überhang, die sogenannten *short interfering RNAs* (siRNAs). Durch Zusammenlagerung der siRNA mit verschiedenen spezifischen Proteinen entsteht der *RNA-induced silencing complex* (RISC), der zunächst die Doppelstränge der siRNA auftrennt. Der *antisense*-Strang der siRNA verbleibt im RISC und bewirkt die Bindung der komplementären mRNA, die dann durch eine dem RISC angehörende Endonuklease gespalten und abgebaut wird [218, 219]. Der Mechanismus ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt.



**Abbildung 3.1: Prinzip der RNA-Interferenz**

Die doppelsträngige RNA (dsRNA) wird von der spezifischen Endonuklease Dicer in *short interfering RNA* (siRNA) gespalten. Durch den *RNA induced silencing complex* (RISC) wird die siRNA in Einzelstränge aufgetrennt, der *antisense*-Strang verbleibt im RISC und bindet die komplementäre mRNA, die anschließend gespalten und abgebaut wird.

In *C. elegans* stellt die sogenannte Fütterungsmethode eine einfache und effiziente Möglichkeit dar, die RNAi durchzuführen. Dafür wurde der *E. coli* Stamm HT115 (Tabelle A.30), der spezifische dsRNA exprimiert und durch eine RNaseIII-Defizienz nicht die Fähigkeit aufweist, dieselbe zu spalten und somit wieder abzubauen, verfüttert. HT115-Bakterien enthalten den L4440 Vektor, welcher einen Polylinker zur Verfügung stellt, in den eine spezifische Gen-Sequenz flankiert von zwei konvergenten T7-Promotoren integriert ist. Bei Aktivierung der in HT115 enthaltenen T7-Polymerase durch Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird die Gen-Sequenz exprimiert und so die entsprechende dsRNA synthetisiert [220].

Um RNAi-Experimente durchzuführen wurden zunächst die entsprechenden Bakterien kultiviert. Ausgehend von Glycerin-Kulturen wurden die Bakterien auf 2x YT-Agarplatten, die mit der Zugabe von Ampicillin [100  $\mu$ g/ml] und Tetracyclin [25 mg/ml] hergestellt wurden (Tabelle A.25), mittels des Drei-Ausstrich-Prinzips vereinzelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend waren sie für etwa 1 Monat bei 4 °C lagerfähig. Um eine Übernachtskultur herzustellen, wurden 3 ml 2x YT-Medium mit Ampicillin [100  $\mu$ g/ml] versetzt, mit einer einzelnen Bakterien-Kolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 300 rpm auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Die entsprechende Tagkultur wurde aus 2 ml 2x YT-Medium hergestellt, das zuvor mit Ampicillin versetzt und mit 200  $\mu$ l Übernachtskultur beimpft wurde. Durch die zusätzliche Zugabe von 1 mM IPTG wurde die dsRNA-Synthese aktiviert. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37 °C und 300 rpm auf einem Schüttelinkubator wurde 1 ml der Tagkultur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500  $\mu$ l NGM, das mit Kanamycin [25  $\mu$ g/ml] (Tabelle A.28) versetzt wurde, resuspendiert. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der OD<sub>600</sub>, um diese auf 1,0 einzustellen. Die Zugabe des Kanamycins diente der Inaktivierung der Bakterien, um die Metabolisierung von später hinzugefügten Effektoren, wie zum Beispiel der Glukose, zu unterbinden. Für alle RNAi-Experimente wurde der *E. coli* Stamm HT115 mit leerem L4440-Vektor als Kontrolle verwendet [221]. Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten RNAi-Klone sind in Tabelle A.31 aufgelistet. Für Doppel- oder Tripel-RNAi-Experimente wurden die jeweiligen NGM-Bakterien-Suspensionen im entsprechenden Verhältnis vor dem Ansatz des Versuchs gemischt. Für solche Experimente wurden die RNAi-Klone zudem als Einzelvergleich mit der RNAi-Kontrolle verdünnt (1:2 für Doppel-RNAi beziehungsweise 1:3 für Tripel-RNAi), um den abgeschwächten Effekt durch die Verdünnung des einzelnen RNAi-Klons darzustellen.

### 3.1.6 Inkubation von *C. elegans* mit Glukose in Ab- und Anwesenheit von Quercetin

Die Behandlung von *C. elegans* mit Glukose in Ab- und Anwesenheit des Polyphenols Quercetin erfolgte im jung-adulten Stadium, das in der Regel am vierten Tag der Aufzucht in NGM erreicht war. Die Inkubationszeit betrug stets 48 h. Für jede Behandlungsgruppe wurde eine Kontrollgruppe mitgeführt, der ausschließlich das Lösungsmittel des entsprechenden Effektors verabreicht wurde. Für die Glukose wurde die Stammlösung (Tabelle A.4) frisch angesetzt und die entsprechende Arbeitslösung hergestellt. Die Stammlösung des Quercetins (Tabelle A.4) wurde auf RT gebracht und ebenfalls zur Herstellung entsprechender Arbeitslösungen verwendet. Die Arbeitslösungen von Glukose und Quercetin waren dabei 10-fach konzentrierter als die definierte Endkonzentration. In Ansätzen mit Quercetin ergab sich daraus eine Endkonzentration von 1 % Ethanol:TWEEN® 20, die auch in der entsprechenden Kontrolle eingestellt wurde.

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Nematoden aus den Mikrotiterplatten in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal mit M9:Tween®20 (Tabelle A.10) gewaschen, um Bakterien und Effektoren zu entfernen.

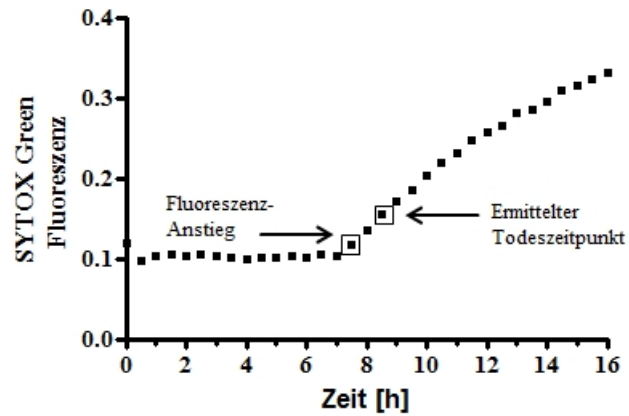
## 3.2 Bestimmung der Überlebenszeit unter Hitzestress

Die Ermittlung der Überlebenszeit unter Hitzestress-Bedingungen in Anlehnung an Gill *et al.* [222] ist ein technisch automatisiertes Verfahren, bei dem mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYTOX® Green (Tabelle A.4) der Todeszeitpunkt von *C. elegans* bei einer Umgebungstemperatur von 37 °C bestimmt wird. SYTOX® Green dringt ausschließlich in abgestorbene Zellen ein und interkaliert in die DNA. Das entstehende Fluoreszenzsignal wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Fluoroskan Ascent FL Fluorometer (Tabelle A.2) detektiert.

Für die Durchführung wurden zunächst 6,5 µl M9:Tween®20 in jede Plattenvertiefung einer 384-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Mit M9:Tween®20 gewaschene Nematoden wurden in ein Urglas überführt und mit Hilfe des Stereomikroskops vereinzelt, um 1 µl M9:Tween®20 mit einem Nematoden in eine Plattenvertiefung der Mikrotiterplatte zu bringen. Pro Behandlungsgruppe wurden 40 Nematoden benötigt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 7,5 µl SYTOX® Green (2 µM in M9:Tween®20). Zum Schutz vor Verdunstung wurde die Mikrotiterplatte mit einem Schutzfilm und einem Deckel verschlossen. Die Messung des SYTOX® Green Signals erfolgte bei 37 °C über einen Zeitraum von 16 h im Abstand von 30 min mit dem Fluoroskan bei einer Anregungswellenlänge (*excitation*, Ex) von 485 nm und einer Emissionswellenlänge (Em) von 538 nm.

Für die Bestimmung der Überlebenszeit unter Hitzestress-Bedingungen wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5 (Tabelle A.35) für jeden Nematoden einer Behandlungsgruppe der Todeszeitpunkt graphisch ermittelt. Durch die Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit (Abbildung 3.2) konnte der Todeszeitpunkt, definiert als 1 h nachdem die Fluoreszenz deutlich über das Basisniveau angestiegen war, abgelesen werden. Die Todeszeitpunkte der Nematoden einer Behandlungsgruppe wurden als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und mit denselben der unterschiedlichen Behandlungsgruppen hinsichtlich signifikanter Unterschiede verglichen.





**Abbildung 3.2: Verlauf einer Fluoreszenzkurve des Fluoroskan-Assay**

Für die Generierung einer Kaplan-Meier-Kurve wurde zunächst jede Fluoreszenzkurve analysiert, um den Todeszeitpunkt jedes Nematoden einer Behandlungsgruppe festzustellen. Der Todeszeitpunkt war definiert als 1 h nachdem die Fluoreszenz über das Basis Niveau angestiegen war.

### 3.3 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmungen

#### 3.3.1 Quantifizierung von Lysosomen mit LysoTracker® Red

Die Quantifizierung von Lysosomen in *C. elegans* wurde unter Verwendung des Fluoreszenz Farbstoffs LysoTracker® Red DND-99 (Tabelle A.4) durchgeführt. Durch die Eigenschaft in azidischem Milieu protoniert zu werden und dort zu akkumulieren, eignet sich LysoTracker® Red um Lysosomen spezifisch anzufärben und somit zu quantifizieren [223]. Die Inkubation der Nematoden mit LysoTracker® Red (2  $\mu$ M in M9:Tween®20) erfolgte im jung-adulten Stadium analog zur 48-stündigen Inkubation mit den Effektoren (Abschnitt 3.1.6). Anschließend wurden die Nematoden zweimal mit M9:Tween®20 gewaschen. Um die Ausscheidung von LysoTracker® Red aus dem Darmlumen herbeizuführen, folgte die Überführung der Nematoden auf eine mit OP50 Tagkultur beschichtete NGM-Agarplatte, auf der sie 1 h verblieben. Anschließend wurden die Nematoden mit M9-Puffer von der NGM-Agarplatte gewaschen, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals zweimal mit M9:Tween®20 gewaschen. Die Nematoden wurden mit 2 mM Levamisol anästhesiert, auf einen Objektträger überführt und mit einem Deckgläschen fixiert. Die Detektion der LysoTracker® Red-Fluoreszenz wurde mit dem digitalen Fluoreszenzmikroskop AMG EVOS fl Color (Tabelle A.2) durchgeführt. Unter der Verwendung des EVOS LED Light Cube RFP wurden innerhalb der Detektionsbereiche 531 nm Anregung (Ex) und 539 nm Emission (Em) und bei 100-facher Vergrößerung mindestens 20 Nematoden pro Behandlungsgruppe fotografiert.

Für die Bestimmung der Lysosomendichte wurde zunächst die Gesamtfluoreszenz von LysoTracker® Red für jeden Nematoden bestimmt. Mit Hilfe der Software ImageJ (Tabelle A.35) erfolgte die Trennung der Bilder in separate 8-Bit-Graustufenbilder, um den roten Farbkanal für die Quantifizierung verwenden zu können. Störende Objekte wie andere Nematoden oder Larven wurden wegretuschiert, so dass sich ausschließlich ein Nematode auf einem Bild befand. Im nächsten Schritt erfolgte die Festlegung eines unteren Grenzwertes so, dass die Auswahl der selektierten Pixel bei möglichst geringem Hintergrundrauschen den Nematoden vollständig einschloss. Als Maß für die Gesamtfluoreszenz wurde die integrierte Dichte der durch einen einheitlich festgelegten Grenzwert selektierten Pixel bestimmt, um kumulierte Grauwerte der ausgewählten Pixel zu erstellen und statistisch miteinander zu vergleichen.

### 3.3.2 Expressionsanalyse mit GFP-Reportergenen

Die Expressionsanalyse der *C. elegans* Gene *hsp-4* und *hsp-60* wurde mit Hilfe der transgenen *C. elegans* Stämme SJ4005 (Genotyp *zcls4 [hsp-4p::GFP] V*) und SJ4058 (Genotyp *zcls9 [hsp-60p::GFP] V*), die zuvor mit dem Stamm TK22 (Genotyp *mev-1(kn1)*) gekreuzt wurden (Abschnitt 3.5.1), durchgeführt. Die verwendeten transgenen Stämme zeichnen sich durch ein GFP-Reportergen aus, das an den Promotor des zu untersuchenden Gens gekoppelt ist. Bei diesen transkriptionellen Reportern befindet sich das einige Kilobasen schwere Promotorfragment unmittelbar stromaufwärts des GFP-Startcodons und gewährleistet durch einen hohen Anteil *cis*-regulatorischer Elemente dessen Transkription [224]. Bei transkriptioneller Aktivität des Gen-spezifischen Promotors erfolgt somit die Expression des GFP-Reportergens. Die Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz wurde in der vorliegenden Arbeit als Maß für die transkriptionelle Aktivität des Gen-spezifischen Promotors herangezogen.

Dafür wurden die Nematoden zunächst zweimal mit M9:Tween®20 gewaschen und mit 2 mM Levamisol anästhesiert. Die Detektion der GFP-Fluoreszenz wurde mit dem digitalen Fluoreszenz Mikroskop AMG EVOS fl Color (Tabelle A.2) durchgeführt. Unter der Verwendung des EVOS LED Light Cube GFP wurden innerhalb der Detektionsbereiche 470 nm (Ex) und 525 nm (Em) und bei 100-facher Vergrößerung mindestens 20 Nematoden pro Behandlungsgruppe fotografiert.

Für die Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz wurde nach dem Prinzip vorgegangen, wie es in Abschnitt 3.3.1 für die Quantifizierung der Lysosomen in *C. elegans* beschrieben ist, mit dem Unterschied, dass im Anschluss an die Trennung in separate 8-Bit-Graustufenbilder der grüne Farbkanal verwendet wurde.

## 3.4 Biochemische Methoden

### 3.4.1 Protein-Extraktion

Die Protein-Extraktion von *C. elegans* wurde mit dem Precellys 24-Dual Homogenisator (Tabelle A.2) durchgeführt. Dafür wurden pro Behandlungsgruppe mindestens drei 24-Well-Mikrotiterplatten mit jeweils etwa 2500 Nematoden benötigt (Abschnitt 3.1.4). Zunächst wurden die Nematoden zweimal mit M9-Puffer gewaschen. Nachdem vollständigen Entfernen des Überstands erfolgte die Resuspendierung des Nematoden-Pellets in Wurm-Lyse-Puffer I (Tabelle A.19), dessen Volumen äquivalent zu dem des Pellets war, jedoch mindestens 300 µl betragen musste. Anschließend wurden die Nematoden in dem Lyse-Puffer in ein 2 ml Precellys Schraubdeckelgefäß überführt und bei -80 °C für mindestens 24 h eingefroren, um die Kutikula aufzubrechen. Für die Extraktion wurden die Nematoden auf Eis aufgetaut. Zu jeder Probe wurden 600 mg Precellys Keramik-Kügelchen in das Schraubdeckelgefäß gegeben, um anschließend die Homogenisierung im Precellys 24-Dual Homogenisator für 2x 20 sec bei 6500 rpm mit 30 sec Pause zu starten. Anschließend wurde das Homogenat bei 4000xg und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Proteine wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und konnten zum weiteren Gebrauch auf Eis gelagert oder bei -20 °C eingefroren werden.

### 3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einem BioRad Protein Assay. Dafür wurde entsprechend der Methode nach Bradford [225] der Farbstoff Coomassie® Brilliant Blau verwendet, der in saurer Lösung an Proteine bindet. Dabei entsteht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm, wobei letztere (Ex 595 nm) photometrisch erfasst wird und deren Intensität mit der Proteinkonzentration korreliert.

Zunächst wurde eine Standard-Reihe hergestellt, die aus bovinem Serumalbumin (BSA) der Konzentrationen 0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml in Wurm-Lyse-Puffer I bestand. Es wurden 25 µl Standard jeweils mit 975 µl bidestilliertem H<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O bidest.) und 250 µl Bradford-Reagenz vermischt, um nach exakt 15 min Inkubationszeit die Absorption eines jeden Standards bei 595 nm mit einem

Eppendorf Biophotometer plus zu bestimmen. Die Standardkurve wurde dabei automatisch durch das Photometer generiert.

Analog dazu wurden 25 µl Proteinextrakt (Abschnitt 3.4.1) mit H<sub>2</sub>O bidest. und Bradford-Reagenz versetzt, um ebenfalls die Absorption bei 595 nm zu bestimmen, die durch das Photometer anhand der zuvor erstellten Standardkurve in die Protein-Konzentration (µg/ml) der Probe umgerechnet werden konnte.

### 3.4.3 Messung der spezifischen Proteasomaktivität

In der vorliegenden Arbeit wurde die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität der 20S-Untereinheit des Proteasoms in *C. elegans* fluorometrisch bestimmt. Dafür wurde das spezifische Substrat N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin (Suc-LLVY-AMC) (Tabelle A.4), das mit dem Fluorogen 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) markiert ist, verwendet. Durch proteolytische Spaltung von Suc-LLVY-AMC wird AMC freigesetzt und kann fluorometrisch nachgewiesen werden, wobei der Anstieg der Fluoreszenz zunächst mit der gesamten enzymatischen Proteasenaktivität gleichzusetzen ist. Um ausschließlich die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität zu ermitteln, wurde der spezifische Proteasom-Inhibitor MG-132 (Tabelle A.4) verwendet. Durch Differenzbildung der Proteasomaktivität in Abwesenheit und Gegenwart des Inhibitors konnte die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität ermittelt werden.

Die Messung erfolgte in einer 96-Well *half area* Mikrotiterplatte. Um Interaktionen der Protein-Probe mit der Mikrotiterplatte zu minimieren, wurden die Plattenvertiefungen zunächst mit einer 3 %-igen BSA-Lösung in *tris-buffered saline* (TBS) blockiert, wofür die 1,5-fache Menge (75 µl) des späteren Ansatz-Volumens der BSA-Lösung in jede Plattenvertiefung gebracht wurde, um die Mikrotiterplatte anschließend für 30 min bei 37 °C zu inkubieren. Anschließend wurde die BSA-Lösung vollständig entfernt.

Im Anschluss an das Auftauen der Protein-Probe auf Eis wurde diese in einem Volumen entsprechend einem mg Protein in eine Plattenvertiefung gebracht, um anschließend ein solches Volumen Proteasomaktivitäts-Messpuffer (Tabelle A.20) hinzuzugeben, sodass das gesamte Volumen 50 µl betrug. Um die Proteasomaktivität der Probe in Gegenwart und Abwesenheit des Proteasom-Inhibitors zu messen, wurden entweder 0,5 µl der MG-132 Stammlösung oder 0,5 µl des entsprechenden Lösungsmittels hinzugefügt. Nachdem die

Mikrotiterplatte 15 min bei 20 °C und 150 rpm im Dunkeln inkubiert wurde, erfolgte die Zugabe von 0,5 µl Suc-LLVY-AMC Stammlösung. In einem Abstand von 10 min wurde der Fluoreszenz-Anstieg bei 460 nm (Em) nach Anregung bei 355 nm (Ex) über einen Zeitraum von 3 h in dem Fluoroskan Ascent FL Fluorometer (Tabelle A.2) bestimmt, wobei jede Probe in Triplikaten gemessen wurde.

Die so erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden pro mg Protein normalisiert, um anschließend mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5 (Tabelle A.35) den Anstieg der Fluoreszenz pro Zeiteinheit mittels linearer Regression zu bestimmen. Durch Differenzbildung der ermittelten Steigungen der Probe in Abwesenheit und Gegenwart von MG-132 wurde letztendlich derjenige Anstieg der Fluoreszenz ermittelt, welcher der spezifischen Proteasomaktivität gleichzusetzen ist.

### **3.4.4 Bestimmung poly-ubiquitinerter Proteine**

Die Bestimmung von poly-ubiquitinierten Proteinen in *C. elegans* wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Western Blot-Analyse durchgeführt. Dafür wurden die Proteine im Anschluss an deren Extraktion (Abschnitt 3.4.1) und der Bestimmung ihrer Konzentration (Abschnitt 3.4.2) zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch einen Semi-Dry Blot erfolgte der Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran, um die poly-ubiquitinierten Proteine dort unter der Verwendung spezifischer Antikörper nachzuweisen. Als Referenzprotein wurde  $\beta$ -Aktin auf derselben Membran detektiert. Sämtlich Wasch- und Inkubations-Schritte bei RT fanden auf einem Horizontalschüttler statt.

#### **3.4.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-PAGE wurde in dem Elektrophorese Komplettsystem Mini Protean 3 Cell (Tabelle A.2) durchgeführt. Zunächst wurde ein 8,5 %iges Trenngel (Tabelle 3.1, Angaben für 2 Gele), in dem Proteine mit einer Molekülmasse von 43 bis 200 kDa aufgetrennt werden, zwischen 2 Glasplatten gegossen. Eine Überschichtung des Gels mit 2-Methyl-1-Propanol gewährleistete den Ausschluss von Sauerstoff und somit die Polymerisation des Gels.

**Tabelle 3.1: Zusammensetzung des 8,5 %igen Trenngels**

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3 ml
10 % SDS (w/v)	120 µl
30 % Acrylamidlösung	3,4 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	5,44 ml
10 % APS	160 µl
TEMED	7 µl

Im Anschluss an die durch Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysierte Polymerisation des Trenngels wurde das 2-Methyl-1-Propanol entfernt, ein 5 %iges Sammelgel (Tabelle 3.2, Angaben für 2 Gele) wurde aufgegossen und ein 10-Taschen-Kamm luftblasenfrei eingesetzt.

**Tabelle 3.2: Zusammensetzung des 5 %igen Sammelgels**

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1 ml
10 % SDS (w/v)	40 µl
30 % Acrylamidlösung	680 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	2,24 ml
10 % APS	40 µl
TEMED	2 µl

Im Anschluss an die 2-stündige Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das Gel beladen. Um die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufzutrennen, wurden diese zunächst nach der Methode von Laemmli denaturiert [226]. Ein Volumen der extrahierten Proteine (Abschnitt 3.4.1), das 30 µg Protein enthielt, wurde dafür mit dem doppelten Volumen 3x Lämmli-Puffer (Tabelle A.12) versetzt und 15 min bei 55 °C inkubiert. Eine Tasche des Gels wurde mit jeweils einem Drittel der Denaturierungsreaktion beladen. Zusätzlich fand ein Molekulargewicht-Standard im

Bereich von 43 bis 200 kDa (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards) (Tabelle A.3) als Marker Anwendung. Unter der Verwendung von Lauf-Puffer (Tabelle A.13) fand die Elektrophorese bei 200 V für 45 min statt.

#### 3.4.4.2 Western-Blot

Die mittels SDS-PAGE separierten Proteine wurden durch einen Semi-Dry-Blot auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert. Dafür erfolgte zunächst die Aktivierung der Membran in Methanol (100 %) mit anschließender 15-minütiger Inkubation in Blot-Puffer nach Towbin (Tabelle A.17). Für den Aufbau des Blots wurden 6 Stücke Whatman-Papier benötigt, die ebenfalls zunächst in Blot-Puffer äquilibriert wurden. Der Aufbau des Blots geschah ausgehend von der Kathode und bestand aus drei Lagen äquilibriertem Whatman-Papier, gefolgt von dem Trenngel und der Membran sowie weiteren drei Lagen Whatman-Papier, auf welchen zuletzt die Anode angebracht wurde. Das Blotting der Proteine erfolgte durch Elektrotransfer bei 1 mA/cm für 45 min in dem Semi-Dry Blotter Modell HEP 1 (Tabelle A.2).

#### 3.4.4.3 Immunodetektion poly-ubiquitinerter Proteine

Im Anschluss an den Semi-Dry-Blot wurde die Membran zunächst 1 h bei RT in Block-Puffer (Tabelle A.16) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Anschließend erfolgte eine 16-stündige Inkubation der Membran bei 4°C mit einem primären Antikörper gegen Poly-Ubiquitin (Rabbit-anti-ubiquitin (linkage-specific K48)) (Tabelle A.33), der zuvor 1:5000 in Block-Puffer verdünnt wurde. Um nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen, erfolgte das 2-malige Waschen der Membran in TBS-T-Puffer (Tabelle A.15) für jeweils 5 min. Anschließend wurde die Membran mit einem Meerrettichperoxidase (HRP; engl. *horseradish peroxidase*)-konjugierten, sekundären Antikörper (Mouse anti-rabbit IgG-HRP) (Tabelle A.33) 1 h bei RT inkubiert. Auch dieser Antikörper wurde in einer 1:5000-Verdünnung in Block-Puffer verwendet. Im Anschluss an das Entfernen des sekundären Antikörpers wurde die Membran erneut 2-mal mit TBS-T- und 1-mal mit TBS-Puffer (Tabelle A.14) für jeweils 5 min gewaschen.

#### 3.4.4.4 Chemilumineszenz-Detektion

Das Prinzip der Chemilumineszenz-Detektion basiert auf der Aktivität der an den sekundären Antikörper konjugierten HRP. Das Enzym katalysiert die Oxidation des Luminols, das in der *enhanced chemiluminescent* (ECL)-Lösung (Tabelle A.18) vorhanden ist. Diese Reaktion findet in Gegenwart von Peroxiden, wie zum Beispiel



Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), statt und wird durch die HRP beschleunigt [227]. Das dabei entstehende Luminol-Dianion wird durch Oxidation in ein instabiles Peroxid überführt, dessen Elektronen sich in einem angeregten Zustand befinden. Bei Rücktritt in das Ausgangsniveau wird Energie in Form von Photonen emittiert. Dieser Prozess findet auf der Membran in den Bereichen statt, in denen der sekundäre an den primären Antikörper gebunden hat und somit die HRP immobilisiert ist. Die emittierten Photonen bewirken eine Schwarzfärbung auf einem Film, wodurch die entsprechenden Bereiche sichtbar gemacht werden können.

Für die Chemilumineszenz-Detektion wurde die Membran für 5 min bei RT und unter Lichtausschluss in frischer ECL-Lösung inkubiert. Nach dem Einschweißen der Membran in Folie wurde sie in einer Röntgenfilm-Kassette platziert. In einer Dunkelkammer wurde ein Film auf der Membran angebracht und die Röntgenfilm-Kassette geschlossen. Die Belichtungszeit betrug 30 sek. Anschließend erfolgte die Filmentwicklung in dem Optimax X-Ray Film Processor (Tabelle A.2).

#### **3.4.4.5 Strippen**

Um die primären und sekundären Antikörper gegen Poly-Ubiquitin von der Membran zu lösen und auf derselben  $\beta$ -Aktin als Referenzprotein zu detektieren, erfolgte das Strippen der Membran. Dafür wurde diese 45 min bei 50 °C in Strip-Puffer (Tabelle A.21) inkubiert. Anschließend erfolgte das 2-malige Waschen in TBS-T-Puffer für jeweils 5 min, um die Membran erneut 1 h bei RT in Block-Puffer zu inkubieren.

#### **3.4.4.6 Immunodetektion von $\beta$ -Aktin**

Die Detektion des  $\beta$ -Aktins erfolgte in analoger Vorgehensweise zu der Detektion der poly-ubiquitinierten Proteine, wobei die Membran für 2 h bei RT mit dem entsprechenden primären Antikörper (Mouse-anti-actin, 1:400) (Tabelle A.33) inkubiert wurde, gefolgt von einer 1-stündigen Inkubation bei RT mit dem sekundären Antikörper (Goat anti-mouse IgG-HRP, 1:5000) (Tabelle A.33).

## 3.5 Molekularbiologische Methoden

### 3.5.1 Kreuzung transgener *C. elegans* Stämme mit dem Stamm TK22

Um die Promotoraktivität der *C. elegans* Gene *hsp-4* und *hsp-60* vor dem Hintergrund einer Mutation in dem Gen *mev-1* zu quantifizieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die transgenen *C. elegans* Stämme SJ4005 (Genotyp *zcls4 [hsp-4p::GFP] V*) und SJ4058 (Genotyp *zcls9 [hsp-60p::GFP] V*) mit dem Stamm TK22 (Genotyp *mev-1(kn1)*) gekreuzt. Die Kreuzung wurde nach Fay [140] durchgeführt. Da eine Kreuzung verschiedener Stämme immer eine Verpaarung voraussetzt, war es zunächst nötig eine Population männlicher *C. elegans* Nematoden zu erhalten. Im Anschluss an die Kreuzung wurden mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR; engl. *polymerase chain reaction*) und Restriktions-Verdau mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese solche Nematoden selektiert, die ein *gfp*-Transgen sowie das *mev-1(kn-1)*-Allel aufwiesen und für beide Merkmale homozygot waren. Die PCR wurde ausgehend von genomischer DNA, die durch Lyse eines einzelnen Nematoden gewonnen wurde, durchgeführt und wird somit als *single worm PCR* (SW-PCR) bezeichnet. Da die Transgene *gfp*-Reportergene, die an den Promotor des jeweiligen Hitzeschockproteins gekoppelt sind, darstellen, erfolgte der Nachweis der Expression und somit einer erfolgreichen Kreuzung zusätzlich durch die fluoreszenzoptische Detektion von GFP (Kapitel 3.3.2). Um die Expression der Gene zu stimulieren, wurden die Nematoden zuvor unter Hitzestress gesetzt. Dieser Schritt entfiel bei der Expressionsanalyse, wie sie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben ist.

#### 3.5.1.1 Herstellung und Kultivierung männlicher *C. elegans* Nematoden

Männliche *C. elegans* Nematoden treten in einer Wildtyp Population mit einer sehr niedrigen Häufigkeit auf (siehe Abschnitt 1.4.2), die jedoch durch Hitzeschock-Behandlung junger Hermaphroditen gesteigert werden kann [139, 140]. Unter erhöhten Temperaturen steigt die Frequenz der fehlerhaften X-Chromosomen Segregation in Keimzellen, die der Meiose unterlaufen. So wird die Entstehung von X0-Gameten (siehe Abschnitt 1.4.2) begünstigt [140]. In der vorliegenden Arbeit wurden im L4-Stadium befindliche *C. elegans* N2 Hermaphroditen für 4 h einem Hitzestress von 34 °C ausgesetzt. Dafür wurde eine gut bewachsene NGM-Agarplatte (Abschnitt 3.1) mit einer hohen Dichte an L4-Larven verwendet. Anschließend wurde die Agarplatte unter Standard-Bedingungen aufbewahrt, um die Eiablage der Hermaphroditen und das Schlüpfen der Larven abzuwarten. Mit Hilfe eines Stereomikroskops erfolgte die phänotypische Selektion der

männlichen Nematoden. Um diese letztendlich fortlaufend zu kultivieren, wurden in regelmäßigen Abständen 5 bis 6 männliche Nematoden mit 1 bis 2 Hermaphroditen auf einer kleinen NGM-Agarplatte (Abschnitt 3.1.1) zusammengebracht. Eine hohe Reproduktionsrate konnte gewährleistet werden, indem dabei Nematoden, die höchstens das jungadulte Stadium erreicht hatten, ausgewählt wurden. Dies war besonders bezüglich der Hermaphroditen von Bedeutung. Die Kultivierung fand unter Standard-Bedingungen statt.

### 3.5.1.2 Kreuzung und Selektion

Im ersten Schritt der Kreuzung wurden männliche N2 Nematoden mit Hermaphroditen des transgenen Stamms verpaart. Die aus dieser Verpaarung hervorgehenden männlichen Nachkommen waren *gfp*-heterozygot und wurden mit TK22 Hermaphroditen verpaart (Parenteralgeneration (P-Generation)). Die so generierte erste Filialgeneration (F<sub>1</sub>-Generation) war aufgrund der für das *mev-1(kn-1)*-Allel homozygoten Hermaphroditen der P-Generation vollständig heterozygot für dieses. Somit wurden aus der F<sub>1</sub>-Generation zunächst solche Nematoden selektiert, die zudem ein *gfp*-Transgen enthielten. Ausgehend von dieser Auswahl wurde die F<sub>2</sub>-Generation herangezogen, um auch aus dieser Hermaphroditen zu selektieren, die das *gfp*-Transgen enthielten und gleichzeitig für das *mev-1(kn-1)*-Allel homozygot waren. Um einen Hermaphroditen zu selektieren, der die Reinerbigkeit für beide Merkmale aufwies und für die Generierung einer homozygoten Population herangezogen werden konnte, wurde die F<sub>3</sub>-Generation dieser *mev-1(kn-1)*-homozygoten Auswahl kultiviert und auf *gfp*-Homozygotie untersucht.

Die Selektion von Nematoden, die das *gfp*-Transgen enthielten, wurde mittels PCR mit *gfp*-spezifischen Primern (Tabelle A.34) durchgeführt. Durch statistische Analyse wurde festgelegt, dass bei 25 von 25 Nematoden einer Generation das *gfp*-Transgen nachzuweisen war, um die *gfp*-Homozygotie festzustellen. Auch für die Selektion von *mev-1(kn-1)*-homozygoten Nematoden wurde zunächst eine PCR mit *mev-1*-spezifischen Primern (Tabelle A.34) durchgeführt. Diese binden jedoch sowohl an das *mev-1*-Wildtyp-Allel, als auch an das *mev-1(kn-1)*-Allel des TK22-Stamms. Durch den Verdau des PCR-Produkts mit der Restriktionsendonuklease *Kpn2I* (*BspEI*) (Tabelle A.33) war eine Unterscheidung der Allele möglich.

### 3.5.1.3 Lyse

Für die SW-PCR (Abschnitt 3.5.1.4) wurde die genomische DNA eines einzelnen Nematoden als Template verwendet. Um einen einzelnen Nematoden zu lysieren, wurde dieser in 2 µl Lyse-Puffer II (Tabelle A.24) aufgenommen und in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt. In dem Thermocycler Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Tabelle A.2) erfolgte die Lyse für 1 h bei 60 °C mit anschließender 15-minütiger Inkubation bei 90 °C, um den Lyse-Vorgang zu beenden. Das Wurm-Lysat war bei -20 °C lagerfähig.

### 3.5.1.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die SW-PCR wurde mit dem KAPA2G Fast Hotstart PCR Kit (Tabelle A.32) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Herstellung eines PCR Mastermixes aus H<sub>2</sub>O, Puffer, dNTPs, spezifischen *gfp*- oder *mev-1*-Primern (Tabelle A.34) und der KAPA2G Fast Hot Start DNA-Polymerase. Der Mastermix wurde in die PCR-Reaktionsgefäße aliquotiert, in denen die genomische DNA, gewonnen aus der Lyse eines Nematoden (Abschnitt 3.5.1.3), als Template vorgelegt war.

Ein Reaktionsansatz von 25 µl enthielt die folgenden Bestandteile:

2 µl genomische DNA aus der Lyse

5 µl KAPA2G Puffer [5x]

0,5 µl KAPA2G dNTP Mix [40 mM]

1,25 µl forward Primer [10 µM]

1,25 µl reverse Primer [10 µM]

0,1 µl KAPA2G Fast Hotstart Polymerase [5 U/µl]

14,9 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H<sub>2</sub>O

Die PCR wurde in dem Thermocycler Veriti® 96 Well Thermal Cycler mit den in Tabelle 3.3 aufgeführten Einstellungen durchgeführt. Die Annealing-Temperatur war dabei abhängig von dem verwendeten Primer-Paar.

Tabelle 3.3: Zyklusbedingungen der PCR

Stufe	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	
Annealing	60 °C für <i>gfp</i>	15 s	30
	52 °C für <i>mev-1</i>		
Elongation	72 °C	1 s	

Das PCR-Produkt wurde bei -20 °C gelagert.

### 3.5.1.5 Restriktions-Verdau

Um das *mev-1(kn-1)*-Allel des *C. elegans* Stamm TK22 zu detektieren, wurde das Amplifikat der *mev-1*-spezifischen PCR mit der Restriktionsendonuklease *Kpn2I* (*BspEI*) (Tabelle A.33) verdaut. *KPN2I* benötigt eine T<sup>^</sup>CCGGA Schnittstelle, die durch die Punktmutation in dem *mev-1(kn-1)*-Allel nicht zur Verfügung steht. Demnach lag das Amplifikat des *mev-1*-Wildtyp-Allels im Anschluss an den Verdau in 2 kleineren Fragmenten vor, während das des *mev-1(kn-1)*-Allels unverdaut blieb und in der Größe des PCR-Produkts zu detektieren war (siehe Abbildung 3.3 (B)). Für den Verdau wurde zunächst ein Mastermix hergestellt, um diesen zu einer definierten Menge des *mev-1*-Amplifikats hinzuzufügen.

Ein Reaktionsansatz von 31 µl enthielt die folgenden Bestandteile:

10 µl *mev-1*-Amplifikat

18 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

2 µl Tango Puffer [10x]

1 µl *Kpn2I* (*BspEI*)[10 U/µl]

Der Verdau fand in dem Thermocycler Veriti® 96 Well Thermal Cycler mit den in Tabelle 3.4 aufgeführten Konditionen statt.

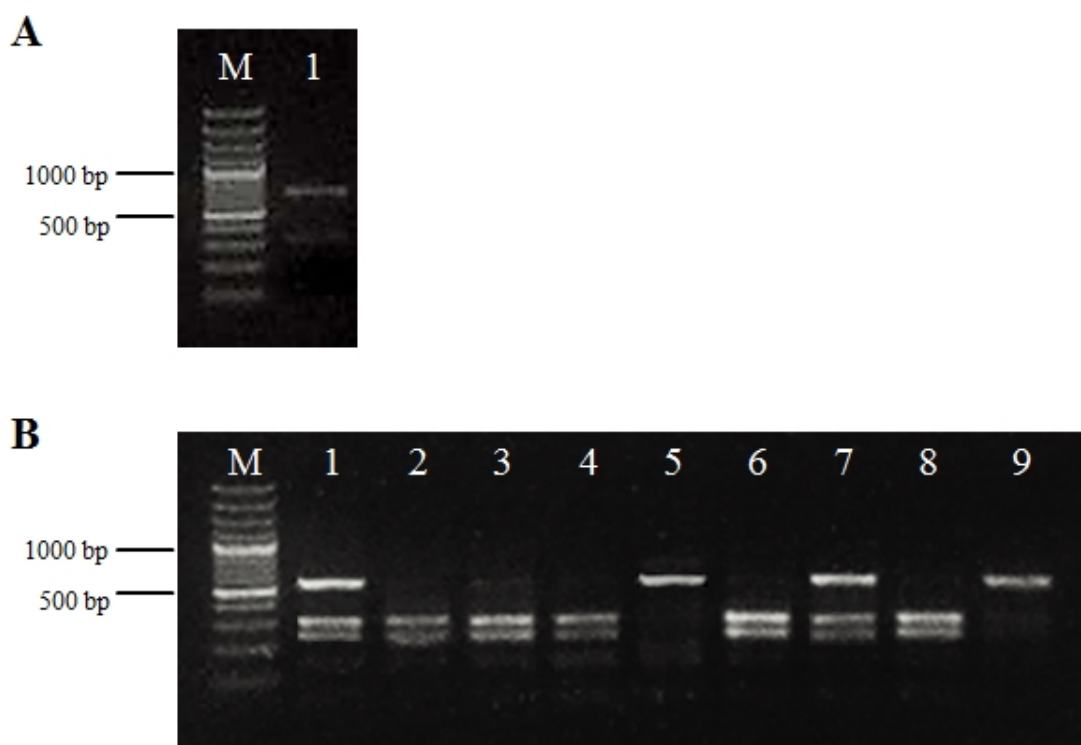
**Tabelle 3.4: Konditionen des Restriktionsverdau durch *Kpn2I* (*BspEI*)**

<b>Stufe</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
Verdau	55 °C	2 bis 16 h
Inaktivierung	80 °C	20 min

Das Produkt war bei -20 °C lagerfähig.

### 3.5.1.6 DNA-Gelelektrophorese

Für die DNA-Gelelektrophorese wurde ein Gel, bestehend aus 2 % Agarose in TAE-Puffer (Tabelle A.22) verwendet. Die Zugabe von 1 x SYBR<sup>®</sup> Safe (Tabelle A.3) war notwendig, um die DNA, die vor der Beladung des Gels mit 6x DNA-Beladungspuffer (Tabelle A.3) vermischt wurde (Verdünnung 1:6), zu visualisieren. Ein Größenmarker (Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder) (Tabelle A.3) wurde ebenfalls aufgetragen. Die DNA-Auftrennung erfolgte 1 h bei 80 bis 100 V. Für die Detektion der DNA wurde ein VisiBlue Transilluminator (Tabelle A.2) verwendet und das Gel wurde mit Hilfe der Kamera MotiCam 2500 (Tabelle A.2) dokumentiert. Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch die Dokumentation einer DNA-Gelelektrophorese nach *gfp*-Amplifikation (A) sowie nach *mev-1*-Amplifikation mit anschließendem Restriktionsverdau durch *Kpn2I* (B).



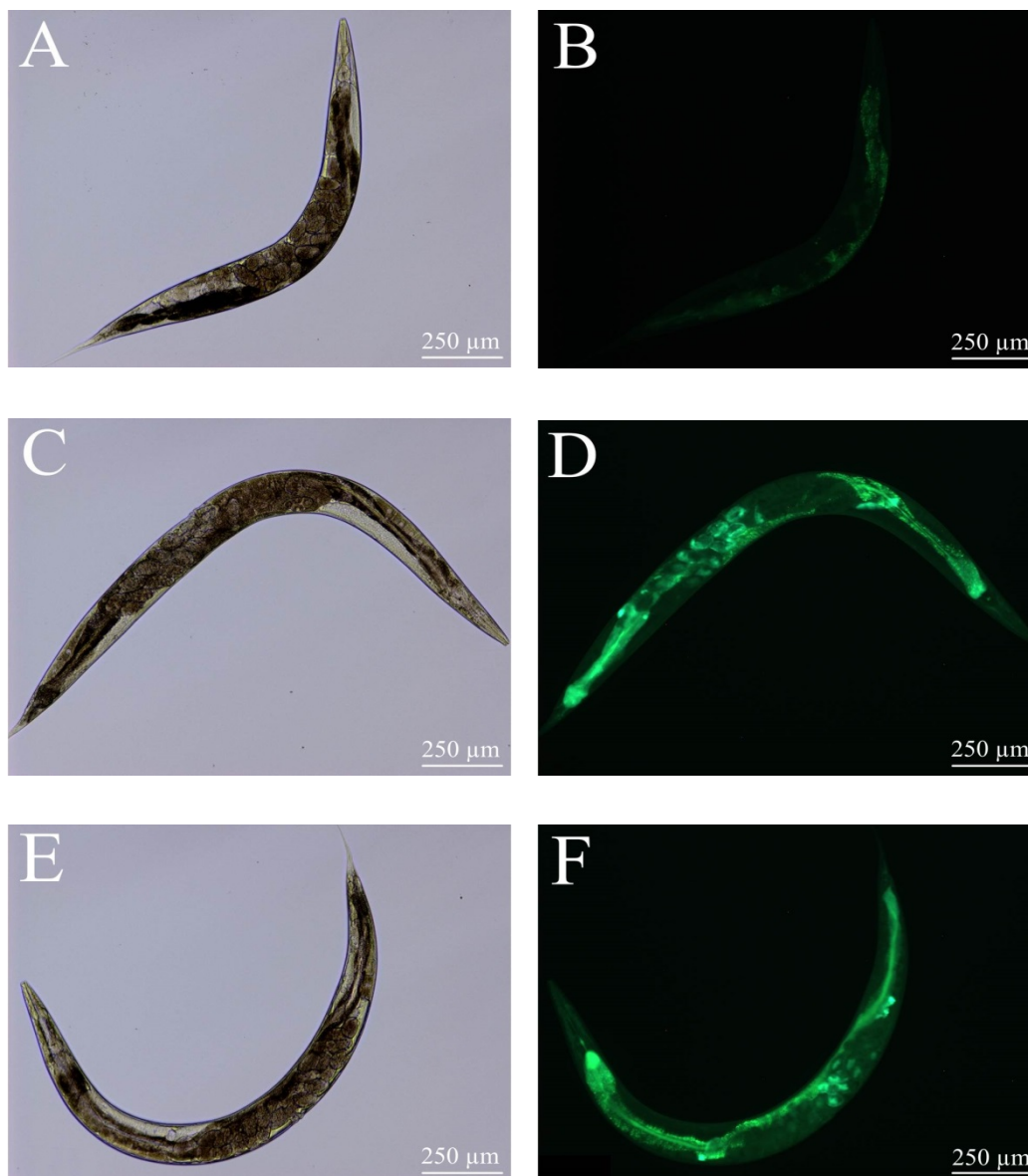
**Abbildung 3.3: DNA-Gelelektrophorese eines *gfp*-Amplifikats sowie von *mev-1*-Amplifikaten nach anschließendem Verdau durch *Kpn2I***

(A) SW-PCR Amplifikation von *gfp* mit den genspezifischen Primern GFP-fw-111 und GFP-rv-794. Amplifikat (Spur 1) bei 683 bp. (B) SW-PCR Amplifikation von *mev-1* mit den genspezifischen Primern *mev-1-fw-24* und *mev-1-rv-573* mit anschließendem Restriktionsverdau durch *Kpn2I*. Verdau des *mev-1* Gens im Wildtyp N2 resultierte in 2 Fragmenten einer Größe von 250 bp und 300 bp (Spur 2, 3, 4, 6 und 8). Das Amplifikat des *mev-1 (kn-1)* Gens des Stamms TK22 wird durch *Kpn2I* nicht verdaut. Es verblieb das PCR-Amplifikat in einer Größe von 549 bp bei homozygoten Individuen (Spur 5 und 9). Heterozygote Individuen wiesen entsprechend 3 Fragmente auf (Spur 1 und 7). M = Marker (Fermentas Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder)

### 3.5.1.7 Hitzestress

Eine erfolgreiche Kreuzung hinsichtlich der Transgene, welche die Promotoren der für die Hitzeschock-Proteine HSP-4 und HSP-60 kodierenden Gene beinhalten, wurde abschließend durch einen Hitzestress nachgewiesen. Die GFP-Expression, gemessen anhand der relativen GFP-Fluoreszenz, wurde dabei mit der entsprechenden Promotoraktivität gleichgesetzt. Dafür erfolgte die Ermittlung der GFP-Fluoreszenz in den Nematoden nach 1 h Hitzestress (35 °C) nachdem in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Prinzip. Als Kontrolle dienten TK22 Nematoden. Abbildung 3.4 zeigt eine mikroskopische Durchlicht-Aufnahme und eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei einer Emission

von 525 nm (Em) nach Anregung bei 470 nm (Ex) eines TK22 Nematoden und jeweils eines durch Kreuzung entstandenen SJ4005xTK22 und SJ4058xTK22 Nematoden.



**Abbildung 3.4: Mikroskopische Aufnahmen von *C. elegans* TK22, SJ4005xTK22 und SJ4058xTK22**

Mikroskopische Durchlicht-Aufnahme und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Ex 470 nm; Em 525 nm) von *C. elegans* TK22 (A und B), SJ4005xTK22 (*hsp-4p::GFP*) (C und D) und SJ4058xTK22 (*hsp-60p::GFP*) (E und F) nach Hitzestress (1 h 35 °C).

### 3.5.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR; engl. *quantitative real-time PCR*) ist eine Standard-Methode zur Quantifizierung von DNA in Echtzeit. Dabei wird zunächst durch



den Einsatz einer reversen Transkriptase mRNA in *complementary DNA* (cDNA) transkribiert, um diese im nächsten Schritt mittels PCR zu amplifizieren und letztendlich in Echtzeit zu quantifizieren. Für die Quantifizierung wurde der an die dsDNA bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Während der Amplifikation nimmt das Fluoreszenz-Signal proportional zu der Menge des Amplifikats zu. Die Quantifizierung erfolgte dabei im relativen Verhältnis zu dem Referenzgen 18S. Die qRT-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, um die Expression von *hsp-4* und *pek-1* in *C. elegans* zu quantifizieren. Um dies zu erreichen, wurde zunächst die RNA, wie im Folgenden beschrieben, isoliert (Absatz 3.5.2.1).

### 3.5.2.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Roti®-Prep RNA MINI-Kit (Tabelle A.32) durchgeführt. Dafür wurde pro Behandlungsgruppe mindestens eine 24-Well-Mikrotiterplatte mit jeweils etwa 2500 Nematoden benötigt (Abschnitt 3.1.4). Zunächst wurden die Nematoden zweimal mit M9-Puffer gewaschen. Nach dem vollständigen Entfernen des Überstands erfolgte die Resuspendierung des Nematoden-Pellets in 450 µl Lysis-Puffer-LSR, der Bestandteil des Kits war. Anschließend wurden die Nematoden in Lysis-Puffer in ein 2 ml Precellys Schraubdeckelgefäß überführt und bei -80 °C für mindestens 24 h eingefroren. Für die RNA-Isolierung wurden die Nematoden zunächst wieder auf RT gebracht. Es erfolgte die Zugabe von 600 mg Precellys Keramik-Kügelchen in das Schraubdeckelgefäß jeder Probe, um anschließend die Homogenisierung im Precellys 24-Dual Homogenisator für 2x 20 sec bei 5400 rpm mit 10 sec Pause zu starten. Anschließend wurde das Homogenat bei 1400 rpm für 2 min zentrifugiert. Die Isolierung der im Überstand befindlichen RNA erfolgte entsprechend des Roti®-Prep RNA MINI-Manuals und basierte auf der RNA-Aufreinigung mit Hilfe unterschiedlicher Aufreinigungssäulen.

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und durch Verdünnung mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 0,01 ng/µl zur Quantifizierung der 18S RNA und 10 ng/µl zur Quantifizierung der Gen-spezifischen mRNA eingestellt.

### 3.5.2.2 qRT-PCR

Die qRT-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit (Tabelle A.32) durchgeführt. Dieses *1-Step* Kit ermöglicht die reverse Transkription mit anschließender PCR in einem Schritt. Die Ansätze hatten ein Volumen von 10 µl und setzten sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

5 µl SYBR Green I Mastermix

0,4 µl Reverse Transkriptase [200 U/µl]

0,75 µl Forward Primer [1 µM]

1,25 µl Reverse Primer [1 µM]

1,6 µl nukleasefreies Wasser

1 µl Template-RNA

Zunächst wurde aus dem SYBR Green Mastermix, der reversen Transkriptase, dem nukleasefreien Wasser sowie den entsprechenden Primern ein Mastermix hergestellt, der in die qRT-PCR-Reaktionsgefäße (Rotor Gene Tubes für Rotor Gene-Q Real-time PCR Cycler) (Tabelle A.1) vorgelegt wurde. Jede Probe wurde separat mit 18S- sowie Gen-spezifischen Primern und jeweils in einer 4-fachen Bestimmung amplifiziert. Nach dem Hinzupipettieren der Template-RNA und dem Verschließen der Reaktionsgefäße wurde die qRT-PCR in dem Rotor Gene-Q Real-time PCR Cycler (Tabelle A.2) unter den in Tabelle 3.5 aufgeführten Konditionen gestartet.

**Tabelle 3.5: Zyklusbedingungen der qRT-PCR**

Stufe	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Reverse Transkription	50 °C	30 min	1
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Annealing	53 °C	1 min	40
Elongation	72 °C	30 sec	
Inkubation	95 °C	1 min	1
Schmelzkurve	55 °C bis 95 °C	jeweils 30 sec	

Die von der Rotor-Gene Q Series Software generierten Fluoreszenz-Kurven wurden automatisch in *Cycle Threshold* ( $C_T$ )-Werte überführt.  $C_T$ -Werte geben denjenigen Zyklus an, in dem das Fluoreszenzsignal einen definierten Grenzwert, der die Basis-Fluoreszenz eingrenzt, zum ersten Mal exponentiell überschreitet. Aufgrund der 4-fachen Bestimmung jeder Probe wurden zunächst Mittelwert und Standardabweichung der entsprechenden  $C_T$ -Werte berechnet. Für die relative Quantifizierung der Genexpression wurde die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewendet [228]. Dafür wurden die  $C_T$ -Werte der Proben, die mit Primern spezifisch für das Zielgen amplifiziert wurden, von den  $C_T$ -Werten der Proben, die mit Primern spezifisch für das Referenzgen amplifiziert wurden, subtrahiert ( $\Delta C_T$ ). Anschließend wurde der  $\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe von dem  $\Delta C_T$ -Wert der Behandlungsgruppe subtrahiert ( $\Delta\Delta C_T$ ), um letztendlich die relativen Expressionsunterschiede durch eine Ratio der  $\Delta\Delta C_T$ -Werte (*fold change*) zu ermitteln.

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Behandlungsgruppe} - \Delta C_T \text{ Kontrollgruppe}$$

$$\textit{fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

### 3.6 Statistische Auswertung

Für jeden Versuch wurden mindestens drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5 (Tabelle A.35). Folgende Signifikanzniveaus wurden festgelegt:

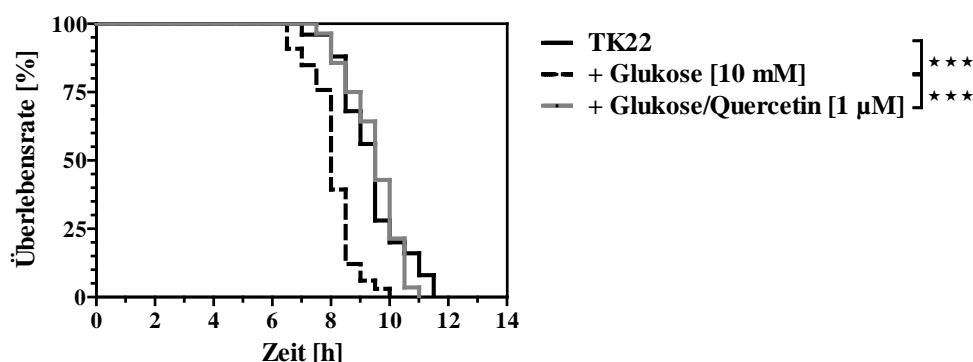
$p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*)

Die Ergebnisse der Bestimmung der Überlebenszeit unter Hitzestress wurden in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und mittels Mantel-Haenszel Logrank-Test analysiert.

Die Ergebnisse der Quantifizierung von Lysosomen mit LysoTracker® Red, der Expressionsanalyse mit GFP-Reportergenen, der Messung der spezifischen Proteasomaktivität sowie der qRT-PCR wurden auf die Kontrolle normalisiert und als Balkendiagramme mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD; engl. *standard deviation*) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels unpaarigem t-Test oder einfaktorierter Varianzanalyse (ANOVA) und *Bonferroni's multiple comparison test*.

## 4 Ergebnisse

Glukose-induzierte Schädigungen sind die Ursache diabetischer Komplikationen. Der Stamm TK22 des Nematoden *C. elegans* wurde in dieser Arbeit verwendet, um die molekularen Mechanismen der Glukosetoxizität sowie der Prävention von Glukose-induzierten Schädigungen durch das Polyphenol Quercetin zu untersuchen. Dafür wurde zunächst der Einfluss von Glukose in Ab- und Anwesenheit von Quercetin auf die Überlebenszeit von TK22 bei 37 °C bestimmt. Glukose bewirkte bereits in einer Konzentration von 10 mM eine signifikante Verkürzung der Überlebenszeit von TK22 unter Hitzestress. Durch die zusätzliche Applikation von 1 µM Quercetin wurde die durch Glukose verursachte Minderung der Stressresistenz von TK22 vollständig verhindert. Diese bereits publizierten Ergebnisse (Publikation 1, Appendix B.1) wurden zunächst einleitend verifiziert (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1: Quercetin verhindert die Glukose-induzierte Minderung der Stressresistenz von TK22**

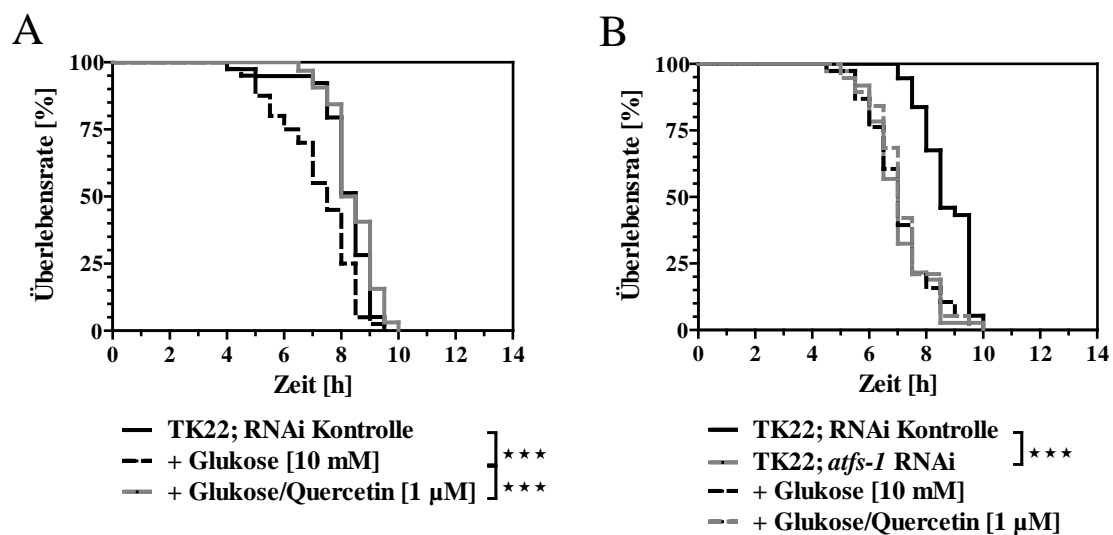
Überlebenszeit unter Hitzestress (37 °C) von *C. elegans* TK22 nach 48-stündiger Inkubation mit 10 mM Glukose in Ab- und Anwesenheit von 1 µM Quercetin. \*\*\* $p < 0.001$

## 4.1 Quercetin interagiert mit der UPR<sup>mt</sup>

Die UPR<sup>mt</sup> ist eine Stressantwort, die in *C. elegans* über die Aktivierung der Expression der mitochondrialen Chaperone HSP-6 und HSP-60 die Proteinhomöostase aufrechterhält. Die Promotoraktivität der entsprechenden Gene wird dabei über DVE-1, UBL-5 sowie ATFS-1 reguliert. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die RNAi einiger Schlüsselfaktoren der UPR<sup>mt</sup> zu einer Überlebenszeitverkürzung des Stamms TK22 führte, in gleichem Ausmaß wie die Inkubation mit Glukose. Die Applikation von Glukose unter RNAi resultierte dabei in keiner weiteren Verkürzung der Überlebenszeit [184]. Des Weiteren verhinderte die RNAi solcher Faktoren die Verlängerung der Überlebenszeit durch Quercetin (Publikation 1; Appendix B.1). Im Folgenden wird dieser Zusammenhang exemplarisch für die RNAi von *atfs-1* dargestellt.

Um zunächst zu zeigen, dass durch die Verfütterung der für die RNAi verwendeten *E. coli* HT115 keine signifikante Beeinflussung im Vergleich zur Verfütterung von *E. coli* OP50 verursacht wurde, erfolgte die Ermittlung der Überlebenszeit von TK22 bei 37 °C unter Verfütterung der HT115 Vektor-Kontrolle (RNAi Kontrolle) und nach Exposition gegenüber Glukose in Ab- und Anwesenheit von Quercetin. Wie in Abbildung 4.2 (A) gezeigt ist, führte die Inkubation von TK22 mit 10 mM Glukose auch unter Verfütterung der *E. coli* HT115 zu einer signifikanten Verkürzung der Lebensspanne unter Hitzestress. Die zusätzliche Inkubation mit 1 µM Quercetin verlängerte die Überlebenszeit auf den Wert der Kontrolle.

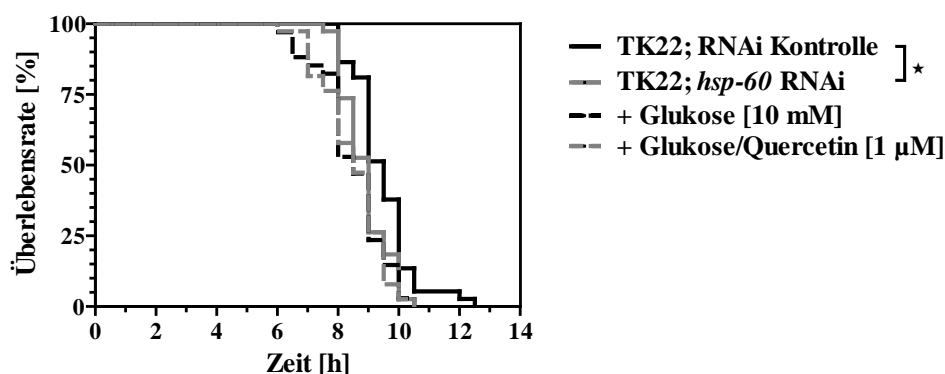
Die RNAi des Transkriptionsfaktors *atfs-1* bewirkte eine signifikante Verkürzung der Überlebenszeit bei 37 °C (Abbildung 4.2 (B)). Weder die Inkubation mit 10 mM Glukose, noch die zusätzliche Inkubation mit 1 µM Quercetin hatten einen Effekt auf die Lebensspanne von TK22 unter *atfs-1* RNAi und Hitzestress. Daher ist die Verlängerung der Überlebenszeit durch Quercetin in Anwesenheit von Glukose als abhängig von *atfs-1* zu bezeichnen.



**Abbildung 4.2: Quercetin verlängert die Überlebenszeit von TK22 nicht mehr nach *atfs-1* RNAi**

Überlebenszeit unter Hitzestress (37 °C) von *C. elegans* TK22 unter Vektor-Kontrolle (A) sowie *atfs-1* RNAi (B) und nach 48-stündiger Inkubation mit 10 mM Glukose in Ab- und Anwesenheit von 1 µM Quercetin. \*\*\*p < 0.001

Um auszuschließen, dass Quercetin die Überlebenszeit von TK22 aufgrund einer RNAi-bedingten unspezifischen Schädigung nicht mehr steigert, wurde eine RNAi mit verdünnter *hsp-60* dsRNA (1:10) durchgeführt. Die RNAi für *hsp-60* bewirkte unverdünnt eine hoch signifikante Verkürzung der Überlebenszeit [184]. Wie Abbildung 4.3 zeigt, resultierte auch die abgeschwächte RNAi von *hsp-60* in einer signifikanten Verkürzung der Lebensspanne unter Hitzestress von TK22. Wiederum verhinderte die RNAi auch in verdünnter Anwendung eine weitere Verkürzung der Überlebenszeit durch 10 mM Glukose sowie eine Verlängerung dieser durch 1  $\mu$ M Quercetin. Durch dieses Ergebnis wird *hsp-60* als Zielgen des Quercetins ausgewiesen. Außerdem wird bestätigt, dass die Minderung der Stressresistenz nach *hsp-60* RNAi auf dem Funktionsverlust des Gens beruht.



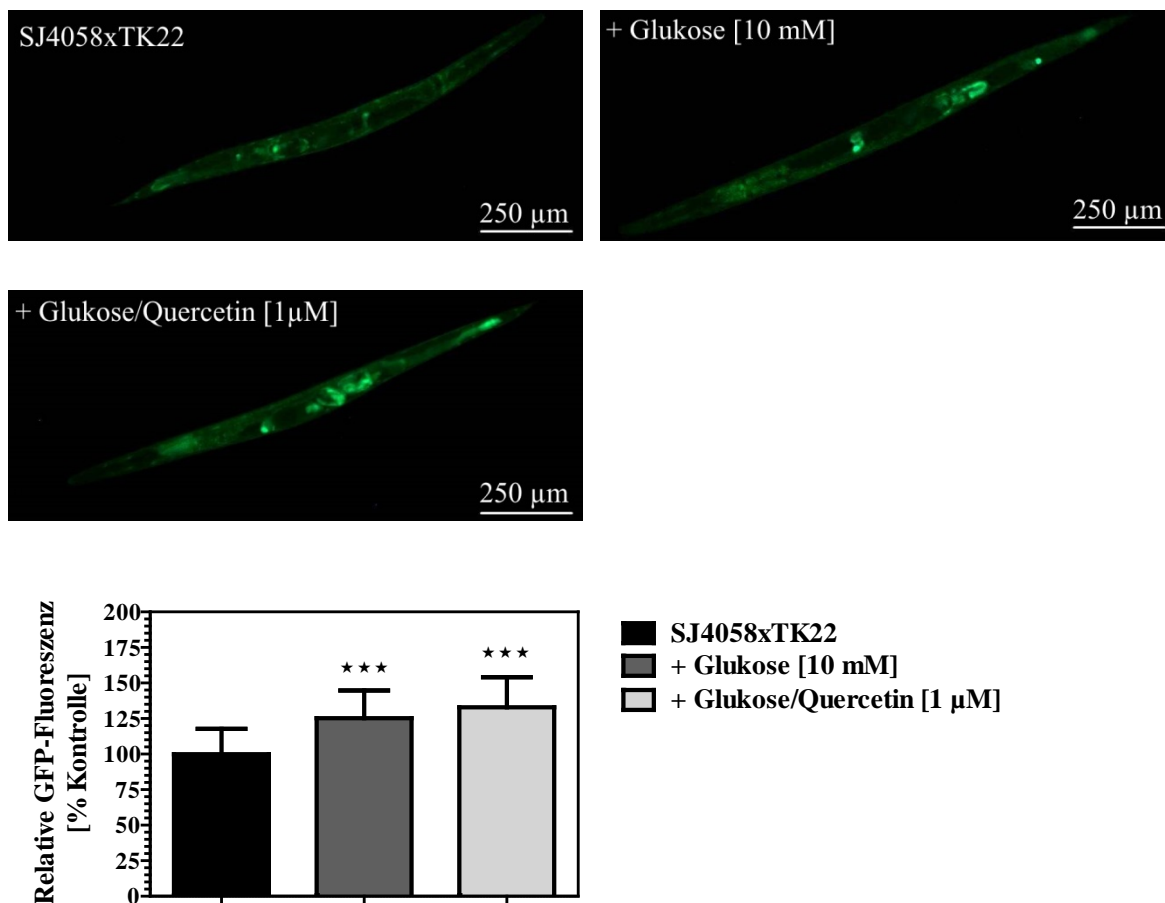
**Abbildung 4.3: Quercetin verlängert die Überlebenszeit von TK22 auch nicht mehr nach verdünnter *hsp-60* RNAi**

Überlebenszeit unter Hitzestress (37 °C) von *C. elegans* TK22 unter verdünnter *hsp-60* RNAi (1:10) und nach 48-stündiger Inkubation mit 10 mM Glukose in Ab- und Anwesenheit von 1  $\mu$ M Quercetin. \*p < 0.05

Nachdem die Notwendigkeit des Vorliegens von HSP-60 für die gesteigerte Stressresistenz von TK22 durch Quercetin gezeigt wurde, sollte im Folgenden festgestellt werden, ob das Polyphenol zu einer gesteigerten Expression von HSP-60 führt. Die Untersuchungen erfolgten mit dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Stamm SJ4058xTK22, der GFP unter der Kontrolle des *hsp-60* Promotors exprimiert (vergleiche Abschnitt 3.5.1). Wie Abbildung 4.4 zeigt, führte die 48-stündige Inkubation mit 10 mM Glukose zu einer signifikanten Steigerung der relativen GFP-Fluoreszenz um  $25 \pm 19$  % verglichen mit der Kontrolle. Die zusätzliche Inkubation mit Quercetin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die durch Glukose erhöhte Promotoraktivität. Es kann daher postuliert werden, dass HSP-60 in Gegenwart von Glukose durch Quercetin nicht auf Transkriptionsebene



beeinflusst wird. Die durch Glukose bedingte Steigerung der *hsp-60* Expression in TK22 lässt sich als Aktivierung der UPR<sup>mt</sup> interpretieren, die jedoch nicht effizient genug ist, um die Verkürzung der Lebensspanne durch die Glukose-Applikation zu verhindern.



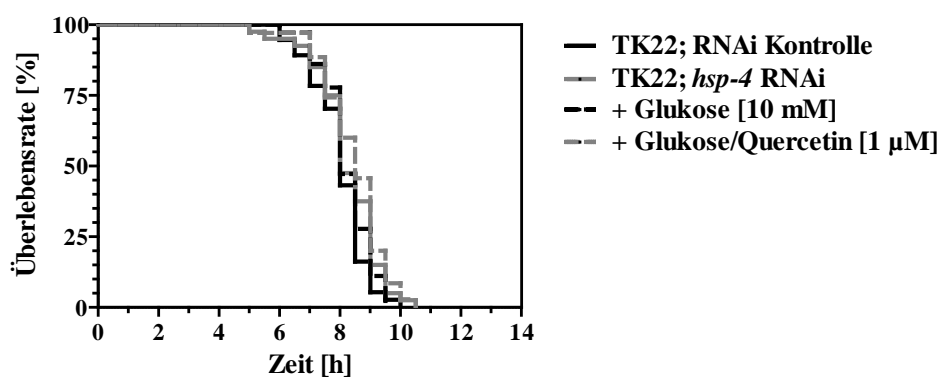
**Abbildung 4.4: Quercetin beeinflusst nicht die *hsp-60* Promotoraktivität in TK22 in Anwesenheit von Glukose**

Relative GFP-Fluoreszenz in *C. elegans* SJ4058xTK22 (*hsp-60p::GFP*) nach 48-stündiger Inkubation mit 10 mM Glukose in Ab- und Anwesenheit von 1 μM Quercetin. \*\*\*p < 0.001 vs. Kontrolle

## 4.2 UPR<sup>ER</sup>-Zielgene des Quercetins

Durch die Akkumulation von un- oder fehlgefalteten Proteinen im ER wird in *C. elegans* die UPR<sup>ER</sup> als eine Stressantwort aktiviert, die durch eine erhöhte Chaperon-Expression, ähnlich den Gegebenheiten in Mitochondrien, die Proteinhomeostase bewirkt. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst mittels RNAi die Bedeutung von Mitgliedern der UPR<sup>ER</sup> für die Überlebenszeit von *C. elegans* TK22 unter Glukoseexposition in Ab- und Anwesenheit von Quercetin untersucht.

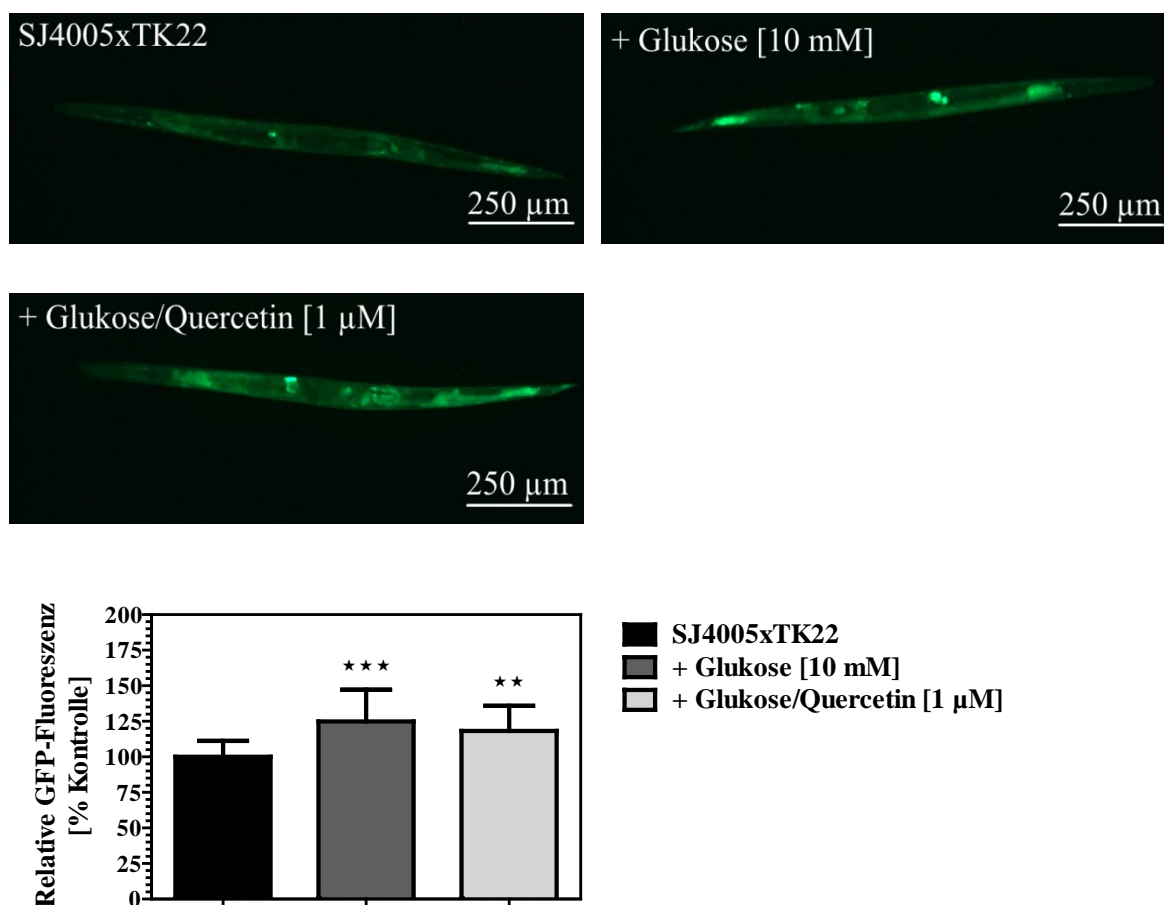
Das Chaperon HSP-4, ein Protein aus der HSP-70 Familie, wird in *C. elegans* als ein zentrales Element der Stressantwort innerhalb des ERs postuliert. Die verminderte Expression des ER-spezifischen Chaperons durch RNAi zeigte keinen Einfluss auf die Lebensspanne von TK22. Allerdings bewirkte auch die Gabe von Glukose unabhängig der Präsenz des Quercetins keinerlei Beeinflussung der Überlebenszeit mehr (Abbildung 4.5). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Aktivierung protektiver Mechanismen als Folge der *hsp-4* RNAi die Glukosetoxizität verhindert und Quercetin nur unter besonderen Stressbedingungen die Überlebenszeit von TK22 verlängert.



**Abbildung 4.5: RNAi von *hsp-4* verhindert die Glukosetoxizität in TK22**

Überlebenszeit unter Hitzestress (37 °C) von *C. elegans* TK22 unter *hsp-4* RNAi und nach 48-stündiger Inkubation mit 10 mM Glukose in Ab- und Anwesenheit von 1 µM Quercetin.

Wie schon für das mitochondriale HSP-60 beschrieben wurde auch für das im ER lokalisierte Chaperon HSP-4 untersucht, ob Quercetin über eine Steigerung der Expression eine Verlängerung der Überlebenszeit in Glukose-exponierten Nematoden verursacht. In dem Stamm SJ4005xTK22 wurde die GFP-Expression unter der Kontrolle des *hsp-4* Promotors bestimmt. Abbildung 4.6 zeigt, dass die 48-stündige Inkubation mit 10 mM Glukose zu einer signifikanten Steigerung der relativen GFP-Fluoreszenz um  $25 \pm 22\%$  verglichen mit der Kontrolle führte und diese durch die zusätzliche Inkubation mit  $1 \mu\text{M}$  Quercetin gegenüber der Kontrolle nicht weiter gesteigert wurde. Die durch Glukose verursachte Steigerung der HSP-4 Expression reichte offenbar wiederum nicht aus, um die Verkürzung der Überlebenszeit durch Glukose zu verhindern. Außerdem findet die Prävention der Glukose-vermittelten Überlebenszeitverkürzung durch Quercetin offenbar unabhängig von einer Beeinflussung der HSP-4 Expression statt.

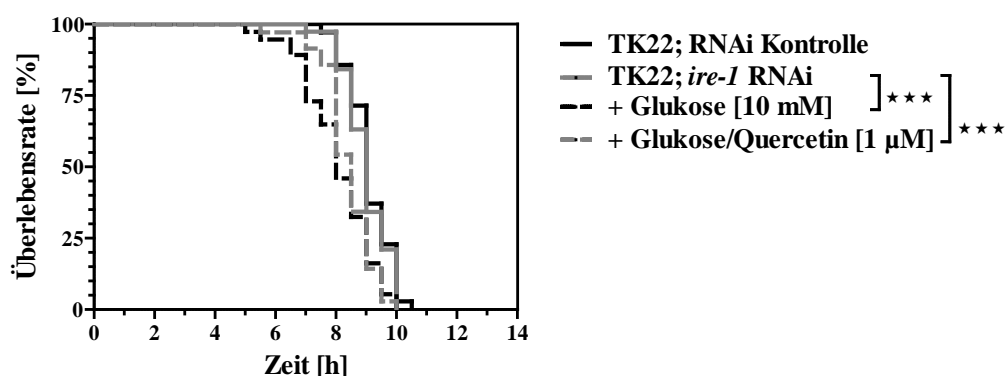


**Abbildung 4.6: Quercetin beeinflusst nicht die *hsp-4* Promotoraktivität in TK22 in Anwesenheit von Glukose**

Relative GFP-Fluoreszenz in *C. elegans* SJ4005xTK22 (*hsp-4p::GFP*) nach 48-stündiger Inkubation mit 10 mM Glukose in Ab- und Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  Quercetin. \*\*p < 0.01 und \*\*\*p < 0.001 vs. Kontrolle

Die RNAi von *xbp-1*, das einen zentralen Transkriptionsfaktor der UPR<sup>ER</sup> kodiert, resultierte in einer Verkürzung der Überlebenszeit unter Hitzestress von TK22. Die Glukoseapplikation bewirkte wiederum keine zusätzliche Überlebenszeitverkürzung [184] und auch die Verlängerung der Überlebenszeit durch Quercetin unter Exposition gegenüber Glukose und Hitze wurde durch die RNAi von *xbp-1* verhindert (Publikation 1; Appendix B.1). Gleiche Aussagen lassen sich für die RNAi der im Rahmen der UPR<sup>ER</sup> wichtigen Transmembranproteine aus der *abu*-Familie (*abu-1* und *abu-11*) treffen [184] (Publikation 1; Appendix B.1).

Die RNAi von *ire-1*, eine für das Spleißen der aktiven mRNA des Transkriptionsfaktors XBP-1 notwendige transmembrane Proteinkinase, zeigte erstaunlicherweise keinen Einfluss auf die Überlebenszeit von TK22 Nematoden (Abbildung 4.7). Die 48-stündige Inkubation mit 10 mM Glukose resultierte auch unter *ire-1* RNAi in einer signifikanten Verkürzung der Überlebenszeit, die jedoch durch die zusätzliche Inkubation mit 1 µM Quercetin nicht verlängert werden konnte. Obwohl die Aktivität von IRE-1 notwendig ist, um die mRNA von *xbp-1* zu spleißen resultierte die *ire-1* RNAi in keiner Verkürzung der Überlebenszeit von TK22, während jedoch die *xbp-1* RNAi diese reduzierte [184]. Zu postulieren wäre, dass die *ire-1* RNAi ebenso wie die *hsp-4* RNAi zu einer Aktivierung eines protektiven Signalwegs führt. Unabhängig davon benötigt Quercetin offensichtlich IRE-1, um die Stressresistenz unter Anwesenheit von Glukose zu erhöhen.

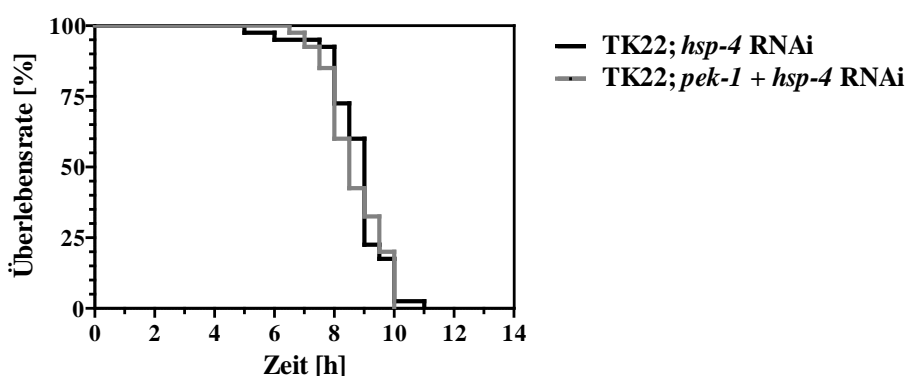


**Abbildung 4.7: Quercetin verlängert die Überlebenszeit von TK22 nicht mehr nach *ire-1* RNAi**

Überlebenszeit unter Hitzestress (37 °C) von *C. elegans* TK22 unter *ire-1* RNAi und nach 48-stündiger Inkubation mit 10 mM Glukose in Ab- und Anwesenheit von 1 µM Quercetin. \*\*\*p < 0.001

### 4.3 Kompensationsmechanismen im Rahmen der UPR<sup>ER</sup>

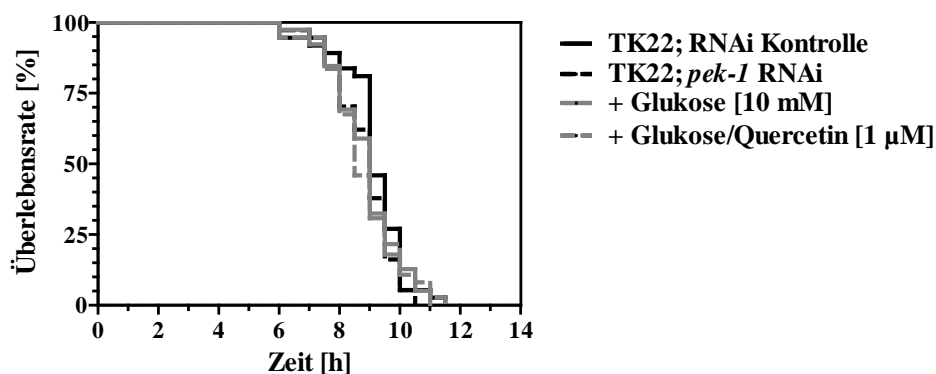
Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, führte die RNAi von *hsp-4* zu einer Blockierung der Glukosetoxizität in TK22. Um zu untersuchen, ob die verminderte *hsp-4* Expression durch eine Aktivierung des für die UPR<sup>ER</sup> zentralen Transmembranproteins PEK-1, das für eine Verringerung der Protein-Synthese im Rahmen von ER-Stress verantwortlich ist, kompensiert wird, wurde eine Doppel-RNAi von *pek-1* und *hsp-4* durchgeführt. Abbildung 4.8 zeigt, dass die zusätzliche RNAi von *pek-1* die Überlebenszeit gegenüber der *hsp-4* RNAi alleine nicht verkürzte. Eine Aktivierung von PEK-1 unter *hsp-4* RNAi, welche die unter der verminderten Expression von *hsp-4* beobachtete Stresskompensation erklären könnte, kann dadurch nicht bestätigt werden.



**Abbildung 4.8:** Die Aktivierung von Kompensationsmechanismen durch RNAi von *hsp-4* in TK22 ist unabhängig von *pek-1*

Überlebenszeit unter Hitzestress (37 °C) von *C. elegans* TK22 unter verdünnter *hsp-4* RNAi und Doppel-RNAi von *pek-1* und *hsp-4*.

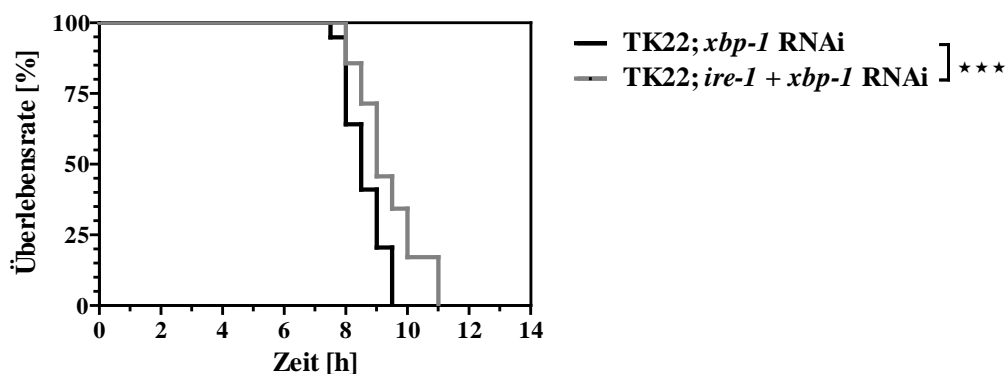
Tatsächlich scheinen auch durch die *pek-1* RNAi Kompensationsmechanismen aktiviert zu werden, die eine Glukosetoxizität vollständig verhindern, denn die verminderte Expression von PEK-1 zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Überlebenszeit von TK22 und der lebensverkürzende Effekt der Glukose wurde unterbunden (Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9: RNAi von *pek-1* verhindert die Glukosetoxizität in TK22**

Überlebenszeit unter Hitzestress (37 °C) von *C. elegans* TK22 unter *pek-1* RNAi und nach 48-stündiger Inkubation mit 10 mM Glukose in Ab- und Anwesenheit von 1 µM Quercetin.

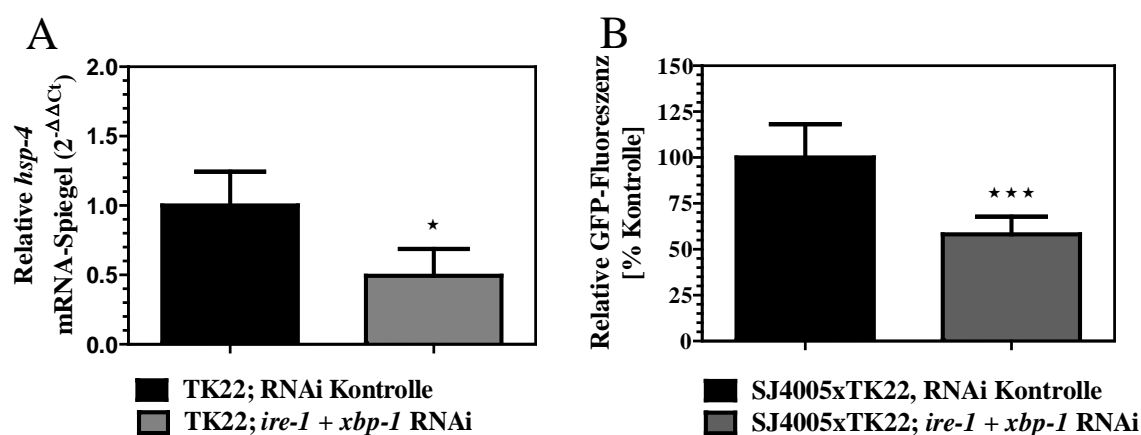
Auch die *ire-1* RNAi zeigte keinen Effekt auf die Überlebenszeit von TK22 (vergleiche Abschnitt 4.2), obwohl sie für die Aktivierung des XBP-1 Transkriptionsfaktors essentiell ist, dessen RNAi eine signifikante Verkürzung der Überlebenszeit von TK22 bewirkte [184]. Dementsprechend wurde für die *ire-1* RNAi ebenfalls die Aktivierung eines Kompensationsmechanismus postuliert. Die Aktivierung eines vom Spleißen der *xbp-1* mRNA unabhängigen Mechanismus durch *ire-1* RNAi wurde anhand einer Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* bestätigt. Wie Abbildung 4.10 zeigt, führte die Doppel-RNAi im Vergleich zu der verdünnten *xbp-1* RNAi zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit von *C. elegans* TK22. Die signifikante Lebensverkürzung durch die *xbp-1* RNAi wurde somit durch die zusätzliche Verminderung der *ire-1* Transkription aufgehoben.



**Abbildung 4.10: Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* verlängert die Überlebenszeit von TK22**

Überlebenszeit unter Hitzestress (37 °C) von *C. elegans* TK22 unter verdünnter *xbp-1* RNAi und Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1*. \*\*\* $p < 0.001$

Für die Verlängerung der Überlebenszeit von mit *xbp-1* RNAi behandelten Nematoden durch zusätzliche *ire-1* RNAi kann die Kompensation durch eine gesteigerte *hsp-4* Expression ausgeschlossen werden, denn sowohl die mRNA-Spiegel als auch die Aktivierung des *hsp-4* Promotors wurde durch die Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* signifikant vermindert. Es wurde eine Senkung der mRNA-Spiegel um  $51 \pm 19\%$  (Abbildung 4.11 (A)) und eine Verminderung der Promotoraktivität um  $42 \pm 10\%$  (Abbildung 4.11 (B)) verglichen mit der jeweiligen Kontrolle verzeichnet. Diese Ergebnisse zeigen zudem, dass XBP-1 einen Transkriptionsaktivator des *hsp-4* Promotors darstellt.

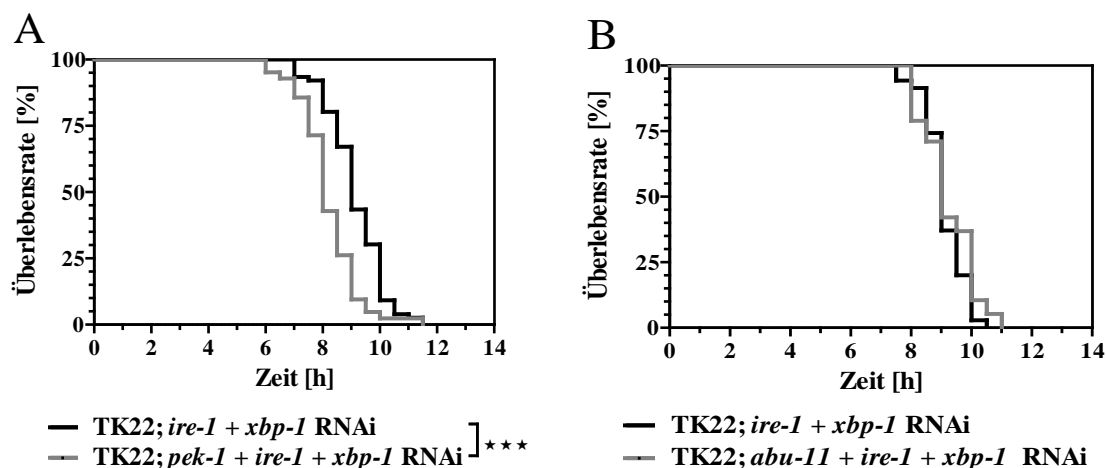


**Abbildung 4.11: XBP-1 als Transkriptionsfaktor des *hsp-4* Promotors in TK22**

Relative *hsp-4* Expression ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) in *C. elegans* TK22 unter Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1*. Die RNA wurde aus den Nematoden isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Mittels qRT-PCR mit den Primern *hsp-4*-qPCR-fw-14 und *hsp-4*-qPCR-rv-171 wurden die *hsp-4* Transkriptions-Spiegel bestimmt und quantifiziert (A). Relative GFP-Fluoreszenz in *C. elegans* SJ4005xTK22 (*hsp-4p::GFP*) unter Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1*. Um die Promotoraktivität zu stimulieren wurde der fluoreszenzmikroskopischen Analyse ein Hitzestress (1 h 35 °C) vorausgestellt (B). \* $p < 0.05$  und \*\*\* $p < 0.001$  vs. RNAi Kontrolle

Für die Verhinderung der durch *xbp-1* RNAi induzierten Lebenszeitverkürzung von TK22 durch die zusätzliche *ire-1* RNAi wurden weitere mögliche Kompensationsmechanismen untersucht. Dies geschah, indem zusätzlich zur *ire-1* und *xbp-1* Doppel-RNAi die Transkription von *pek-1* oder *abu-11* (exemplarisch für die Gene der *abu*-Familie) mittels RNAi vermindert wurde. Die Tripel-RNAi von *pek-1*, *ire-1* und *xbp-1* resultierte in einer signifikanten Verkürzung der Lebensspanne unter Hitzestress von TK22 im Vergleich zu der verdünnten Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* (Abbildung 4.12 (A)). Dies bedeutet, dass PEK-1 essentiell für die durch Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* verursachte Hormesis ist, sein funktioneller Verlust alleine jedoch ebenfalls hormetische Effekte im

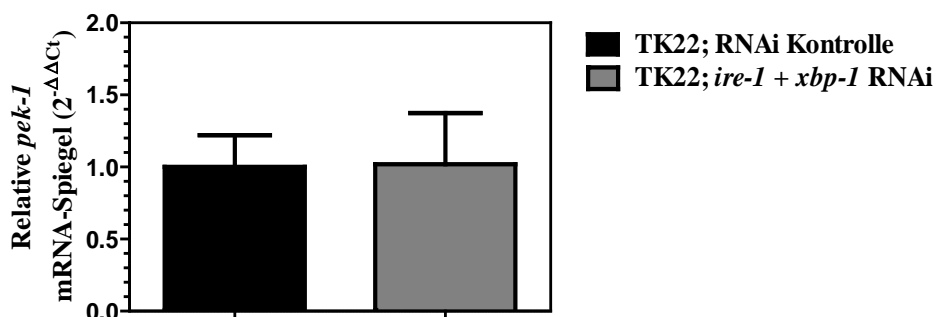
Rahmen der Glukosetoxizität bewirkt. Die Tripel-RNAi von *abu-11*, *ire-1* und *xbp-1* beeinflusste die Lebenspanne unter verdünnter Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* nicht (Abbildung 4.12 (B)).



**Abbildung 4.12: Die Verlängerung der Überlebenszeit von TK22 durch *ire-1* und *xbp-1* Doppel-RNAi wird verhindert durch *pek-1* RNAi**

Überlebenszeit unter Hitzestress (37 °C) von *C. elegans* TK22 unter verdünnter Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* und Tripel-RNAi von *pek-1*, *ire-1* und *xbp-1* (A) sowie *abu-11*, *ire-1* und *xbp-1* (B). \*\*\*p < 0.001

Wie aus Abbildung 4.13 hervorgeht, fand die durch Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* bewirkte Aktivierung von PEK-1 nicht auf Ebene der Transkription statt, denn die Doppel-RNAi zeigte keinen signifikanten Effekt auf die *pek-1* mRNA-Spiegel ( $1,02 \pm 0,5$ ) verglichen mit der Kontrolle ( $1,0 \pm 0,4$ ).



**Abbildung 4.13: Eine verminderte IRE-1/XBP-1 Signaltransduktion beeinflusst nicht die *pek-1* Expression**

Relative *pek-1* Expression ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) in *C. elegans* TK22 unter Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1*. Die RNA wurde aus den Nematoden isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Mittels qRT-PCR mit den Primern *pek-1*-qPCR-fw-2554 und *pek-1*-qPCR-rv-2687 wurden die *pek-1* Transkriptions-Spiegel bestimmt und quantifiziert.



#### 4.4 Die Hemmung des autophagosomalen Abbaus schützt vor einer Glukosetoxizität

Die Autophagie ist ein evolutionär konservierter katabolischer Prozess, der dem Abbau von cytosolisch akkumulierten beschädigten Proteinen oder anderen zellulären Elementen dient und somit einen wichtigen Bestandteil der Proteostase darstellt. Um zu untersuchen, ob dieser Prozess durch die Applikation von Glukose gehemmt und durch die Gabe von Quercetin gesteigert wird, erfolgte die Anfärbung von Lysosomen in TK22 mittels des Fluoreszenzfarbstoffs LysoTracker® Red, um die in der Autophagie final bedeutsamen Organellen quantitativ darzustellen. Abbildung 4.14 zeigt, dass die 48-stündige Inkubation von *C. elegans* TK22 mit 10 mM Glukose zu einer signifikanten Steigerung der LysoTracker® Red-Fluoreszenz um  $44 \pm 33$  % verglichen mit der Kontrolle führte. Die zusätzliche Inkubation mit 1  $\mu$ M Quercetin beeinflusste die LysoTracker® Red-Fluoreszenz in Gegenwart von Glukose nicht weiter.

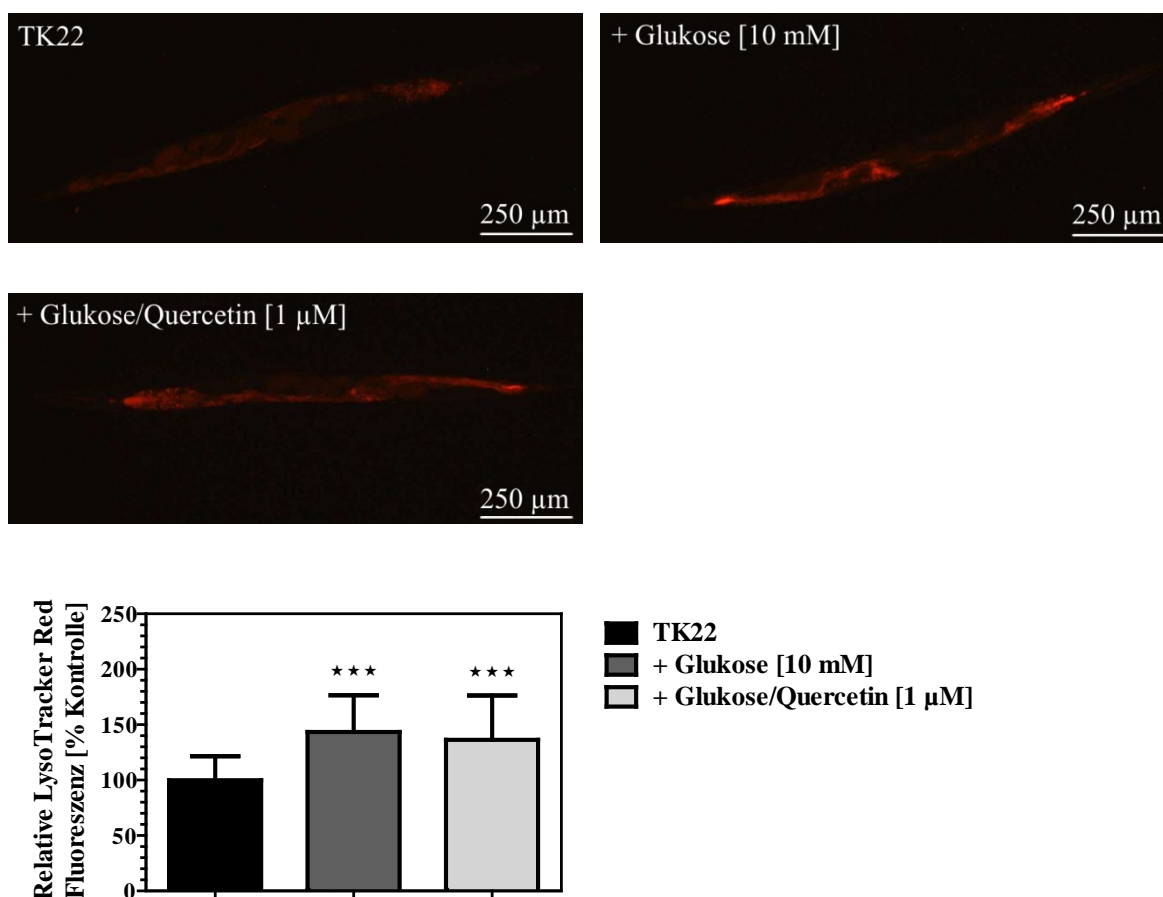
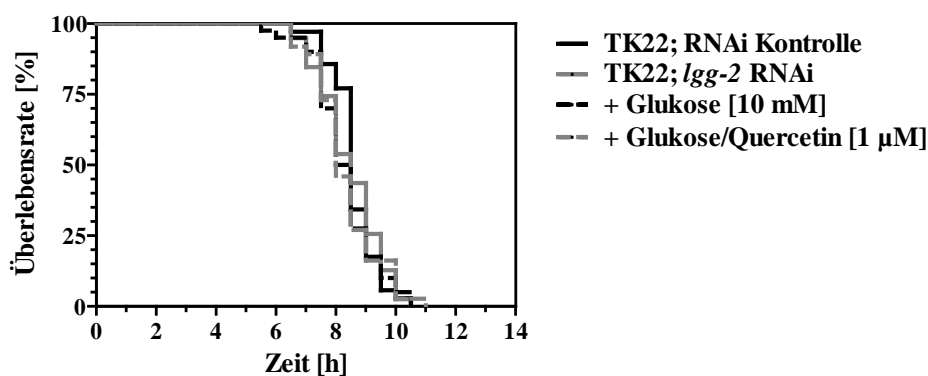


Abbildung 4.14: Quercetin beeinflusst nicht die Lysosomenbildung in TK22 in Anwesenheit von Glukose

Relative LysoTracker® Red-Fluoreszenz in *C. elegans* TK22 nach 48-stündiger Inkubation mit 10 mM Glukose in Ab- und Anwesenheit von 1  $\mu$ M Quercetin. \*\*\* $p < 0.001$  vs. Kontrolle

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Lysosomenbildung in TK22 durch Glukose gesteigert wird, um geschädigte Proteine mittels Autophagie zu beseitigen. Diese Aktivierung ist jedoch nicht ausreichend, um die durch Glukose induzierte Verkürzung der Überlebenszeit von TK22 zu verhindern. Auch die Prävention Glukose-induzierter Schädigungen durch Quercetin wird offensichtlich nicht über eine Beeinflussung der Autophagie, zumindest nicht über die Regulation der Lysosomenbildung, vermittelt.

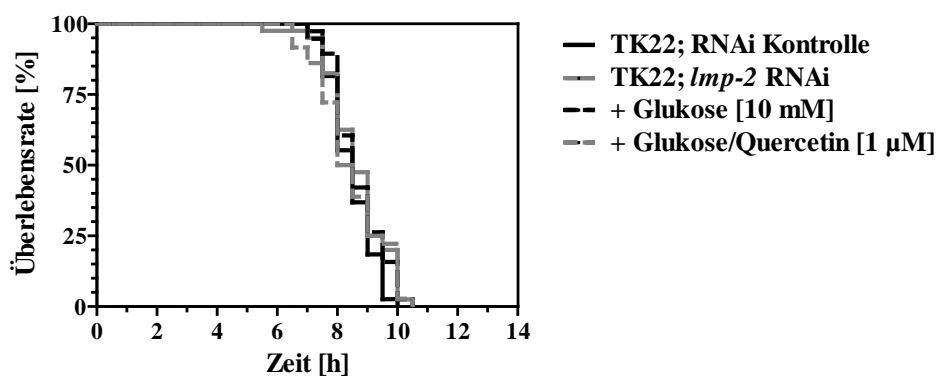
Die Bildung von Autophagosomen, welche die abzubauenen Substrate umschließen um anschließend mit Lysosomen, welche die benötigten Peptidasen bereitstellen, zu verschmelzen, ist der initiale Prozess der Makroautophagie und beginnt mit der Entstehung eines Phagophors. Im Rahmen dieser Arbeit wurde *lgg-2*, dessen Aktivierung essentiell für die Ausbildung und Verlängerung des Phagophors ist, durch RNAi in seiner Expression unterdrückt. Abbildung 4.15 zeigt, dass die RNAi von *lgg-2* keinen Effekt auf die Überlebenszeit von *C. elegans* TK22 hatte. Durch die verminderte Expression des Makroautophagie-spezifischen Gens wurde jedoch der lebensverkürzende Effekt von Glukose als auch der lebensverlängernde Effekt des Quercetins verhindert. In Analogie zu den unter *hsp-4* und *pek-1* RNAi erhaltenen Ergebnissen (siehe Abschnitt 4.2 und 4.3) lassen auch diese Ergebnisse die Vermutung zu, dass die Aktivierung eines anderen Elements der Proteostase die Verkürzung der Überlebenszeit durch Glukose verhindert und die Verlängerung der Überlebenszeit nur unter speziellen Stressbedingungen evident wird.



**Abbildung 4.15: RNAi von *lgg-2* verhindert die Glukosetoxizität in TK22**

Überlebenszeit unter Hitzestress (37 °C) von *C. elegans* TK22 unter *lgg-2* RNAi und nach 48-stündiger Inkubation mit 10 mM Glukose in Ab- und Anwesenheit von 1 µM Quercetin.

Innerhalb der CMA werden die zu degradierenden Proteine von cytosolischen Chaperonen gebunden und an die Oberfläche der Lysosomen transportiert. Der Chaperon-Protein-Komplex bindet an die Lysosomenmembran und das abzubauenende Protein interagiert mit einem spezifischen Lysosomen-assoziierten Membranprotein, wodurch die Aufnahme in das Lysosomen initiiert wird. Im Folgenden wurden die Effekte der RNAi von *Imp-2*, einem Strukturhomolog eines humanen Lysosomen-assoziierten Membranproteins, auf die Überlebenszeit evaluiert. Wie Abbildung 4.16 zeigt, wurde die Überlebenszeit von TK22 durch RNAi von *Imp-2* nicht beeinflusst. Ebenso wie die RNAi des Makroautophagie-spezifischen Gens *lgg-2* führte auch die verminderte Expression von *Imp-2* zu einer Verhinderung der Glukosetoxizität. Quercetin zeigte unter Glukoseexposition und in Gegenwart der *Imp-2* RNAi wiederum keinen Effekt mehr auf die Überlebenszeit.

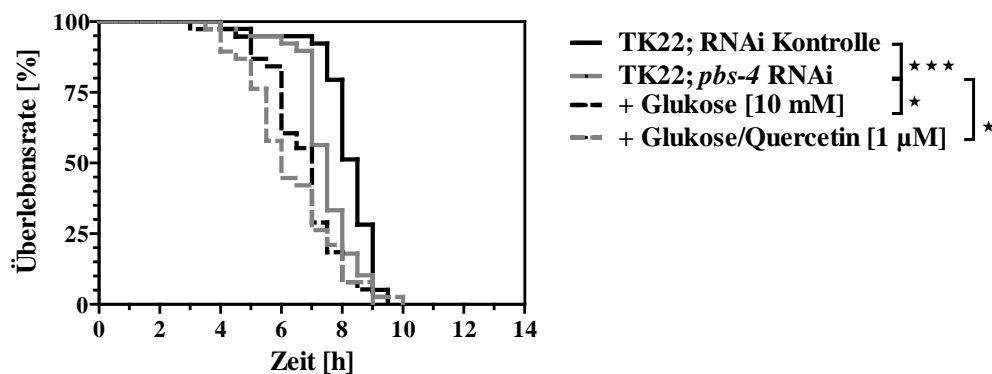


**Abbildung 4.16: RNAi von *Imp-2* verhindert die Glukosetoxizität in TK22**

Überlebenszeit unter Hitzestress (37 °C) von *C. elegans* TK22 unter *Imp-2* RNAi und nach 48-stündiger Inkubation mit 10 mM Glukose in Ab- und Anwesenheit von 1 μM Quercetin.

## 4.5 Das Proteasom als zentrales Ziel der Hemmung durch Glukose und der Aktivierung durch Quercetin

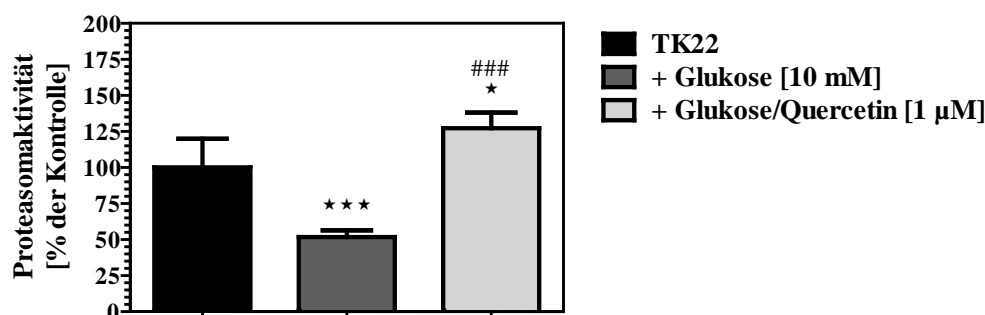
Der Abbau von geschädigten Proteinen durch das UPS stellt, neben der Autophagie, einen weiteren Degradierungs-Mechanismus innerhalb der Proteostase dar. PBS-4 ist ein Faktor, der eine wichtige Funktion für die enzymatische Aktivität des Proteasoms besitzt. Die RNAi von *pbs-4* führte zu einer signifikanten Verkürzung der Überlebenszeit von TK22, die durch die Applikation von 10 mM Glukose allerdings zusätzlich reduziert wurde (Abbildung 4.17). Die Inkubation mit 1  $\mu$ M Quercetin bewirkte keine Beeinflussung der Überlebenszeit unter Anwesenheit von Glukose. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Quercetin das UPS als eine unabdingbare Voraussetzung für eine Verlängerung der Überlebenszeit von TK22 in Anwesenheit von Glukose benötigt.



**Abbildung 4.17: Quercetin verlängert die Überlebenszeit von TK22 nicht mehr nach *pbs-4* RNAi**

Überlebenszeit unter Hitzestress (37 °C) von *C. elegans* TK22 unter *pbs-4* RNAi und nach 48-stündiger Inkubation mit 10 mM Glukose in Ab- und Anwesenheit von 1  $\mu$ M Quercetin. \* $p < 0.05$  und \*\*\* $p < 0.001$

Um nachzuweisen, dass das Proteasom tatsächlich funktionell durch Glukose gehemmt und durch Quercetin aktiviert wird, wurde die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität in TK22 bestimmt. Abbildung 4.18 zeigt, dass die 48-stündige Inkubation von TK22 mit 10 mM Glukose zu einer signifikanten Senkung der Proteasomaktivität um  $48 \pm 5\%$  verglichen mit der Kontrolle führte. Die zusätzliche Inkubation mit 1  $\mu$ M Quercetin steigerte die Proteasomaktivität signifikant um  $75 \pm 11\%$  und sogar signifikant um  $27 \pm 11\%$  über den Wert der unbehandelten Kontrolle. Die Proteasomaktivität kann somit als direktes Ziel von Quercetin im Rahmen der Prävention von Glukose-induzierten Schädigungen in TK22 definiert werden.

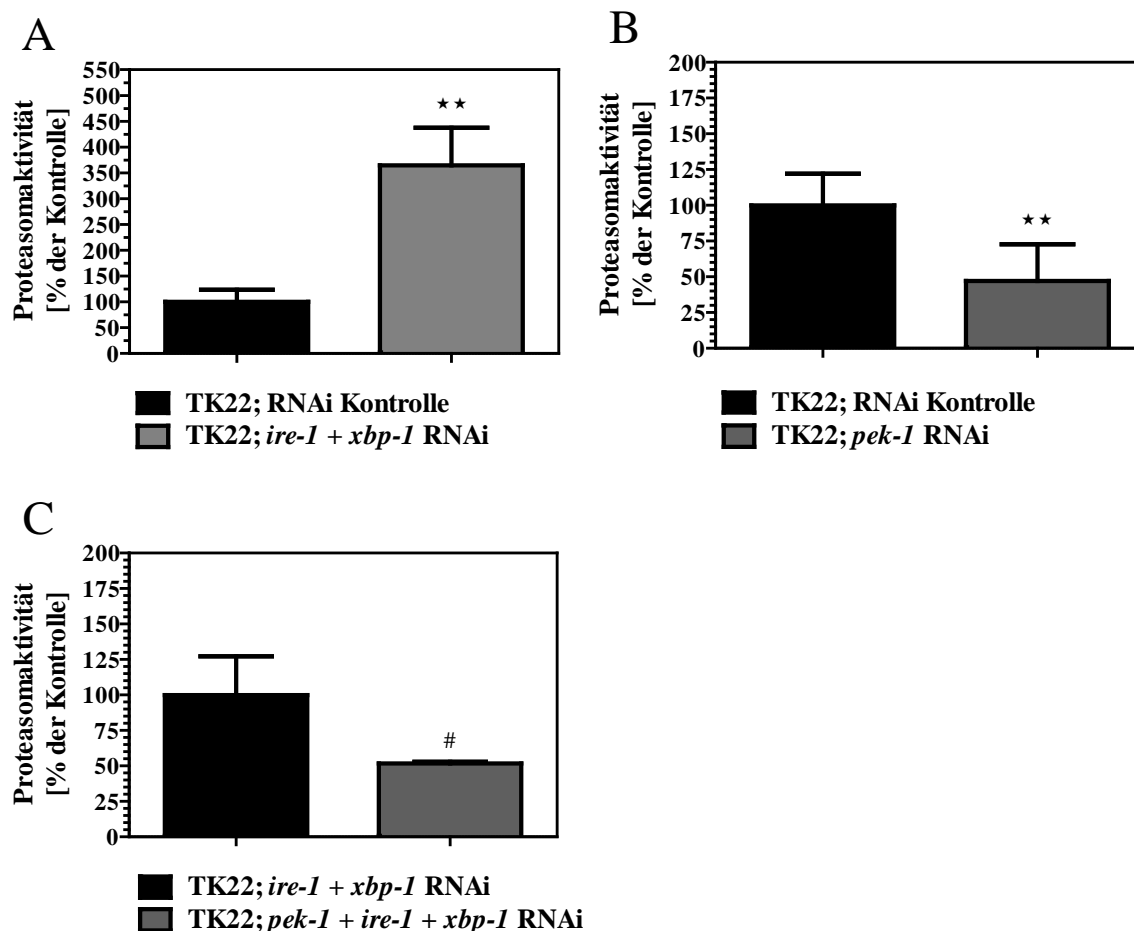


**Abbildung 4.18: Quercetin aktiviert das Proteasom in TK22 in Anwesenheit von Glukose**

Spezifische Proteasomaktivität in *C. elegans* TK22 nach 48-stündiger Inkubation mit 10 mM Glukose in Ab- und Anwesenheit von 1 µM Quercetin. Die Proteine wurden aus den Nematoden extrahiert, um die spezifische Proteasomaktivität mithilfe des Substrats Suc-LLVY-AMC zu quantifiziert. Der Proteasom-Inhibitor MG-132 wurde verwendet, um nach Substraktion der Aktivität in Anwesenheit des Inhibitors von der Gesamtaktivität die spezifische Proteasomaktivität zu bestimmen. \* $p < 0.05$  und \*\*\* $p < 0.001$  vs. Kontrolle bzw. ###  $p < 0.001$  vs. mit Glukose behandelte Nematoden

Nachdem das Proteasom als zentral für die Verhinderung der Glukosetoxizität durch Quercetin identifiziert werden konnte, sollte abschließend geklärt werden, ob die nach funktioneller Schwächung der UPR<sup>ER</sup> beziehungsweise der Autophagie beobachteten Kompensationsmechanismen ebenfalls von der Aktivität des Proteasoms abhängig sind.

In Abschnitt 4.3 wurde bereits dargestellt, dass das Vorhandensein von PEK-1 notwendig ist, um eine Verlängerung der Überlebenszeit durch Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* zu bewirken. Wie Abbildung 4.19 (A) zeigt, steigerte die Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* die Proteasomaktivität in *C. elegans* TK22 signifikant um  $265 \pm 73$  % verglichen mit der Kontrolle. Die *pek-1* RNAi hingegen resultierte in einer signifikant verminderten Proteasomaktivität um  $53 \pm 26$  % verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 4.19 (B)). Dieser Effekt war dominant gegenüber dem Effekt der Doppel RNAi von *ire-1* und *xbp-1*, denn durch Tripel-RNAi von *pek-1*, *ire-1* und *xbp-1* wurde die Proteasomaktivität signifikant um  $48 \pm 1$  % gegenüber der Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* vermindert (Abbildung 4.19 (C)). Diese Ergebnisse zeigen, dass die fehlende IRE-1/XBP-1 Signaltransduktion zu einer Aktivierung des Proteasoms über PEK-1 führt, wodurch die Verlängerung der Überlebenszeit durch die Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* erklärt werden kann.

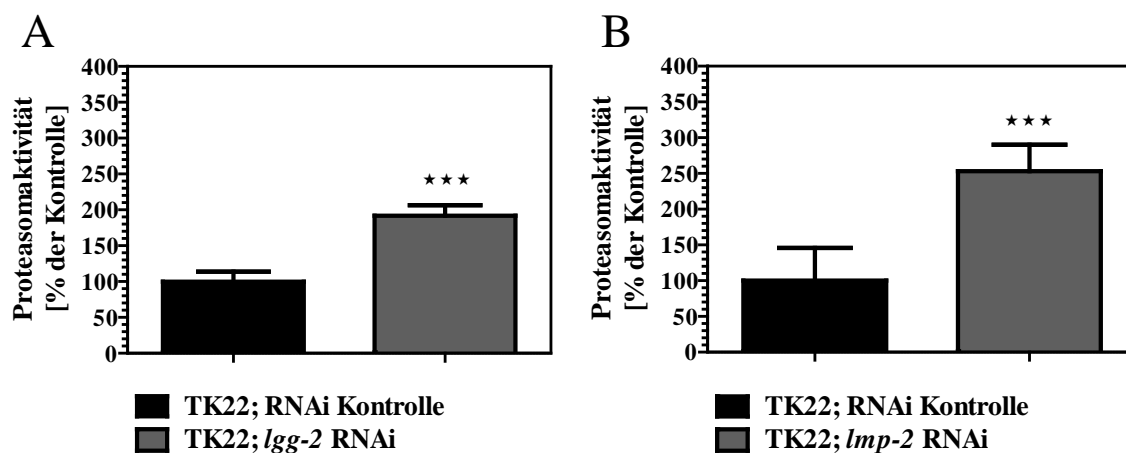


**Abbildung 4.19: Die Steigerung der Proteasomaktivität in TK22 durch Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* wird verhindert durch *pek-1* RNAi**

Spezifische Proteasomaktivität in *C. elegans* TK22 unter Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* (A), *pek-1* RNAi (B) und *pek-1*, *ire-1* und *xbp-1* Tripel-RNAi verglichen mit verdünnter Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* (C). Die Proteine wurden aus den Nematoden extrahiert, um die spezifische Proteasomaktivität mithilfe des Substrats Suc-LLVY-AMC zu quantifizieren. \* $p < 0.05$  und \*\* $p < 0.01$  vs. Kontrolle bzw. # $p < 0.05$  vs. *ire-1* und *xbp-1* Doppel-RNAi

Sowohl die funktionelle Unterdrückung der Makroautophagie durch *lgg-2* RNAi als auch der CMA durch *lmp-2* RNAi zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Lebensspanne von TK22, unterdrückte jedoch vollständig die Glukosetoxizität (vergleiche Abschnitt 4.4). Entsprechend des für die Effekte der RNAi UPR<sup>ER</sup>-spezifischer Faktoren auf die Überlebenszeit von TK22 aufgestellten Postulats hinsichtlich der Aktivierung von Kompensationsmechanismen (vergleiche Abschnitt 4.3) kann auch für die Inhibierung der Autophagie durch RNAi der genannten Faktoren die Aktivierung eines kompensatorischen Mechanismus postuliert werden. In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls das UPS untersucht. Abbildung 4.20 zeigt, dass die Inhibition der Autophagie durch RNAi von funktionellen Elementen der Makroautophagie (A) und der

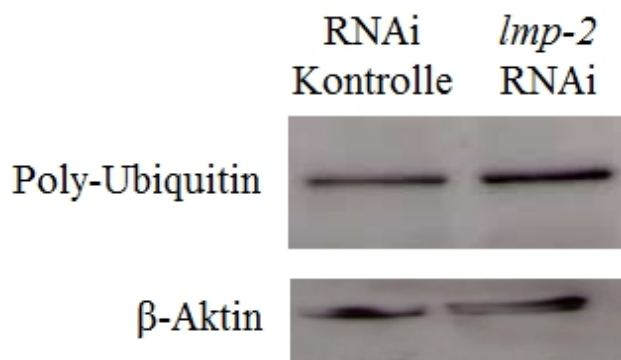
CMA (B) zu einer Aktivierung des UPS in TK22 führte. Sowohl die RNAi des Makroautophagie-spezifischen Proteins LGG-2 als auch des CMA-spezifischen Proteins LMP-2 steigerten signifikant die Proteasomaktivität um  $92 \pm 14 \%$  beziehungsweise  $153 \pm 37 \%$ .



**Abbildung 4.20: Eine Inhibierung der Autophagie steigert die Proteasomaktivität in TK22**

Spezifische Proteasomaktivität in *C. elegans* TK22 unter *lgg-2* RNAi (A) sowie *lmp-2* RNAi (B). Die Proteine wurden aus den Nematoden extrahiert, um die spezifische Proteasomaktivität mithilfe des Substrats Suc-LLVY-AMC zu quantifizieren. \*\*\* $p < 0.001$  vs. Kontrolle

Um die Aktivierung des UPS bei verminderter Aktivität der Autophagie zu verifizieren, wurden außerdem poly-ubiquitinierte Proteine nach RNAi von *lmp-2* in TK22 mittels Western Blot Analyse bestimmt. Wie Abbildung 4.21 zeigt, resultierte die verminderte Expression von *lmp-2* tatsächlich in einer moderaten Steigerung der Menge poly-ubiquitiniertes Proteine.



**Abbildung 4.21: Poly-ubiquitinierte Proteine in TK22 unter *lmp-2* RNAi**

Die Proteine wurden aus den Nematoden extrahiert und mittels Western Blot Analyse mit den Antikörpern Rabbit-anti-ubiquitin und Mouse-anti-actin sowie jeweils einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper analysiert.

## 5 Diskussion

Organismen sind stetig mit Konditionen konfrontiert, die zu akutem oder chronischem Stress führen [54]. Die eukaryotische Zelle ist somit fortlaufend herausgefordert, die Integrität der zellulären Komponenten in Gegenwart von Stressfaktoren jeglicher Art aufrecht zu erhalten [58]. Der Großteil zellulärer Funktionen wird von Proteinen durchgeführt [229], die in nahezu jeden biologischen Prozess involviert sind [51]. Eine funktionierende zelluläre Proteinhomöostase, die Proteostase, ist daher essentiell, um die Proteom-Integrität aufrecht zu erhalten [229] und damit die Funktionalität von Zellen und Organismen zu gewährleisten [61]. Das Proteostase-Netzwerk kontrolliert die Konzentration, die Konformation sowie die spezifische Lokalisierung der Proteine [58], indem es ihre Biosynthese und Faltung, ihren Transport sowie die Entfaltung und den Abbau reguliert [230]. Es dient dadurch nicht nur der erfolgreichen Entwicklung des Organismus in Gegenwart von konstantem intrinsischem und Umwelt-bedingtem Stress, sondern auch der Prävention pathologischer Veränderungen [58]. Dementsprechend führt eine Abnahme der Proteostase-Aktivität, wie sie zum Beispiel innerhalb des Alterungsprozesses beschrieben ist [60, 231–233], zu einer Verminderung der effizienten Faltung von neu-synthetisierten Proteinen, zu einem Verlust der für die Protein-Funktionalität essentiellen Konformation sowie zu der Bildung von Protein-Aggregaten. Letztere werden zunehmend mit der Zytotoxizität innerhalb von neurodegenerativen und metabolischen Erkrankungen, zu denen auch der Diabetes mellitus gehört, assoziiert [229, 234]. Als Reaktion auf die Akkumulation fehlgefalteter Proteine wird die UPR im Mitochondrium [79] sowie im ER [92] aktiviert, um die durch Chaperone vermittelte Protein-Faltung zu steigern und gegebenenfalls den Abbau von fehlgefalteten Proteinen und Protein-Aggregaten einzuleiten. Fehlfunktionen innerhalb der UPR, insbesondere der Chaperon-Aktivität, fördern deswegen die Manifestation oder Progression der eben genannten Erkrankungen [51]. Umgekehrt wird die Aktivierung von Elementen der Proteostase immer häufiger als potentielle Intervention im Rahmen der Prävention und Therapie entsprechender Pathologien diskutiert [56, 58, 229].

Die chronische Hyperglykämie wird als Ursache für die Entwicklung diabetischer Komplikationen angesehen [12] und gilt als Faktor, der die Lebensspanne von Organismen reduziert [16]. Besonders die vermehrte Entstehung von ROS innerhalb der mitochondrialen ETC [49, 50], wie sie für durch eine Hyperglykämie geschädigte Zellen



typisch ist (vergleiche Abschnitt 1.1.1), wird für die Aktivierung charakteristischer, an diabetischen Komplikationen beteiligter Signalwege verantwortlich gemacht (vergleiche Abschnitt 1.1.2). Als Folge davon kommt es unter anderem zu Schädigungen von Proteinen, die zu einer Destabilisierung des Proteoms und einer Überlastung des Proteostase-Netzwerks führen [235].

In der vorliegenden Arbeit sollten die präventiven Effekte des Polyphenols Quercetin auf die durch Glukose verminderte Stressresistenz untersucht werden. Dafür wurde der Stamm TK22 des Nematoden *C. elegans*, der aufgrund einer Mutation in *mev-1* erhöhte ROS-Spiegel aufweist, herangezogen. Bislang konnte in TK22 gezeigt werden, dass bestimmte Pflanzenextrakte, insbesondere solche aus den Blättern der Brombeere, aus Hibiskus und aus Holunderbeeren sowie aus Jiaogulan, die Überlebenszeit bei 37 °C unter Glukoseexposition signifikant verlängerten und zwar bis auf das Niveau der in Abwesenheit von Glukose kultivierten Nematoden. Die Extrakte mit der höchsten Wirksamkeit im Hinblick auf die Glukosetoxizität zeichneten sich durch eine Steigerung der Proteasomaktivität aus (Publikation 2; Appendix B.2).

Auch ein mit Catechinen angereicherter Grüntee-Extrakt erwies sich als sehr potent im Hinblick auf die Prävention einer durch Glukose reduzierten Stressresistenz und war in seiner Wirkung ebenfalls abhängig von der Funktionalität des Proteasoms (Publikation 3; Appendix B.3). Die Steigerung der Stressantwort als Reaktion auf einen milden Stressor, die sogenannte Hormesis, wurde besonders am Beispiel des Grüntee-Extrakts verdeutlicht. Die RNAi von *sir-2.1*, einem Sirtuin mit Funktion im Rahmen der Stressantwort, verhinderte nicht nur die Verlängerung der Überlebenszeit durch den Extrakt in Anwesenheit von Glukose, sondern führte sogar zu einer signifikanten Verkürzung der Lebensspanne durch den Grüntee-Extrakt (Publikation 3; Appendix B.3).

Die hormetische Aktivierung des Proteasoms scheint allerdings nicht die einzige Möglichkeit zu sein, eine Verlängerung der Überlebenszeit in Glukose-exponierten TK22 Nematoden zu erreichen. Dies wurde beispielhaft durch die Applikation der Reinsubstanz Carnitin gezeigt, das die durch Glukose reduzierte proteasomale Aktivität sogar noch zusätzlich senkte (Publikation 4; Appendix B.4). Die Verlängerung der Überlebenszeit durch Carnitin war abhängig von DAF-12, einem nukleären Hormonrezeptor mit Strukturhomologie zu den Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) in Säugetieren (Publikation 4; Appendix B.4).

Sowohl von DAF-12 als auch von SIR-2.1 abhängig war die Steigerung der Überlebenszeit von TK22 in Anwesenheit von Glukose vermittelt durch das Polyphenol Quercetin (Publikation 1; Appendix B.1), das auch in dieser Arbeit als klassischer Vertreter der Polyphenole beziehungsweise Flavonoide untersucht wurde. Der lebensverlängernde Effekt des Quercetins wurde auch verhindert, wenn die Expression verschiedener Gene der UPR im Mitochondrium oder im ER durch RNAi vermindert wurde. Im Einzelnen konnte dies gezeigt werden für die mitochondrialen Chaperone *hsp-6* und *hsp-60* sowie die UPR<sup>mt</sup>-spezifischen Transkriptionsfaktoren *dve-1*, *ubl-5* und *atfs-1* ebenso wie für den UPR<sup>ER</sup>-spezifischen Transkriptionsfaktor *xbp-1* und die Gene *abu-1* und *abu-11*, die im Rahmen einer blockierten UPR<sup>ER</sup> transkribiert werden (Publikation 1; Appendix B.1). In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung weiterer an der UPR<sup>mt</sup>, der UPR<sup>ER</sup>, der Autophagie sowie des UPS beteiligter Gene für die durch Quercetin verursachte Verlängerung der Überlebenszeit Glukose-behandelter TK22 Nematoden auf molekularer Ebene untersucht sowie Interaktionen zwischen einzelnen Faktoren der genannten Elemente ermittelt werden.

In *C. elegans* sind die Chaperone HSP-6 und HSP-60 in die Antwort gegenüber mitochondrialem Stress involviert, indem sie als stromabwärts liegende Elemente der UPR<sup>mt</sup> infolge der retrograden Stressantwort zwischen Mitochondrium und Nukleus vermehrt exprimiert werden [75, 196]. Besonders die Verwendung von *C. elegans* Stämmen, die GFP unter der Kontrolle der Promotoren von *hsp-6* oder *hsp-60* exprimieren, hat zur Aufklärung der Signaltransduktion der UPR<sup>mt</sup> in *C. elegans* und somit der Mechanismen, welche die Aktivierung der beiden Chaperone vermitteln, geführt [75]. Yoneda *et al.* konnten durch Verwendung solcher Stämme zeigen, dass die Expression von *hsp-6* und *hsp-60* unter physiologischen Konditionen ein basales Niveau aufweist und spezifisch durch Störungen der mitochondrialen Protein-Homöostase gesteigert wird [191]. Um Komponenten zu identifizieren, die diese gesteigerte Expression vermitteln, verwendeten Benedetti *et al.* hitzeempfindliche *C. elegans*-Mutanten mit einer kontinuierlichen UPR<sup>mt</sup>-Aktivität, um durch systematische RNAi-Screenings Komponenten der Signalkaskade zu identifizieren. UBL-5 wurde so als stromaufwärts aktiver Regulator von *hsp-6* und *hsp-60* beschrieben [236]. Infolge einer mitochondrialen Stresssituation bildet UBL-5 einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor DVE-1, der ebenfalls als stromaufwärts-liegender Aktivator von *hsp-6* und *hsp-60* beschrieben wurde [195]. DVE-1 liegt unter physiologischen Konditionen in der Nukleus-Region vor und

relokalisiert infolge von mitochondrialem Stress, um die Komplexbildung einzugehen. Diese scheint die Bindung von DVE-1, das ein DNA-Bindungsprotein darstellt, an die entsprechenden Promotor-Regionen zu begünstigen [195]. Das initiale Signal für eine Erhöhung der *hsp-6* und *hsp-60* Expression ist die Akkumulation ungefalteter Proteine in der mitochondrialen Matrix [195]. Diese werden durch eine Clp-Protease, die als Sensor für mitochondrialen Stress beschrieben ist, erkannt und degradiert [194, 195]. Eine Inaktivierung dieses Sensors führte zu einer Verhinderung der Proteolyse fehlgefalteter Proteine [194] und somit zu einer Störung der retrograden Signalkaskade. Die Weiterleitung des Signals erfolgt durch den ABC-Transporter HAF-1, der für den mitochondrialen Peptid-Efflux benötigt wird [194]. HAF-1 transportiert Peptide, die durch die Clp-abhängige Proteolyse fehlgefalteter Proteine entstanden sind, in den mitochondrialen Intermembranraum, von wo aus sie, vermutlich durch freie Diffusion durch die porösere äußere Mitochondrienmembran, ins Cytosol gelangen [75]. Der bZip-Transkriptionsfaktor ATFS-1 wurde als stromabwärts von HAF-1 lokalisiertes Element der UPR<sup>mt</sup>-Signalkaskade identifiziert [194]. Die Aktivierung von ATFS-1 und somit seine Translokation in den Nukleus ist dabei abhängig von der Effektivität des mitochondrialen Imports des Transkriptionsfaktors. ATFS-1 wird konstitutiv synthetisiert und in Gegenwart einer physiologischen Funktionalität der Mitochondrien in diese importiert und degradiert. Die Folge von mitochondrialem Stress ist unter anderem eine Einschränkung der Import-Kapazität, die scheinbar durch HAF-1 vermittelt wird und dazu führt, dass der Import von ATFS-1 vermindert und dessen Translokation in den Nukleus gesteigert wird [237]. HAF-1 scheint somit, parallel zu der Vermittlung des erhöhten Efflux von Peptiden, die Import-Kapazität zu vermindern und dadurch ATFS-1 zu aktivieren. Im Nukleus scheint die Bindung von ATFS-1 an Ziel-Gene durch die Bildung des DVE-1/UBL-5 Komplexes forciert zu werden [75, 196]. Allerdings ist die Redistribution von DVE-1 im Nukleus unabhängig von der HAF-1-Aktivität, wohingegen ein Funktionsverlust der Clp-Protease die Relokalisierung von DVE-1 verhinderte [194]. Auch die Expression von *ubl-5* wurde durch *clpp-1* RNAi negativ beeinflusst [195]. Die Transkription von *ubl-5* konnte jedoch als abhängig von HAF-1 identifiziert werden [194]. Trotz der teilweise nicht vollständig aufgeklärten Interaktionen innerhalb der UPR<sup>mt</sup>-Signalkaskade wurde gezeigt, dass alle beschriebenen Elemente für die gesteigerte Expression der mitochondrialen Chaperone innerhalb einer mitochondrialen Stresssituation, welche die UPR<sup>mt</sup> aktiviert, essentiell sind. Die RNAi von *dve-1* [195], *ubl-5* [236] oder *clpp-1* [195] sowie die Gen-Deletion von *haf-1* [194] resultierte zumindest in einer verminderten Expression von *hsp-60*, wie durch

die Verwendung von entsprechenden GFP-Reporter-Stämmen gezeigt wurde. Fitzenberger *et al.* konnten zeigen, dass sowohl die RNAi von *hsp-6* als auch von *hsp-60* in einer signifikanten Verkürzung der Lebensspanne unter Hitzestress von TK22 resultierte [184]. Etwas schwächer ausgeprägt war der lebensverkürzende Effekt einer *dve-1* oder *ubl-5* RNAi [184] und ebenso der RNAi von *atfs-1*, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Aufgrund der starken lebensverkürzenden Effekte der *hsp-6* und *hsp-60* RNAi sollte ausgeschlossen werden, dass die verminderte Expression der Chaperone zu einer unspezifischen Schädigung in TK22 führte. Nachdem jedoch die Verdünnung der RNAi von *hsp-60* ebenfalls zu einer Lebensverkürzung von TK22 führte, die zwar geringer ausfiel, aber sowohl eine weitere Verkürzung der Überlebenszeit durch Glukose als auch eine Verlängerung durch Quercetin unter Glukoseapplikation verhinderte, wurde eine unspezifische Beeinflussung der Überlebenszeit durch die *hsp-60* RNAi im Rahmen dieser Arbeit ausgeschlossen. Weiterhin lässt der vergleichsweise starke Effekt der unverdünnten *hsp-6* und *hsp-60* RNAi verglichen mit der RNAi für DVE-1 und UBL-5 [184] die Vermutung zu, dass die Expression der beiden Chaperone durch weitere transkriptionelle Regulatoren beeinflussbar ist, was dadurch bestärkt wird, dass unter RNAi von *dve-1* oder *ubl-5* die *hsp-60* Expression nicht vollständig verhindert wurde [195, 236]. Da ATFS-1 ebenfalls als Transkriptionsaktivator für *hsp-6* und *hsp-60* beschrieben wurde [194], dieser aber scheinbar, wie oben beschrieben, durch Interaktion mit dem DVE-1/UBL-5 Komplex seine regulatorische Aktivität vermittelt [238], bleibt ungeklärt, ob eine von *dve-1* und *ubl-5* unabhängige Regulation der *hsp-6* und *hsp-60* Expression durch ATFS-1 stattfinden kann. Dies wäre durch Doppel- oder Tripel-RNAi Experimente in entsprechenden transgenen *C. elegans* Stämmen zu untersuchen.

Die lebensverkürzenden Effekte der verminderten Expression von UPR<sup>mt</sup>-spezifischen Genen zeigen die Essentialität der UPR<sup>mt</sup> im Rahmen der Stressantwort gegenüber einer Glukosebelastung in TK22. Dass die Verminderung der UPR<sup>mt</sup>-Signaltransduktion durch RNAi von *hsp-6*, *hsp-60*, *dve-1*, *ubl-5* und *atfs-1* eine Verlängerung der Überlebenszeit durch Quercetin in Anwesenheit von Glukose verhinderten (Publikation 1; Appendix B.1), lässt zudem das Postulat zu, dass Quercetin Glukose-induzierte Schädigungen durch eine Aktivierung der UPR<sup>mt</sup> verhindert (Publikation 1; Appendix B.1). Um die Beeinflussung der mitochondrialen Chaperon-Expression durch Glukose und Quercetin in TK22 genauer zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit TK22 mit dem transgenen *C. elegans* Stamm SJ4058, der GFP unter der Aktivität des *hsp-60* Promotors exprimiert, gekreuzt. Durch die Applikation von 10 mM Glukose wurde die *hsp-60* Promotoraktivität signifikant

gesteigert, wodurch postuliert werden kann, dass die Glukosebelastung in *C. elegans* zu einer Aktivierung der UPR<sup>mt</sup> führt. Entsprechend der durch Glukose induzierten gleichzeitigen Überlebenszeitverkürzung in TK22 scheint die Aktivierung der UPR<sup>mt</sup> in Form der gesteigerten Expression des Chaperons jedoch nicht auszureichen, um die Glukosetoxizität zu verhindern. Die durch Glukose-induzierte Steigerung der *hsp-60* Expression wurde allerdings durch Quercetin nicht beeinflusst. Da die Transkription von *hsp-6* und *hsp-60* gekoppelt reguliert zu werden scheint [239], ist davon auszugehen, dass Quercetin genauso wie in Abhängigkeit von *hsp-60* auch abhängig von *hsp-6* seine lebensverlängernde Eigenschaft unter Glukoseexposition unabhängig von einer Steigerung ihrer Expression beeinflusst. Da es Hinweise sowohl aus klinischen Studien [240–242] als auch anhand von Tiermodellen [242–244] auf eine verminderte Chaperon-Aktivität im Rahmen diabetischer Komplikationen gibt, stellen die Befunde hinsichtlich der Wirkung des Quercetins einen möglichen Ansatzpunkt dar, zu einer expressionsunabhängigen Steigerung der mitochondrialen Chaperon-Aktivität zu gelangen.

Neben den für die UPR<sup>mt</sup> wichtigen Chaperonen HSP-6 und HSP-60 wurde in dieser Arbeit auch die Bedeutung des UPR<sup>ER</sup>-relevanten Chaperons HSP-4 im Rahmen der Glukosetoxizität und deren Prävention durch Quercetin untersucht. Interessanterweise verhinderte eine *hsp-4* RNAi vollständig die Glukosetoxizität. Offenbar wird spezifisch durch die RNAi von *hsp-4* ein Kompensationsmechanismus aktiviert, der für die Verhinderung der schädigenden Wirkung der Glukose verantwortlich ist. Das ER-Transmembran-Protein PEK-1 wird in *C. elegans* ebenfalls durch ER-Stress aktiviert. PEK-1 phosphoryliert eIF2 $\alpha$  mit einer verminderten Translation als Folge, wodurch die Faltungskapazität entsprechender ER-Chaperone nicht durch neu-synthetisierte Proteine beansprucht wird [198]. Durch Doppel-RNAi von *pek-1* und *hsp-4* konnte jedoch gezeigt werden, dass die PEK-1 Aktivität keine kompensatorische Komponente bei fehlender HSP-4 Expression darstellt, denn die Überlebenszeit von TK22 in Gegenwart von *hsp-4* RNAi wurde durch die zusätzliche *pek-1* RNAi nicht vermindert. Im Rahmen der UPR scheinen Kompensationen besonders auf Ebene des ERs stattzufinden, wie an einem weiteren Beispiel verdeutlicht werden kann. Obwohl IRE-1 für das Spleißen des für die UPR<sup>ER</sup> zentralen bZip Transkriptionsfaktors XBP-1 notwendig ist, verhinderte die *ire-1* RNAi eine durch *xbp-1* RNAi verursachte Verkürzung der Überlebenszeit bei 37 °C. In *C. elegans* sind keine anderen Möglichkeiten der mRNA-Spleißung von *xbp-1* und somit der XBP-1 Aktivierung beschrieben und auch andere Untersuchungen weisen darauf hin,

dass dieser Sachverhalt strikt abhängig von IRE-1 ist. Beispielsweise zeigten Mimura *et al.*, dass die Inhibierung von IRE1 $\alpha$ , das in Säugerzellen für das Spleißen der XBP1 mRNA verantwortlich ist, in einer Blockade der Expression des aktiven XBP1 Transkriptionsfaktors resultierte [245]. Back *et al.* stellten die Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors von der Kinase dar, indem sie in IRE1 $\alpha$  *knockout* Maus-Embryonen-Fibroblasten zeigten, dass zwar das vollständige XBP1 Transkript in äquivalenter Menge wie in Wildtyp Maus-Embryonen-Fibroblasten vorhanden war, jedoch infolge der Induktion von ER-Stress die gespleißte Form der XBP1 mRNA nur in den Wildtyp-Fibroblasten um das 92-fache anstieg [246]. Die zentrale Bedeutung von XBP-1 für die Stressantwort in *C. elegans* wird außerdem dadurch verdeutlicht, dass der Funktionsverlust des Transkriptionsfaktors zwar in TK22 [184], nicht aber im Wildtyp [247] eine Verkürzung der Überlebensspanne bewirkte. Dass durch *ire-1* RNAi keine Verkürzung der Überlebenszeit von TK22 verzeichnet wurde, ist konsistent mit den von Shen *et al.* erzielten Befunden, die zeigten, dass eine Gen-Deletion von *ire-1* keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von *C. elegans* hatte, wenn die Entwicklung auch etwas verzögert gegenüber dem Wildtyp war [197].

Ein weiteres in *C. elegans* beschriebenes Chaperon wird von *hsp-3* kodiert [190, 192] und ebenfalls als Homolog von BiP, einem UPR<sup>ER</sup>-Marker in Hefen und Säugerzellen, beschrieben [192, 193]. Sowohl *hsp-3* als auch *hsp-4* werden in *C. elegans* XBP-1-abhängig exprimiert, wie die verminderte Expression unter *xbp-1* RNAi nach induziertem ER-Stress zeigt [197]. Für TK22 konnte in dieser Arbeit die IRE-1/XBP-1-abhängige Expression von *hsp-4*, sowohl auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Echtzeit-PCR, als auch auf Protein-Ebene in dem transgenen Stamm SJ4005xTK22, der den Genotyp *mev-1 (kn-1)* enthielt und GFP unter der Kontrolle des *hsp-4* Promotors exprimiert, demonstriert werden. Dementsprechend ist festzustellen, dass XBP-1 einen Transkriptionsfaktor für den *hsp-4* Promotor in TK22 darstellt und die Kompensationsmechanismen einer *ire-1* RNAi nicht von einer erhöhten *hsp-4* Expression abhängig sind. Shen *et al.* zeigten, dass die Expression beider Chaperone durch eine Mutation in *ire-1* sowie durch *xbp-1* RNAi verhindert wurde. Nematoden mit einer Doppel-Mutation in *pek-1* und *xbp-1* wiesen diesen Phänotypen ebenfalls auf, wohingegen eine Mutation in *pek-1* alleine die Transkription der Chaperone nicht verhinderte und die Induktion dieser in einem ähnlichen Ausmaß wie in Wildtyp Nematoden zuließ. Allerdings war die basale Expression von *hsp-3* und *hsp-4* erhöht in dieser Mutante, wodurch die

partiell komplementäre Funktion von *pek-1* und der IRE-1/XBP-1 Signaltransduktion verdeutlicht wird.

Auch wenn HSP-3 als hauptsächlich konstitutiv exprimiertes Chaperon beschrieben wird und weniger stark durch ER-Stress aktiviert zu werden scheint als HSP-4 [197], ist eine gesteigerte Expression von HSP-3 unter *hsp-4* RNAi denkbar. Ob eine solche gesteigerte HSP-3 Expression die für die *hsp-4* RNAi beschriebenen Kompensationsmechanismen erklärt, muss zukünftig erforscht werden. In diesem Zusammenhang konnten Kapulkin *et al.* bereits zeigen, dass die HSP-4 Expression in dem *C. elegans* Stamm SJ4005 durch *hsp-3* RNAi sowie durch Gen-Deletion von *hsp-3* stark anstieg und die fehlende Aktivität von HSP-3 kompensierte [248].

Um zu untersuchen, ob die PEK-1 Aktivität eine kompensatorische Komponente für eine fehlende IRE-1/XBP-1 Signaltransduktion darstellt, wurde der Effekt der Tripel-RNAi von *pek-1*, *ire-1* und *xbp-1* auf die Überlebenszeit von TK22 untersucht. Verglichen mit der Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* resultierte die zusätzliche *pek-1* RNAi in einer signifikanten Verkürzung der Lebensspanne unter Hitzestress und somit in einer Verhinderung der postulierten Kompensation. Eine Aktivierung von PEK-1 bei fehlender XBP-1 Aktivität wurde von Richardson *et al.* beschrieben, indem eine erhöhte PEK-1-abhängige eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung in einem *xbp-1* Mutanten-Stamm im Vergleich zum *C. elegans* Wildtyp verzeichnet werden konnte [198]. Entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit findet die Aktivierung von PEK-1 jedoch nicht auf transkriptioneller Ebene statt, denn die Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* führte in TK22 nicht zu einer Veränderung der *pek-1* mRNA-Spiegel. Darüber hinaus scheint die Notwendigkeit von PEK-1 sehr spezifisch für die hormetischen Effekte der Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* zu sein, da eine Glukosetoxizität verhindernde Hormesis besonders auch durch den Funktionsverlust von PEK-1 erreicht werden konnte.

Trotz der Tatsache, dass auch die *hsp-4* RNAi eine hormetische Wirkung hatte, konnte in dem Stamm SJ4005xTK22 gezeigt werden, dass der Effekt des Quercetins unabhängig von einer Beeinflussung der *hsp-4* Expression in Anwesenheit von Glukose stattfindet. Darüber hinaus ist die Funktionalität von HSP-4 für die Verlängerung der Überlebenszeit durch Quercetin in Anwesenheit von Glukose nicht essentiell, wie anhand der *hsp-4* RNAi gezeigt wurde.

Generell werden hyperglykämische Situationen mit der mitochondrialen Dysfunktion und ER-Stress, begleitet von der Akkumulation fehlgefalteter Proteine sowie der Bildung

toxischer Protein-Aggregate assoziiert [249]. Als Folge wird die Autophagie für die Degradierung von geschädigten Zellorganellen sowie Proteinen, die durch das UPS nicht abgebaut werden können essentiell [250, 251]. Fitzenberger *et al.* zeigten bereits in TK22, dass die RNAi von *bec-1*, das in den Prozess der Autophagosomen-Bildung innerhalb der Makroautophagie involviert ist [206], keinen Effekt auf die Überlebenszeit von TK22 hatte, jedoch die Verkürzung dieser durch 10 mM Glukose verhinderte [184]. Zudem blieb die zusätzliche Applikation von 1  $\mu$ M Quercetin wirkungslos, bewirkte also keine Verlängerung der Überlebenszeit [252]. Ein gleiches Ergebnis wurde in dieser Arbeit für die RNAi von *lgg-2*, das an der Elongation sowie der Membranschließung des Autophagosoms in *C. elegans* beteiligt ist [207], gezeigt. Es existieren zahlreiche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer funktionierenden Autophagie beziehungsweise der Aktivierung dieser und der Überlebensfähigkeit eines Organismus [253–256]. In *C. elegans* wurde ebenfalls bereits festgestellt, dass *bec-1* für die Extension der Lebensspanne einer langlebigen Mutante verantwortlich ist [257]. Meléndez *et al.* zeigten in diesem Zusammenhang auch, dass die verminderte Expression von *bec-1* in einer leichten Verkürzung der Lebensspanne des *C. elegans* Wildtyps resultierte, die jedoch unter Standard-Laborbedingungen und nicht unter Hitzestress ermittelt wurde und die geringer ausfiel als in der langlebigen Mutante [257]. Auch für die RNAi von *lgg-2* konnten Alberti *et al.* eine Verkürzung der Lebensspanne des *C. elegans* Wildtyps, ebenfalls unter Standard-Laborbedingungen ermittelt, verzeichnen [258]. Gleiche Effekte wurden für die RNAi von *lgg-1*, das zweite Gen der *LC3, GABARAP and GATE-16 family* in *C. elegans* mit großen Ähnlichkeiten zu *lgg-2* [207], dargestellt. Darüber hinaus konnte eine Synergie des lebensverkürzenden Effekts der RNAi beider Gene festgestellt werden [258]. In der vorliegenden Arbeit führte die RNAi von *lgg-2*, genauso wie die RNAi von *bec-1* [184] zu einer Verhinderung der Glukose-induzierten Verkürzung der Überlebenszeit von TK22. Auch wenn in *C. elegans* die CMA funktionell nicht beschrieben ist, wurde in dieser Arbeit die Bedeutung von *lmp-2*, einem in *C. elegans* beschriebenen Strukturhomolog zum CMA-bedeutsamen LAMP2A aus Säugerzellen [208], ebenfalls untersucht. Ebenso wie die RNAi von *lgg-2* verhinderte auch die *lmp-2* RNAi vollständig die Glukosetoxizität in TK22. Damit wurde in dieser Arbeit ein funktioneller Nachweis für *lmp-2* erbracht, der zudem zeigt, dass neben der Hemmung der Makroautophagie auch die Inhibierung der CMA die Glukosetoxizität in TK22 unterdrückt. Da die Hemmung Makroautophagie-spezifischer Gene zu einer Verkürzung der Lebensspanne des *C. elegans* Wildtyps führte, ist zu postulieren, dass die beobachtete



Unwirksamkeit der RNAi entsprechender Gene auf die Überlebenszeit von TK22 in Abwesenheit von Glukose auf bereits einsetzenden Kompensationsmechanismen aufgrund des in TK22 erhöhten ROS-Stress beruht. Die durch Hemmung der Autophagie zusätzlich induzierte Stressantwort verhindert dann offenbar die schädigende Wirkung der Glukose. Sowohl innerhalb des Prozesses der Makroautophagie als auch der CMA wird die Degradierung der Substrate durch Lysosomen vermittelt [100]. Die Bildung der Lysosomen wurde in der vorliegenden Arbeit als Autophagie-Marker herangezogen, um den direkten Einfluss von Glukose und Quercetin auf die autophagosomale Aktivität zu ermitteln. Die Inkubation mit 10 mM Glukose resultierte in TK22 in einer signifikanten Steigerung der Lysosomen. Zu postulieren ist, dass die Autophagie aufgrund der Akkumulation Glukose-geschädigter Proteine stimuliert und gleichzeitig die durch Hemmung der Autophagie bewirkte Kompensation verhindert wird. Auch in einer Zellkulturstudie mit humanen retinalen Pigment-Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass eine Steigerung der Glukosekonzentration im Medium zu einer Steigerung der Autophagie führte. Diese Steigerung wurde erklärt durch eine Glukose-induzierte Steigerung von ROS, die in der post-translationalen Modifizierung von Proteinen sowie der Bildung von Protein-Aggregaten resultierte, die letztendlich über ER-Stress zu einer Aktivierung der Autophagie führten [259]. Weitere Studien bestätigen eine Aktivierung der Autophagie durch hyperglykämische Situationen [260–262]. Es existieren ebenfalls Hinweise darauf, dass Quercetin zu einer Aktivierung der Autophagie führt, wie zum Beispiel in Zellkultur-Studien mit Krebszellen gezeigt wurde [263–265]. In einer Untersuchung mit Schwann-Zellen wurde festgestellt, dass Quercetin Hyperglykämie-induzierte Schädigungen durch eine Aktivierung der Autophagie vermindert, allerdings war durch die Inkubation der Glukose zunächst eine Verminderung der betrachteten Autophagie-Marker verzeichnet worden [266]. In der vorliegenden Arbeit zeigte die Inkubation mit 1  $\mu$ M Quercetin keine Beeinflussung der durch 10 mM Glukose induzierten Steigerung der Lysosomenbildung in TK22, was postulieren lässt, dass die Prävention der Glukosetoxizität in TK22 durch Quercetin nicht über eine Beeinflussung der Autophagie vermittelt wird.

Ein weiterer Degradierungs-Mechanismus innerhalb der Proteostase wird durch das UPS vermittelt. Fitzenberger *et al.* untersuchten die Effekte einer Inhibierung des UPS auf die Lebensspanne von TK22 [184] und konnten zeigen, dass eine verminderte Expression von *ubq-1*, dessen Genprodukt Ubiquitin darstellt [210], sowie von *uba-1*, welches das einzige Ubiquitin-aktivierende Enzym in *C. elegans* kodiert [209, 215], die Lebensspanne unter

Hitzestress von TK22 signifikant verkürzte [184] und den lebensverlängernden Effekt des Quercetins verhinderte (Publikation 1, Appendix B1). Die RNAi von *pbs-4*, das ein Homolog einer katalytischen  $\beta$ -Untereinheit des 26S-Proteasoms in Säugerzellen kodiert [216], führte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls zu einer signifikanten Verkürzung der Überlebenszeit von TK22 und verhinderte die Protektion vor Glukose-induzierten Schäden durch Quercetin. Um die zu postulierende Hemmung des Proteasoms durch Glukose und eine Aktivierung durch Quercetin nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit die Proteasomaktivität in TK22 unter Verwendung eines spezifischen Substrats direkt ermittelt. Erwartungsgemäß resultierte die Inkubation mit 10 mM Glukose in einer signifikanten Verminderung der proteasomalen Aktivität in TK22. Eine vergleichbare Hemmung des Proteasoms durch Glukose wurde auch von Queisser *et al.* *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt [267]. Untersuchungen von Boyer *et al.* zeigten hingegen eine Hyperglykämie-abhängige Steigerung der proteasomalen Aktivität in einer Zellkultur [268] und auch Liu *et al.* stellten *in vitro* sowie *in vivo* dar, dass die Aktivität des UPS durch hyperglykämische Situationen erhöht wurde [269]. Untersuchungen von Aghdam *et al.* zu der Funktion der proteasomalen Aktivität innerhalb der Entwicklung der diabetischen Retinopathie zeigten unterschiedliche Effekte einer hyperglykämischen Situation auf die Aktivität des Proteasoms, abhängig von der Zellart. Teilweise führte die Behandlung der Zelle mit hohen Glukose-Konzentrationen zu einer Steigerung ubiquitinerter Proteine, die durch das Proteasom effizient degradiert wurden. In anderen Kompartimenten löste die hyperglykämische Situation eine verminderte proteasomale Aktivität aus, die mit Schädigungen der katalytischen Untereinheiten des Proteasoms assoziiert wurden [270]. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Glukose-induzierte Verminderung der Proteasomaktivität in TK22 deutet auf eine klare Schädigung des Proteasoms hin, die häufig mit der Progression verschiedener Pathologien sowie mit dem Alterungsprozess und der Entstehung metabolischer Veränderungen assoziiert wird [271]. Quercetin konnte als ein potenter Proteasom-Aktivator identifiziert werden, denn die durch 10 mM Glukose verminderte Proteasomaktivität in TK22 wurde durch die zusätzliche Applikation von 1  $\mu$ M Quercetin signifikant, sogar über das Niveau der Kontrollgruppe hinaus, gesteigert. Darüber hinaus konnte auch in einem *C. elegans* Alzheimer-Modell eine Aktivierung der Proteasomaktivität durch Quercetin verzeichnet werden [272]. Neben Quercetin führte, wie bereits erwähnt, auch die zusätzliche Applikation von polyphenolreichen Pflanzenextrakten (Publikation 2, Appendix B2) oder einem mit Catechinen angereichertem Grüntee-Extrakt (Publikation 3; Appendix B3) zu einer Verhinderung der

Glukosetoxizität. Auch diese protektiven Effekte waren mit einer gesteigerten Proteasomaktivität assoziiert. Die Bedeutung der Aktivierung des Proteasoms durch Quercetin für die Protektion gegenüber den schädigenden Wirkungen der Glukose wird schließlich bestätigt durch eine Verhinderung der Quercetin-abhängigen Prävention der Glukose-induzierten Verkürzung der Lebensspanne durch die zusätzliche Inkubation von TK22 mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 (Publikation 1; Appendix B.1). In der Literatur wird Quercetin allerdings hauptsächlich als Inhibitor der Proteasomaktivität beschrieben. Quercetin führte beispielsweise zu einer Senkung der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasomaktivität in Blutzellen von Hasen. Diese wurden zuvor mit einer Cholesterolreichen Diät behandelt, um Arteriosklerose zu induzieren. Durch diese Intervention wurde die Proteasomaktivität, deren Erhöhung in diesem Fall mit der Pathogenese der Arteriosklerose assoziiert wurde, gesteigert. Die zusätzliche Gabe von Quercetin senkte die Proteasomaktivität, weshalb dieses als antiatherogen postuliert wurde [273]. Auch innerhalb der Pathogenese von Krebserkrankungen scheint eine Hemmung des UPS protektiv zu sein, denn eine Aktivierung des UPS wird mit der Entstehung und Progression der Erkrankungen assoziiert. In Bezug auf Krebserkrankungen scheint allerdings insofern eine spezielle Situation vorzuliegen, als dass das UPS den Umsatz von Schlüsselfaktoren der Zellzyklus Progression, wie zum Beispiel des Tumorsuppressors p53 sowie des Inhibitors Cyclin-abhängiger Kinasen, p27, reguliert. Tumorzellen sind charakterisiert durch eine hohe Proliferationsrate, wodurch eine gewisse Abhängigkeit von einem aktiven UPS, das den Abbau dieser Zellzyklus-Suppressoren vermittelt, besteht. Weiterhin ist die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch das UPS für die Pathogenese von Tumorerkrankungen relevant, indem der Inhibitor des NF- $\kappa$ Bs (I $\kappa$ B; engl. *inhibitor of NF- $\kappa$ B*) verstärkt proteasomal abgebaut wird. Eine konstitutive Aktivierung dieses Signalwegs, teilweise vermittelt durch das UPS, wird als Charakteristikum von Tumorzellen beschrieben [274]. Dementsprechend wird die Inhibierung des UPS als Intervention innerhalb der Therapie verschiedener Krebserkrankungen diskutiert [274–276]. Für neurodegenerativen Erkrankungen hingegen ist häufig eine Störung des UPS beschrieben, wodurch ein mangelhafter Abbau von Protein-Aggregaten entsteht [277, 278] und die Steigerung der proteasomalen Aktivität deshalb als therapeutische Intervention beschrieben wird [279]. In *C. elegans* wurde Quercetin in diesem Zusammenhang, wie bereits erwähnt, schon als Proteasom-aktivierende Substanz beschrieben [272]. Unter Verwendung von TK22 konnte außerdem gezeigt werden, dass die Aktivierung des Proteasoms unter Glukose-Exposition durch Quercetin abhängig von dem Sirtuin-Homolog SIR-2.1 stattfindet, das ebenfalls für

die Prävention der Glukose-induzierten Verkürzung der Überlebenszeit benötigt wurde (Publikation 1; Appendix B.1). Für den mit Catechinen angereicherten Grüntee-Extrakt wurde ebenfalls eine *sir-2.1*-abhängige Wiederherstellung der Überlebenszeit und eine gleichzeitige Aktivierung des Proteasoms unter Glukose-Exposition verzeichnet (Publikation 3; Appendix B3). Sirtuine werden als Vermittler der Kalorien-Restriktion beschrieben und konnten als direkte Zielelemente von Polyphenolen innerhalb der Verhinderung des Alterungsprozesses in *C. elegans* identifiziert werden [280]. Umgekehrt zeigte sich eine durch Carnitin erzielte Verlängerung der Überlebenszeit von Glukose-exponierten TK22 Nematoden sowohl als unabhängig von *sir-2.1* als auch von einer Steigerung der proteasomalen Aktivität (Publikation 4; Appendix B.4).

Obwohl die Aktivität des Proteasoms in Abhängigkeit von der jeweiligen physiologischen beziehungsweise pathophysiologischen Situation gegensätzlich ist, lässt sich schlussfolgern, dass besonders unter Stress, als Folge erhöhter Exposition gegenüber Glukose oder physiologischer Alterung, eine Aktivierung des Proteasoms Schutzwirkungen entfaltet und die Stressresistenz erhöht. Eine Abnahme der Stressresistenz ist ein typisches Phänomen des Alterungsprozesses [281], der gleichzeitig mit einer Abnahme der proteasomalen Aktivität einhergeht, wie beispielsweise in *Saccharomyces cerevisiae* [282] und *Drosophila melanogaster* [283] gezeigt wurde. Wie auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit dargestellt wurde gibt es Hinweise, dass eine Aktivierung des Proteasoms dementsprechend eine Verbesserung des Alterungsprozesses und damit assoziierter Erkrankungen sowie eine Verlängerung der Lebensspanne erzielen kann [284]. In diesem Zusammenhang konnte beispielsweise in *C. elegans* die Kalorien-Restriktion mit einer Aktivierung des Proteasoms und gleichzeitiger Verlängerung der Lebensspanne assoziiert werden [284]. Die Aktivierung des Proteasoms durch Überexpression einer 20S-Untereinheit führte in dem Nematoden ebenfalls zu einer Verlängerung der Lebensspanne und einer Erhöhung der Stressresistenz in Abhängigkeit der Transkriptionsfaktoren DAF-16, HSF-1 und dem *skinhead family member* (SKN)-1 [285], ortholog zu den *nuclear respiratory factors* (NRF) in Säugerzellen [286].

Entsprechend der beschriebenen Essentialität der Aktivierung des Proteasoms im Rahmen der Prävention einer Glukosetoxizität durch Quercetin in TK22 war zu postulieren, dass auch die beschriebenen, durch eine Hemmung der Autophagie oder Unterdrückung einzelner Faktoren der UPR<sup>ER</sup> erzielten Kompensationsmechanismen durch eine Steigerung proteasomaler Aktivitäten erklärt werden können. Bezüglich der durch Doppel-

RNAi von *ire-1* und *xbp-1* erzielten Hormesis konnte gezeigt werden, dass diese mit einer gesteigerten Proteasomaktivität assoziiert war. Sowohl die Steigerung der Überlebenszeit als auch der Proteasomaktivität erwies sich als abhängig von PEK-1. Ein Zusammenhang zwischen *pek-1* und dem ERAD in *C. elegans* wurde bisher nicht beschrieben, allerdings konnten Kondratyev *et al.* eine Verbindung zwischen dem Säugetier-Homolog PERK und dem ERAD-System in einer Zellkultur-Studie herstellen [287]. Sie identifizierten ein Membran-assoziiertes Kompartiment für Substrate des ERAD-Systems, das als Reservoir für die Retranslokation der Proteine in das Cytosol und dem nachfolgenden Abbau über das UPS diente [288]. Hierbei war die Akkumulation der ERAD-Substrate PERK-abhängig [287].

Fitzenberger *et al.* zeigten bereits, dass die RNAi des Makroautophagie-spezifischen Gens *bec-1* nur dann eine Glukose-induzierte Überlebenszeitverkürzung von TK22 verhinderte, wenn nicht gleichzeitig das Proteasom durch RNAi gehemmt war. Entsprechend ist zu postulieren, dass durch Hemmung der autophagosomalen Degradierung das UPS aktiviert wird [184]. Dieses Postulat konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, denn sowohl die RNAi des Makroautophagie-spezifischen *lgg-2* als auch des CMA-relevanten *lmp-2* führten zu einer signifikanten Steigerung der Proteasomaktivität in TK22. Interaktionen zwischen Autophagie und UPS wurden bislang hauptsächlich in umgekehrter Richtung untersucht. So wurde gezeigt, dass eine Hemmung des UPS in einer Aktivierung der lysosomalen Degradierung resultiert [289–291]. Obwohl die Autophagie ursprünglich als ein relativ unspezifischer Degradierungsmechanismus beschrieben wurde, konnte die Ubiquitinierung als selektives Erkennungssignal für beide Abbau-Systeme identifiziert werden, wenn auch die Modifizierung durch Ubiquitin unterschiedlich zu sein scheint. Substrate des UPS werden vor allem über K48-Seitenketten erkannt, die Erkennung durch den autophagosomalen Signalweg geschieht scheinbar vor allem über K63-Seitenketten oder mono-ubiquitinierte Proteine [292]. In der Tat konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine moderat gesteigerte Menge K48-ubiquitinierte Proteine nach Hemmung der Autophagie durch *lmp-2* RNAi detektiert werden. Dies bedeutet, dass durch Hemmung der Autophagie mehr Proteine effizient einem gleichzeitig aktivierten UPS zum Abbau zur Verfügung stehen.

Die Aktivierung des Proteasoms stellt demnach einen molekularen Mechanismus der Stressadaptation dar, der nicht nur durch Quercetin im Rahmen der Prävention einer Glukotoxizität induziert wird, sondern auch als Kompensationsmechanismus gegenüber einer Hemmung der UPR<sup>ER</sup> und der Autophagie definiert werden kann.

## 6 Zusammenfassung

Die chronische Hyperglykämie ist ein grundlegendes Charakteristikum des Diabetes mellitus. Sie gilt als Hauptursache für die Entstehung diabetischer Komplikationen und wird mit dem frühzeitigen Tod von Individuen assoziiert.

Proteine vermitteln den Hauptteil zellulärer Funktionen und sind gleichzeitig die Makromoleküle mit der höchsten Sensitivität gegenüber zellulären Stresskonditionen aller Art. Die Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase, der Proteostase, ist folglich unabdingbar für die Funktionalität der Zelle. Umgekehrt begünstigen Schädigungen von Elementen des Proteostase-Netzwerks die Pathogenese und Progression verschiedener Erkrankungen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Stamm TK22 des Nematoden *C. elegans* als Modellorganismus herangezogen, um Glukose-induzierte Schädigungen sowie deren Prävention durch das Polyphenol Quercetin auf molekularer Ebene zu untersuchen.

Die durch Glukose-induzierte Verkürzung der Überlebenszeit von TK22 konnte durch die zusätzliche Gabe von mikromolaren Quercetin-Konzentrationen verhindert werden. Um Proteostase-relevante Gene zu identifizieren, deren Funktionalität Voraussetzung für die präventive Wirkung des Quercetins ist, wurde die Expression entsprechender Gene mittels RNA-Interferenz (RNAi) vermindert. Dabei stellte sich heraus, dass die fehlende Aktivität von zentralen Genen der *Unfolded Protein Response* im Mitochondrium (UPR<sup>mt</sup>), wie *hsp-60* und *atfs-1*, die Überlebenszeit von TK22 verkürzte und die Verlängerung der Überlebenszeit unter Glukoseexposition durch Quercetin verhinderte. Glukose führte zwar zu einer Stressantwort, wie anhand der Steigerung der Expression des Mitochondrien-spezifischen Chaperons *hsp-60* gezeigt wurde. Diese reichte jedoch nicht aus um die Glukosetoxizität zu verhindern.

Die RNAi des zentralen Transkriptionsfaktors XBP-1 der *Unfolded Protein Response* im ER (UPR<sup>ER</sup>) führte ebenfalls zur Ineffektivität des Quercetins. Interessanterweise bewirkte die zusätzliche RNAi des für die Aktivierung von XBP-1 notwendigen Gens *ire-1* keine zusätzliche Verkürzung der Überlebenszeit von mit *xbp-1* RNAi behandelten Nematoden, sondern eine Verlängerung. Als ursächlich hierfür wurde die Aktivität der Proteinkinase PEK-1 identifiziert, die offenbar innerhalb eines zum IRE-1/XBP-1 parallelen Signalwegs dessen Ausfälle überkompensiert.

Des Weiteren wurde die Bedeutung der beiden zentralen Abbauwege für geschädigte Proteine, der Autophagie und des proteasomalen Abbaus, im Hinblick auf die Glukosetoxizität verhindernden Effekte des Quercetins untersucht. Während die Effektivität des Quercetins durch eine Hemmung des Proteasoms mittels *pbs-4* RNAi vollständig unterdrückt wurde, konnte die Glukosetoxizität durch Hemmung der Makroautophagie sowie der Chaperon-vermittelten Autophagie mittels RNAi von *lgg-2* bzw. *Imp-2* vollständig verhindert werden. Die Hemmung der Autophagie führte dabei zu einer Steigerung der proteasomalen Aktivität, die sich als essentiell für die Verhinderung der Glukosetoxizität erwies und auch als der durch Quercetin aktivierte Mechanismus identifiziert wurde.

Auch die Kompensationsmechanismen unter *ire-1* und *xbp-1* Doppel-RNAi waren abhängig von einer erhöhten Proteasomaktivität und wurden durch die zusätzliche *pek-1* RNAi verhindert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Quercetin eine Glukosetoxizität in *C. elegans* TK22 in Abhängigkeit verschiedener Faktoren der UPR vollständig verhindert. Sowohl Quercetin, als auch die Hemmung zentraler Elemente der UPR und der Autophagie resultierten in einer Aktivierung des Proteasoms, das dementsprechend als entscheidendes zu aktivierendes Element im Hinblick auf die Prävention durch Glukose verursachter Schädigungen identifiziert werden konnte.

## 7 Summary

Chronic hyperglycemia is a hallmark of diabetes mellitus. It is a principal contributor to the development of diabetic complications and is associated with premature death of organisms.

Proteins mediate the bulk of cellular functions and are simultaneously the macromolecules with the highest sensitivity to all forms of cellular stress conditions. Consequently, the maintenance of protein homeostasis, proteostasis, is indispensable to cellular functionality. Conversely, impairment of proteostasis members promotes the pathogenesis and progression of various diseases. In the present work the TK22 strain of the nematode *Caenorhabditis elegans* was used as a model organism to study glucose-induced damages and their prevention by the polyphenol quercetin at the molecular level.

The glucose-induced survival time reduction of TK22 was prevented by the additional administration of micromolar quercetin concentrations. In order to identify relevant genes of the proteostasis network, which are required for the preventive effect of quercetin, the expression of respective genes was decreased by RNA-interference (RNAi). By doing so the missing activity of central genes of the mitochondrial unfolded protein response (UPR<sup>mt</sup>), i. e. *hsp-60* and *atfs-1*, was shown to shorten the survival time of TK22 and to prevent the survival prolonging effect of quercetin under glucose exposure. Although the application of glucose activated a stress response in terms of an increased expression of the mitochondrion-specific chaperone *hsp-60*, this activation was insufficient to prevent glucose toxicity.

RNAi for XBP-1, the central transcription factor of the unfolded protein response in the ER (UPR<sup>ER</sup>), also resulted in ineffectiveness of quercetin. Interestingly, the additional RNAi of *ire-1*, a gene that is required for XBP-1-activation, did not result in an additional survival time reduction of *xbp-1* RNAi treated nematodes, but prolonged the survival time. The causative factor for this was identified to be the activity of the protein kinase PEK-1, which apparently overcompensates the failure of IRE-1/XBP-1 signaling in a parallel pathway.

The significance of central degradation pathways for damaged proteins, i.e. autophagy and the proteasomal degradation, was also examined with respect to the glucose toxicity-



preventing effects of quercetin. Whereas the effectiveness of quercetin was completely suppressed owing to inhibition of the proteasome by *pbs-4* RNAi, glucose toxicity was completely prevented due to inhibition of macroautophagy and chaperone-mediated autophagy by *lgg-2* RNAi and *lmp-2* RNAi, respectively. Inhibition of autophagy resulted in an increased proteasomal activity, which was proven to be crucial for the prevention of glucose toxicity and also identified as the mechanism that was activated by quercetin.

Also the compensatory mechanisms in the presence of *ire-1* and *xbp-1* double-RNAi were dependent on an increased proteasomal activity and were prevented by additional *pek-1* RNAi.

In conclusion, quercetin completely prevents glucose toxicity in *C. elegans* TK22 depending on multiple members of the UPR. Since both, quercetin and the inhibition of central elements of UPR and autophagy, respectively, resulted in an activation of the proteasome, the latter was identified as the crucial element, which has to be activated regarding the prevention of glucose-induced damages.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Thorens B (2015) GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* 58(2):221–232
2. Giugliano D, Ceriello A, Esposito K (2008) Glucose metabolism and hyperglycemia. *Am J Clin Nutr* 87(1):217S-222S
3. Meyer C, Dostou JM, Welle SL, Gerich JE (2002) Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*(2):E419-427
4. Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414(6865):799–806
5. Khan AH, Pessin JE (2002) Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45(11):1475–1483
6. Reaven GM (1988) Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37(12):1595–1607
7. Giacco F, Brownlee M (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 107(9):1058–1070
8. Haist RE, Best CH (1940) Factors affecting the insulin content of pancreas. *Science* 91(2365):410
9. DeFronzo RA (1988) Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37(6):667–687
10. Rossetti L (1995) Glucose toxicity: the implications of hyperglycemia in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Clin Invest Med* 18(4):255–260
11. Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA (1990) Glucose toxicity. *Diabetes Care* 13(6):610–630
12. Monnier L, Colette C, Owens D (2012) The glycemic triumvirate and diabetic complications: is the whole greater than the sum of its component parts? *Diabetes Res Clin Pract* 95(3):303–311
13. Reusch, Jane E B (2003) Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose? *J Clin Invest* 112(7):986–988
14. Cade WT (2008) Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther* 88(11):1322–1335

15. Donaghue KC, Chiarelli F, Trotta D, Allgrove J, Dahl-Jorgensen K (2007) ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2006-2007. Microvascular and macrovascular complications. *Pediatr Diabetes* 8(3):163–170
16. Mooradian AD, Thurman JE (1999) Glucotoxicity: potential mechanisms. *Clin Geriatr Med* 15(2):255
17. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404(6779):787–790
18. Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865):813–820
19. Robertson RP (2004) Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 279(41):42351–42354
20. Yan L (2014) Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. *J Diabetes Res* 2014:137919
21. Wallace DC (1992) Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 61:1175–1212
22. Brownlee M (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54(6):1615–1625
23. Trumpower BL (1990) The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *J Biol Chem* 265(20):11409–11412
24. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo YD (2011) Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells* 32(6):491–509
25. Brand MD (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 45(7-8):466–472
26. Loschen G, Azzi A, Flohé L (1973) Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation: relationship with energy conservation. *FEBS Lett* 33(1):84–87
27. Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552(Pt 2):335–344
28. Adam-Vizi V, Chinopoulos C (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* 27(12):639–645
29. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120(4):483–495

30. Rolo AP, Palmeira CM (2006) Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 212(2):167–178
31. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416(1):15–18
32. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22):12222–12226
33. Tang WH, Martin KA, Hwa J (2012) Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Front Pharmacol* 3:87
34. Lee AY, Chung SK, Chung SS (1995) Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(7):2780–2784
35. Lee AY, Chung SS (1999) Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 13(1):23–30
36. Yasunari K, Kohno M, Kano H, Minami M, Yoshikawa J (2000) Aldose reductase inhibitor improves insulin-mediated glucose uptake and prevents migration of human coronary artery smooth muscle cells induced by high glucose. *Hypertension* 35(5):1092–1098
37. Vedantham S, Noh H, Ananthakrishnan R, Son N, Hallam K, Hu Y, Yu S, Shen X, Rosario R, Lu Y, Ravindranath T, Drosatos K, Huggins LA, Schmidt AM, Goldberg IJ, Ramasamy R (2011) Human aldose reductase expression accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(8):1805–1813
38. Ma J, Hart GW (2013) Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications. *Expert Rev Proteomics* 10(4):365–380
39. Clark RJ, McDonough PM, Swanson E, Trost SU, Suzuki M, Fukuda M, Dillmann WH (2003) Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. *J Biol Chem* 278(45):44230–44237
40. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED (1998) High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 101(1):160–169

41. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M (2001) Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 108(9):1341–1348
42. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL (1994) Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* 43(9):1122–1129
43. Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL (1997) Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* 100(1):115–126
44. Dunlop ME, Larkins RG (1985) Pancreatic islets synthesize phospholipids de novo from glucose via acyl-dihydroxyacetone phosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 132(2):467–473
45. Idris I, Gray S, Donnelly R (2001) Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia* 44(6):659–673
46. Geraldes P, King GL (2010) Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* 106(8):1319–1331
47. Jakus V, Rietbrock N (2004) Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res* 53(2):131–142
48. Thornalley PJ (1990) The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J* 269(1):1–11
49. Niforou K, Cheimonidou C, Trougakos IP (2014) Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biol* 2:323–332
50. Di Domenico F, Head E, Butterfield DA, Perluigi M (2014) Oxidative stress and proteostasis network: culprit and casualty of alzheimer's-like neurodegeneration. *Advances in Geriatrics* Volume 2014, Article ID 527518, 14 pages. doi:10.1155/2014/527518
51. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475(7356):324–332
52. Amm I, Sommer T, Wolf DH (2014) Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 1843(1):182–196

53. Díaz-Villanueva JF, Díaz-Molina R, García-González V (2015) Protein folding and mechanisms of proteostasis. *Int J Mol Sci* 16(8):17193–17230
54. Morimoto RI (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12(24):3788–3796
55. Bozaykut P, Ozer NK, Karademir B (2014) Regulation of protein turnover by heat shock proteins. *Free Radic Biol Med* 77:195–209
56. Calamini B, Morimoto RI (2012) Protein homeostasis as a therapeutic target for diseases of protein conformation. *Curr Top Med Chem* 12(22):2623–2640
57. Bartlett AI, Radford SE (2009) An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nat Struct Mol Biol* 16(6):582–588
58. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW (2008) Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319(5865):916–919
59. Powers ET, Balch WE (2013) Diversity in the origins of proteostasis networks--a driver for protein function in evolution. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(4):237–248
60. Morimoto RI, Cuervo AM (2014) Proteostasis and the aging proteome in health and disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69 Suppl 1:S33-8
61. Chen B, Retzlaff M, Roos T, Frydman J (2011) Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(8):a004374
62. Saibil H (2013) Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(10):630–642
63. Arslan MA, Csermely P, Soti C (2006) Protein homeostasis and molecular chaperones in aging. *Biogerontology* 7(5-6):383–389
64. Albanèse V, Yam AY, Baughman J, Parnot C, Frydman J (2006) Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell* 124(1):75–88
65. Lindquist S, Craig EA (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631–677
66. Voisine C, Pedersen JS, Morimoto RI (2010) Chaperone networks: tipping the balance in protein folding diseases. *Neurobiol Dis* 40(1):12–20
67. Stolz A, Wolf DH (2010) Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. *Biochim Biophys Acta* 1803(6):694–705
68. Bukau B, Horwich AL (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92(3):351–366

69. Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295(5561):1852–1858
70. Horwich AL, Fenton WA (2009) Chaperonin-mediated protein folding: using a central cavity to kinetically assist polypeptide chain folding. *Q Rev Biophys* 42(2):83–116
71. Young JC, Moarefi I, Hartl FU (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154(2):267–273
72. Wyatt AR, Yerbury JJ, Ecroyd H, Wilson MR (2013) Extracellular chaperones and proteostasis. *Annu Rev Biochem* 82:295–322
73. Pellegrino MW, Nargund AM, Haynes CM (2013) Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta* 1833(2):410–416
74. Voos W (2009) Mitochondrial protein homeostasis: the cooperative roles of chaperones and proteases. *Res Microbiol* 160(9):718–725
75. Haynes CM, Ron D (2010) The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *J Cell Sci* 123(Pt 22):3849–3855
76. Baker MJ, Tatsuta T, Langer T (2011) Quality control of mitochondrial proteostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(7)
77. Jovaisaite V, Auwerx J (2015) The mitochondrial unfolded protein response—synchronizing genomes. *Curr Opin Cell Biol* 33:74–81
78. Zhao Q, Wang J, Levichkin IV, Stasinopoulos S, Ryan MT, Hoogenraad NJ (2002) A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J* 21(17):4411–4419
79. Mottis A, Jovaisaite V, Auwerx J (2014) The mitochondrial unfolded protein response in mammalian physiology. *Mamm Genome* 25(9-10):424–433
80. Aldridge JE, Horibe T, Hoogenraad NJ (2007) Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements. *PLoS ONE* 2(9):e874
81. Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7):519–529
82. Scheuner D, Kaufman RJ (2008) The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr Rev* 29(3):317–333
83. Wu J, Kaufman RJ (2006) From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ* 13(3):374–384
84. Zhang K, Kaufman RJ (2004) Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279(25):25935–25938

85. Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS (2011) Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* 334(6059):1086–1090
86. Senft D, Ronai ZA (2015) UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci* 40(3):141–148
87. Wang S, Kaufman RJ (2012) The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol* 197(7):857–867
88. Schröder M, Kaufman RJ (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74:739–789
89. Walter P, Ron D (2011) The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334(6059):1081–1086
90. Hetz C, Chevet E, Oakes SA (2015) Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol* 17(7):829–838
91. Brewer JW (2014) Regulatory crosstalk within the mammalian unfolded protein response. *Cell Mol Life Sci* 71(6):1067–1079
92. Lai E, Teodoro T, Volchuk A (2007) Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 22:193–201
93. Kitamura M (2008) Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces. *Am J Physiol Renal Physiol* 295(2):F323–34
94. Rutkowski DT, Kaufman RJ (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 14(1):20–28
95. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107(7):881–891
96. Christianson JC, Ye Y (2014) Cleaning up in the endoplasmic reticulum: ubiquitin in charge. *Nat Struct Mol Biol* 21(4):325–335
97. Parzych KR, Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 20(3):460–473
98. Glick D, Barth S, Macleod KF (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221(1):3–12
99. Kroemer G, Mariño G, Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 40(2):280–293
100. Rytter SW, Cloonan SM, Choi, Augustine M K (2013) Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Mol Cells* 36(1):7–16



101. Pallauf K, Rimbach G (2013) Autophagy, polyphenols and healthy ageing. *Ageing Res Rev* 12(1):237–252
102. Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147(4):728–741
103. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z (2012) Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol* 22(1):R29-34
104. Rabinowitz JD, White E (2010) Autophagy and metabolism. *Science* 330(6009):1344–1348
105. Bejarano E, Cuervo AM (2010) Chaperone-mediated autophagy. *Proc Am Thorac Soc* 7(1):29–39
106. Cuervo AM, Wong E (2014) Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res* 24(1):92–104
107. Kaushik S, Massey AC, Mizushima N, Cuervo AM (2008) Constitutive activation of chaperone-mediated autophagy in cells with impaired macroautophagy. *Mol Biol Cell* 19(5):2179–2192
108. Martinez-Vicente M, Cuervo AM (2007) Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* 6(4):352–361
109. Li W, Li J, Bao J (2012) Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* 69(7):1125–1136
110. Schmidt M, Finley D (2014) Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1843(1):13–25
111. Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82(2):373–428
112. Aghdam SY, Sheibani N (2013) The ubiquitin-proteasome system and microvascular complications of diabetes. *J Ophthalmic Vis Res* 8(3):244–256
113. Kostova Z, Wolf DH (2003) For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J* 22(10):2309–2317
114. Adams J (2003) The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev* 29 Suppl 1:3–9
115. Tanaka K, Matsuda N (2014) Proteostasis and neurodegeneration: the roles of proteasomal degradation and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1843(1):197–204
116. Üstün S, Börnke F (2014) Interactions of Xanthomonas type-III effector proteins with the plant ubiquitin and ubiquitin-like pathways. *Front Plant Sci* 5:736

117. Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL (2012) The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol* 83(1):6–15
118. Leonov A, Arlia-Ciommo A, Piano A, Svistkova V, Lutchman V, Medkour Y, Titorenko VI (2015) Longevity extension by phytochemicals. *Molecules* 20(4):6544–6572
119. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79(5):727–747
120. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45(4):287–306
121. Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2(5):270–278
122. Beecher GR (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* 133(10):3248S–3254S
123. Formica JV, Regelson W (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 33(12):1061–1080
124. Miles SL, McFarland M, Niles RM (2014) Molecular and physiological actions of quercetin: need for clinical trials to assess its benefits in human disease. *Nutr Rev* 72(11):720–734
125. Guo Y, Bruno RS (2015) Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. *J Nutr Biochem* 26(3):201–210
126. Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130(8S Suppl):2073S–85S
127. Boots AW, Haenen, Guido R M M, Bast A (2008) Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 585(2-3):325–337
128. Sharmila G, Bhat FA, Arunkumar R, Elumalai P, Raja Singh P, Senthilkumar K, Arunakaran J (2014) Chemopreventive effect of quercetin, a natural dietary flavonoid on prostate cancer in in vivo model. *Clin Nutr* 33(4):718–726
129. Lee KW, Bode AM, Dong Z (2011) Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 11(3):211–218
130. Kim J, Kang M, Choi H, Jeong S, Lee Y, Kim J (2011) Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. *Nutr Res Pract* 5(2):107–111

131. Bhattacharya S, Oksbjerg N, Young JF, Jeppesen PB (2014) Caffeic acid, naringenin and quercetin enhance glucose-stimulated insulin secretion and glucose sensitivity in INS-1E cells. *Diabetes Obes Metab* 16(7):602–612
132. Zhao L, Du Y, Chen L, Liu Z, Pan Y, Liu J, Liu B (2014) Quercetin protects against high glucose-induced damage in bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Int J Mol Med* 34(4):1025–1031
133. Mahmoud MF, Hassan NA, El Bassossy, Hany M, Fahmy A (2013) Quercetin protects against diabetes-induced exaggerated vasoconstriction in rats: effect on low grade inflammation. *PLoS ONE* 8(5):e63784
134. Poinar, GO, Jr (1983) The natural history of nematodes. *Prentice-Hall, Inc.*
135. Lucius R, Loos-Frank B (2008) Biologie der Parasiten. *Berlin: Springer, 2. ed.*
136. Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1):71–94
137. Nicholas WL (1984) The biology of free-living nematodes. *Oxford: Clarendon Press, 2. ed.*
138. Altun ZF, Hall DH (2009) Introduction. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.1, <http://www.wormatlas.org>
139. Corsi AK (2006) A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*. *Anal Biochem* 359(1):1–17
140. Fay DS (2013) Classical genetic methods. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. doi/10.1895/wormbook.1.165.1, <http://www.wormbook.org>
141. The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282(5396):2012–2018
142. Culetto E, Sattelle DB (2000) A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum Mol Genet* 9(6):869–877
143. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806–811
144. Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>
145. Lints, R and Hall, DH (2009) The cuticle. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.12, <http://www.wormatlas.org>

146. White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S (1986) The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond Series B. Biol Sci* 314(1165):1–340
147. Ward S, Thomson N, White JG, Brenner S (1975) Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* 160(3):313–337
148. Sulston JE, Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56(1):110–156
149. Altun ZF, Hall DH (2011) Nervous system, general description. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.18, <http://www.wormatlas.org>
150. Altun ZF, Hall DH (2009) Muscle system, nonstriated muscle. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.8, <http://www.wormatlas.org>
151. Altun ZF, Hall DH (2009) Alimentary system, intestine. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.4, <http://www.wormatlas.org>
152. Schulenburg H, Leopold Kurz C, Ewbank JJ (2004) Evolution of the innate immune system: the worm perspective. *Immunol Rev* 198(1):36–58
153. Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100(1):64–119
154. McGhee JD (2007) The *C. elegans* intestine. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. doi/10.1895/wormbook.1.133.1, <http://www.wormbook.org>
155. Lints, R and Hall, DH (2009) Reproductive system, overview. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.21, <http://www.wormatlas.org>
156. Lints, R and Hall, DH (2009) Reproductive system, somatic gonad. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.22, <http://www.wormatlas.org>
157. Lints, R and Hall, DH (2009) Reproductive system, egg-laying apparatus. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.24, <http://www.wormatlas.org>
158. Lints, R and Hall, DH (2009) Male introduction. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.2.1, <http://www.wormatlas.org>
159. Meyer BJ (1997) Sex determination and X chromosome dosage compensation. In *C. elegans II* (Eds. Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR). Chap. 9. pp 209-240. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
160. Lints, R and Hall, DH (2009) Male reproductive system, general description. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.2.14, <http://www.wormatlas.org>

161. Klass M, Wolf N, Hirsh D (1976) Development of the male reproductive system and sexual transformation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 52(1):1–18
162. Hirsh D, Oppenheim D, Klass M (1976) Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 49(1):200–219
163. Kimble J, Hirsh D (1979) The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 70(2):396–417
164. Ward S, Carrel JS (1979) Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 73(2):304–321
165. Lints, R and Hall, DH (2009) Reproductive system, germ line. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.23, <http://www.wormatlas.org>
166. Hubbard, EJA, and Greenstein, D (2005) Introduction to the germ line. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. doi/10.1895/wormbook.1.18.1, <http://www.wormbook.org>
167. Crittenden SL, Troemel ER, Evans TC, Kimble J (1994) GLP-1 is localized to the mitotic region of the *C. elegans* germ line. *Development* 120(10):2901–2911
168. L'Hernault SW (1997) Spermatogenesis. In *C. elegans II* (Eds. Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR). Chap. 11. pp 417-500. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
169. Nelson GA, Ward S (1980) Vesicle fusion, pseudopod extension and amoeboid motility are induced in nematode spermatids by the ionophore monensin. *Cell* 19(2):457–464
170. Ward S, Hogan E, Nelson GA (1983) The initiation of spermiogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 98(1):70–79
171. Miller MA, Nguyen VQ, Lee MH, Kosinski M, Schedl T, Caprioli RM, Greenstein D (2001) A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. *Science* 291(5511):2144–2147
172. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M (2015) A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. doi/10.1895/wormbook.1.177.1, <http://www.wormbook.org>
173. Hodgkin J, Doniach T (1997) Natural variation and copulatory plug formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 146(1):149–164
174. LaMunyon CW, Ward S (1998) Larger sperm outcompete smaller sperm in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Biol Sci* 265(1409):1997–2002
175. LaMunyon CW, Ward S (1999) Evolution of sperm size in nematodes: sperm competition favours larger sperm. *Proc Biol Sci* 266(1416):263–267

176. Ambros V (2000) Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 10(4):428–433
177. Johnson TE, Mitchell DH, Kline S, Kemal R, Foy J (1984) Arresting development arrests aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 28(1):23–40
178. Slack F, Ruvkun G (1997) Temporal pattern formation by heterochronic genes. *Annu Rev Genet* 31:611–634
179. Cassada RC, Russell RL (1975) The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 46(2):326–342
180. Golden JW, Riddle DL (1984) The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Dev Biol* 102(2):368–378
181. Byerly L, Cassada RC, Russell RL (1976) The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev Biol* 51(1):23–33
182. Schlotterer A, Kukudov G, Bozorgmehr F, Hutter H, Du X, Oikonomou D, Ibrahim Y, Pfisterer F, Rabbani N, Thornalley P, Sayed A, Fleming T, Humpert P, Schwenger V, Zeier M, Hamann A, Stern D, Brownlee M, Bierhaus A, Nawroth P, Morcos M (2009) *C. elegans* as model for the study of high glucose-mediated life span reduction. *Diabetes* 58(11):2450–2456
183. Lee S, Murphy CT, Kenyon C (2009) Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell Metab* 10(5):379–391
184. Fitzenberger E, Boll M, Wenzel U (2013) Impairment of the proteasome is crucial for glucose-induced lifespan reduction in the *mev-1* mutant of *Caenorhabditis elegans*. *Biochim Biophys Acta* 1832(4):565–573
185. Ishii N, Takahashi K, Tomita S, Keino T, Honda S, Yoshino K, Suzuki K (1990) A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mutat Res* 237(3-4):165–171
186. Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ayusawa D, Suzuki K (1998) A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* 394(6694):694–697
187. Dröse S (2013) Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochim Biophys Acta* 1827(5):578–587

188. Ishii T, Miyazawa M, Hartman PS, Ishii N (2011) Mitochondrial superoxide anion (O<sub>2</sub>(-)) inducible "mev-1" animal models for aging research. *BMB reports* 44(5):298–305
189. Kirstein-Miles J, Morimoto RI (2010) *Caenorhabditis elegans* as a model system to study intercompartmental proteostasis: Interrelation of mitochondrial function, longevity, and neurodegenerative diseases. *Dev Dyn* 239(5):1529–1538
190. Heschl MF, Baillie DL (1989) Characterization of the hsp70 multigene family of *Caenorhabditis elegans*. *DNA (Mary Ann Liebert, Inc.)* 8(4):233–243
191. Yoneda T, Benedetti C, Urano F, Clark SG, Harding HP, Ron D (2004) Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J Cell Sci* 117(Pt 18):4055–4066
192. Heschl MF, Baillie DL (1990) The HSP70 multigene family of *Caenorhabditis elegans*. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry* 96(4):633–637
193. Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415(6867):92–96
194. Haynes CM, Yang Y, Blais SP, Neubert TA, Ron D (2010) The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Mol Cell* 37(4):529–540
195. Haynes CM, Petrova K, Benedetti C, Yang Y, Ron D (2007) ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Dev Cell* 13(4):467–480
196. Broadley SA, Hartl FU (2008) Mitochondrial stress signaling: a pathway unfolds. *Trends Cell Biol* 18(1):1–4
197. Shen X, Ellis RE, Lee K, Liu CY, Yang K, Solomon A, Yoshida H, Morimoto R, Kurnit DM, Mori K, Kaufman RJ (2001) Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* 107(7):893–903
198. Richardson CE, Kinkel S, Kim DH (2011) Physiological IRE-1-XBP-1 and PEK-1 signaling in *Caenorhabditis elegans* larval development and immunity. *PLoS Genet* 7(11):e1002391
199. Mori K (2009) Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *J Biochem* 146(6):743–750

- 
200. Shen X, Ellis RE, Sakaki K, Kaufman RJ (2005) Genetic interactions due to constitutive and inducible gene regulation mediated by the unfolded protein response in *C. elegans*. *PLoS Genet* 1(3):e37
201. Urano F, Calfon M, Yoneda T, Yun C, Kiraly M, Clark SG, Ron D (2002) A survival pathway for *Caenorhabditis elegans* with a blocked unfolded protein response. *J Cell Biol* 158(4):639–646
202. Zhang H, Chang JT, Guo B, Hansen M, Jia K, Kovács AL, Kumsta C, Lapierre LR, Legouis R, Lin L, Lu Q, Meléndez A, O'Rourke EJ, Sato K, Sato M, Wang X, Wu F (2015) Guidelines for monitoring autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* 11(1):9–27
203. Meléndez A, Levine B (2009) Autophagy in *C. elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. doi/10.1895/wormbook.1.147.1, <http://www.wormbook.org>
204. Jenzer C, Simionato E, Legouis R (2015) Tools and methods to analyze autophagy in *C. elegans*. *Methods* 75:162–171
205. Meléndez A, Neufeld TP (2008) The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development* 135(14):2347–2360
206. Takacs-Vellai K, Vellai T, Puoti A, Passannante M, Wicky C, Streit A, Kovacs AL, Müller F (2005) Inactivation of the autophagy gene *bec-1* triggers apoptotic cell death in *C. elegans*. *Curr Biol* 15(16):1513–1517
207. Manil-Ségalen M, Lefebvre C, Jenzer C, Trichet M, Boulogne C, Satiat-Jeunemaitre B, Legouis R (2014) The *C. elegans* LC3 acts downstream of GABARAP to degrade autophagosomes by interacting with the HOPS subunit VPS39. *Dev Cell* 28(1):43–55
208. Schuske K, Palfreyman MT, Watanabe S, Jorgensen EM (2007) UNC-46 is required for trafficking of the vesicular GABA transporter. *Nat Neurosci* 10(7):846–853
209. Kipreos ET (2005) Ubiquitin-mediated pathways in *C. elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook . doi/10.1895/wormbook.1.36.1, <http://www.wormbook.org>
210. Graham RW, Jones D, Candido EP (1989) UbiA, the major polyubiquitin locus in *Caenorhabditis elegans*, has unusual structural features and is constitutively expressed. *Mol Cell Biol* 9(1):268–277
211. Schlesinger MJ, Bond U (1987) Ubiquitin genes. *Oxf Surv Eukaryot Genes* 4:77–91
212. Johnston SC, Riddle SM, Cohen RE, Hill CP (1999) Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases. *EMBO J* 18(14):3877–3887



- 
213. Finley D, Bartel B, Varshavsky A (1989) The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* 338(6214):394–401
214. Jones D, Candido EP (1993) Novel ubiquitin-like ribosomal protein fusion genes from the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *J Biol Chem* 268(26):19545–19551
215. Kulkarni M, Smith HE (2008) E1 ubiquitin-activating enzyme UBA-1 plays multiple roles throughout *C. elegans* development. *PLoS Genet* 4(7):e1000131
216. Papaevgeniou N, Chondrogianni N (2014) The ubiquitin proteasome system in *Caenorhabditis elegans* and its regulation. *Redox Biol* 2:333–347
217. Davy A, Bello P, Thierry-Mieg N, Vaglio P, Hitti J, Doucette-Stamm L, Thierry-Mieg D, Reboul J, Boulton S, Walhout AJ, Coux O, Vidal M (2001) A protein-protein interaction map of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome. *EMBO reports* 2(9):821–828
218. Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418(6894):244–251
219. Grishok A (2005) RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* 579(26):5932–5939
220. Timmons L, Court DL, Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263(1-2):103–112
221. Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahringer J (2001) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* 2(1):research0002.1-research0002.10
222. Gill MS, Olsen A, Sampayo JN, Lithgow GJ (2003) An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 35(6):558–565
223. Pierzyńska-Mach A, Janowski PA, Dobrucki JW (2014) Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles. *Cytometry A* 85(8):729–737
224. Boulin T, Etchberger JF, Hobert O (2006) Reporter gene fusions. In *The C. elegans Research Community* (ed.), WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.106.1, <http://www.wormbook.org>.

225. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
226. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685
227. Thorpe GH, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP (1985) Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem* 31(8):1335–1341
228. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45
229. Hipp MS, Park S, Hartl FU (2014) Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol* 24(9):506–514
230. Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE (2009) Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem* 78:959–991
231. Labbadia J, Morimoto RI (2015) The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev Biochem* 84:435–464
232. Kaushik S, Cuervo AM (2015) Proteostasis and aging. *Nat Med* 21(12):1406–1415
233. Morimoto RI (2008) Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev* 22(11):1427–1438
234. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2013) Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem* 82:323–355
235. Jaisson S, Gillery P (2014) Impaired proteostasis: role in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetologia* 57(8):1517–1527
236. Benedetti C, Haynes CM, Yang Y, Harding HP, Ron D (2006) Ubiquitin-like protein 5 positively regulates chaperone gene expression in the mitochondrial unfolded protein response. *Genetics* 174(1):229–239
237. Nargund AM, Pellegrino MW, Fiorese CJ, Baker BM, Haynes CM (2012) Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science* 337(6094):587–590
238. Andreux PA, Houtkooper RH, Auwerx J (2013) Pharmacological approaches to restore mitochondrial function. *Nat Rev Drug Discov* 12(6):465–483

239. Kimura K, Tanaka N, Nakamura N, Takano S, Ohkuma S (2007) Knockdown of mitochondrial heat shock protein 70 promotes progeria-like phenotypes in *caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 282(8):5910–5918
240. Bruce CR, Carey AL, Hawley JA, Febbraio MA (2003) Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. *Diabetes* 52(9):2338–2345
241. Kurucz I, Morva A, Vaag A, Eriksson K, Huang X, Groop L, Koranyi L (2002) Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes* 51(4):1102–1109
242. Chung J, Nguyen A, Henstridge DC, Holmes AG, Chan, M H Stanley, Mesa JL, Lancaster GI, Southgate RJ, Bruce CR, Duffy SJ, Horvath I, Mestrlil R, Watt MJ, Hooper PL, Kingwell BA, Vigh L, Hevener A, Febbraio MA (2008) HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(5):1739–1744
243. Kavanagh K, Flynn DM, Jenkins KA, Zhang L, Wagner JD (2011) Restoring HSP70 deficiencies improves glucose tolerance in diabetic monkeys. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(5):E894-901
244. Atalay M, Oksala, Niku K J, Laaksonen DE, Khanna S, Nakao C, Lappalainen J, Roy S, Hänninen O, Sen CK (2004) Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *J Appl Physiol* 97(2):605–611
245. Mimura N, Fulciniti M, Gorgun G, Tai Y, Cirstea D, Santo L, Hu Y, Fabre C, Minami J, Ohguchi H, Kiziltepe T, Ikeda H, Kawano Y, French M, Blumenthal M, Tam V, Kertesz NL, Malyankar UM, Hokenson M, Pham T, Zeng Q, Patterson JB, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC (2012) Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 $\alpha$  is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood* 119(24):5772–5781
246. Back SH, Schröder M, Lee K, Zhang K, Kaufman RJ (2005) ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods* 35(4):395–416
247. Henis-Korenblit S, Zhang P, Hansen M, McCormick M, Lee S, Cary M, Kenyon C (2010) Insulin/IGF-1 signaling mutants reprogram ER stress response regulators to promote longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(21):9730–9735
248. Kapulkin WJ, Kapulkin V, Hiester BG, Link CD (2005) Compensatory regulation among ER chaperones in *C. elegans*. *FEBS Lett* 579(14):3063–3068

249. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka T, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M (2005) Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem* 280(1):847–851
250. Moruno F, Pérez-Jiménez E, Knecht E (2012) Regulation of autophagy by glucose in Mammalian cells. *Cells* 1(3):372–395
251. Kaniuk NA, Kiraly M, Bates H, Vranic M, Volchuk A, Brumell JH (2007) Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta-cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. *Diabetes* 56(4):930–939
252. Fitzenberger E (2013) Molecular mechanisms underlying the prevention of glucose-induced life span reduction by the polyphenol quercetin in the *mev-1* mutant of *Caenorhabditis elegans*. Dissertation. Veröffentlicht in Giessener Elektronische Bibliothek, 04.03.2013. Justus-Liebig-Universität Giessen. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2013/9223/>
253. Trocoli A, Mathieu J, Priault M, Reiffers J, Souquère S, Pierron G, Besançon F, Djavaheri-Mergny M (2011) ATRA-induced upregulation of Beclin 1 prolongs the life span of differentiated acute promyelocytic leukemia cells. *Autophagy* 7(10):1108–1114
254. Pyo J, Yoo S, Ahn H, Nah J, Hong S, Kam T, Jung S, Jung Y (2013) Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat Commun* 4:2300
255. Mai S, Muster B, Bereiter-Hahn J, Jendrach M (2012) Autophagy proteins LC3B, ATG5 and ATG12 participate in quality control after mitochondrial damage and influence lifespan. *Autophagy* 8(1):47–62
256. Schiavi A, Torgovnick A, Kell A, Megalou E, Castelein N, Guccini I, Marzocchella L, Gelino S, Hansen M, Malisan F, Condò I, Bei R, Rea SL, Braeckman BP, Tavernarakis N, Testi R, Ventura N (2013) Autophagy induction extends lifespan and reduces lipid content in response to frataxin silencing in *C. elegans*. *Exp Gerontol* 48(2):191–201
257. Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, Eskelinen E, Hall DH, Levine B (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301(5638):1387–1391
258. Alberti A, Michelet X, Djeddi A, Legouis R (2010) The autophagosomal protein LGG-2 acts synergistically with LGG-1 in dauer formation and longevity in *C. elegans*. *Autophagy* 6(5):622–633

259. Yao J, Tao Z, Li C, Li X, Cao G, Jiang Q, Yan B (2014) Regulation of autophagy by high glucose in human retinal pigment epithelium. *Cell Physiol Biochem* 33(1):107–116
260. Adastra KL, Chi MM, Riley JK, Moley KH (2011) A differential autophagic response to hyperglycemia in the developing murine embryo. *Reproduction* 141(5):607–615
261. Wang X, Li S, Wang G, Ma Z, Chuai M, Cao L, Yang X (2015) High glucose environment inhibits cranial neural crest survival by activating excessive autophagy in the chick embryo. *Sci Rep* 5:18321
262. Yan J, Feng Z, Liu J, Shen W, Wang Y, Wertz K, Weber P, Long J, Liu J (2012) Enhanced autophagy plays a cardinal role in mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats: ameliorating effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Nutr Biochem* 23(7):716–724
263. Klappan AK, Hones S, Mylonas I, Brüning A (2012) Proteasome inhibition by quercetin triggers macroautophagy and blocks mTOR activity. *Histochem Cell Biol* 137(1):25–36
264. Psahoulia FH, Moutzi S, Roberts ML, Sasazuki T, Shirasawa S, Pintzas A (2007) Quercetin mediates preferential degradation of oncogenic Ras and causes autophagy in Ha-RAS-transformed human colon cells. *Carcinogenesis* 28(5):1021–1031
265. Wang K, Liu R, Li J, Mao J, Lei Y, Wu J, Zeng J, Zhang T, Wu H, Chen L, Huang C, Wei Y (2011) Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of Akt-mTOR- and hypoxia-induced factor 1 $\alpha$ -mediated signaling. *Autophagy* 7(9):966–978
266. Qu L, Liang X, Gu B, Liu W (2014) Quercetin alleviates high glucose-induced Schwann cell damage by autophagy. *Neural Regen Res* 9(12):1195–1203
267. Queisser MA, Yao D, Geisler S, Hammes H, Lochnit G, Schleicher ED, Brownlee M, Preissner KT (2010) Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal. *Diabetes* 59(3):670–678
268. Boyer F, Rondeau P, Bourdon E (2014) Hyperglycemia induces oxidative damage in SW872 cells. *Arch Med Biomed Res* 1:66–78
269. Liu H, Yu S, Xu W, Xu J (2012) Enhancement of 26S proteasome functionality connects oxidative stress and vascular endothelial inflammatory response in diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(9):2131–2140

270. Aghdam SY, Gurel Z, Ghaffarieh A, Sorenson CM, Sheibani N (2013) High glucose and diabetes modulate cellular proteasome function: Implications in the pathogenesis of diabetes complications. *Biochem Biophys Res Commun* 432(2):339–344
271. Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, Ono A, Ohara J, Baba T, Murata S, Tanaka K, Kasahara M (2012) Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am J Pathol* 180(3):963–972
272. Regitz C, Dußling LM, Wenzel U (2014) Amyloid-beta ( $A\beta_{1-42}$ )-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is inhibited by the polyphenol quercetin through activation of protein degradation pathways. *Mol Nutr Food Res* 58(10):1931–1940
273. Pashevin DA, Tumanovska LV, Dosenko VE, Nagibin VS, Gurianova VL, Moibenko AA (2011) Antiatherogenic effect of quercetin is mediated by proteasome inhibition in the aorta and circulating leukocytes. *Pharmacol Rep* 63(4):1009–1018
274. Shen M, Schmitt S, Buac D, Dou QP (2013) Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 17(9):1091–1108
275. Dou QP, Zonder JA (2014) Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies: perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system. *Curr Cancer Drug Targets* 14(6):517–536
276. McConkey DJ, Zhu K (2008) Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat* 11(4-5):164–179
277. Choi J, Levey AI, Weintraub ST, Rees HD, Gearing M, Chin L, Li L (2004) Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem* 279(13):13256–13264
278. Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292(5521):1552–1555
279. Huang Q, Figueiredo-Pereira ME (2010) Ubiquitin/proteasome pathway impairment in neurodegeneration: therapeutic implications. *Apoptosis* 15(11):1292–1311
280. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430(7000):686–689

281. Epel ES, Lithgow GJ (2014) Stress biology and aging mechanisms: toward understanding the deep connection between adaptation to stress and longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69 Suppl 1:S10-6
282. Chen Q, Thorpe J, Ding Q, El-Amouri IS, Keller JN (2004) Proteasome synthesis and assembly are required for survival during stationary phase. *Free Radic Biol Med* 37(6):859–868
283. Vernace VA, Arnaud L, Schmidt-Glenewinkel T, Figueiredo-Pereira ME (2007) Aging perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J* 21(11):2672–2682
284. Chondrogianni N, Voutetakis K, Kapetanou M, Delitsikou V, Papaevgeniou N, Sakellari M, Lefaki M, Filippopoulou K, Gonos ES (2015) Proteasome activation: An innovative promising approach for delaying aging and retarding age-related diseases. *Ageing Res Rev* 23(Pt A):37–55
285. Chondrogianni N, Georgila K, Kourtis N, Tavernarakis N, Gonos ES (2015) 20S proteasome activation promotes life span extension and resistance to proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J* 29(2):611–622
286. An JH, Blackwell TK (2003) SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev* 17(15):1882–1893
287. Kondratyev M, Avezov E, Shenkman M, Groisman B, Lederkremer GZ (2007) PERK-dependent compartmentalization of ERAD and unfolded protein response machineries during ER stress. *Exp Cell Res* 313(16):3395–3407
288. Kamhi-Nesher S, Shenkman M, Tolchinsky S, Fromm SV, Ehrlich R, Lederkremer GZ (2001) A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 12(6):1711–1723
289. Kyrychenko VO, Nagibin VS, Tumanovska LV, Pashevin DO, Gurianova VL, Moibenko AA, Dosenko VE, Klionsky DJ (2014) Knockdown of PSMB7 induces autophagy in cardiomyocyte cultures: possible role in endoplasmic reticulum stress. *Pathobiology* 81(1):8–14
290. Ding W, Ni H, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, Yin X (2007) Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol* 171(2):513–524
291. Kawaguchi T, Miyazawa K, Moriya S, Ohtomo T, Che X, Naito M, Itoh M, Tomoda A (2011) Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells:

- crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress. *Int J Oncol* 38(3):643–654
292. Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC (2010) Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett* 584(7):1393–1398
293. Takiff HE, Chen SM, Court DL (1989) Genetic analysis of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171(5):2581–2590
294. Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 408(6810):325–330
295. Rual J, Ceron J, Koreth J, Hao T, Nicot A, Hirozane-Kishikawa T, Vandenhaute J, Orkin SH, Hill DE, van den Heuvel, Sander, Vidal M (2004) Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome Res* 14(10B):2162–2168



## A Appendix: Material

### A.1 Verbrauchsmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle A.1 aufgeführt und wurden von Brand GmbH (Wertheim, D), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D), Duran Group GmbH (Wertheim/Main, D), Gilson Inc. (Middleton, USA), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D), Labcon North America (Petaluma, USA), Pechiney (Chicago, USA), Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, D), Qiagen (Hilden, D) und Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D).

**Tabelle A.1: Verbrauchsmaterialien**

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
Bechergläser	Duran
Deckel für 384 Well Mikrotiterplatten	Brand
Deckel für 2 ml Schraubdeckelreaktionsgefäße	Peqlab
Deckgläser (24x50 mm)	Carl Roth
Edelstahlskalpell	Carl Roth
Erlenmeyerkolben (verschiedene Größen)	Duran
Gefrier- und Kochfolie	Carl Roth
Laborflaschen mit Schraubverschluss	Duran
Messzylinder	Brand
Mikrotiterplatten (96 Well, 384 Well)	Greiner Bio-One
Multiwellplatten (24 Well, 96 Well)	Greiner Bio-One
Objektträger (25x75 mm)	Carl Roth
Parafilm M (10,2 cm x 38,1 m)	Pechiney
Pasteurpipetten (mit und ohne Wattestopfen, 150 mm)	Carl Roth
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Labcon
Petrischalen (35 x 10 mm, 92 x 16 mm)	Sarstedt

Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen <i>low retention</i> (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Polyvinylidenfluorid-Membran (Porengröße 0,45 µm)	Carl Roth
Precellys Keramik Kügelchen (1,4 mm)	Peqlab
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Rotilabo® Abdeckfolie für Mikrotiterplatten	Carl Roth
Rotilabo® Aluminiumfolie	Carl Roth
Rotilabo® Cryoboxen	Carl Roth
Rotilabo® Einmalküvetten Halbmikro (1,5 ml) und Mikro (70 µl)	Carl Roth
Rotilabo® Impföse	Carl Roth
Rotor Gene Tubes für Rotor Gene-Q Real-time PCR Cyclers (0,1 ml)	Qiagen
Schraubdeckelreaktionsgefäße (2 ml)	Peqlab
Seriosieraufsatz Distrip (125 ml, 1250 ml, 12500 ml)	Gilson
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Whatman-Papier (20 x 20 cm, 0,34 mm)	Carl Roth
Zahnstocher	Carl Roth
Zellkulturröhrchen	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt

## A.2 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Laborhilfsmittel sowie deren Hersteller sind in Tabelle A.2 aufgeführt.

**Tabelle A.2: Geräte und Laborhilfsmittel**

Geräte	Hersteller
Autoklav Systec DB23	Systec (Wettenberg, D)
Biophotometer Plus	Eppendorf (Hamburg, D)
Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene® Labware (Langenselbold, D)

---

Elektrophorese Komplettsystem Mini Protean 3 Cell	Biorad (München, D)
Elektrophorese System Perfect Blue Gelsystem™	Peqlab (Erlangen, D)
Fluoreszenzmikroskop EVOS fl Colour	AMG (Bothell, USA)
Fluoroskan Ascent FL	Labsystems (Bornheim, D)
Inkubator	WTB Binder (Tuttlingen, D)
Kaltlichtquelle KL200	Schott AG (Mainz, D)
Kühlzentrifuge Universal 320 R	Hettich (Tuttlingen, D)
Mikrowelle	Cinex (Ascheberg, D)
Moticam 2500 USB 2.0	Bayersdörfer (Saarbrücken-Eschringen, D)
Optimax X-Ray Film Processor	Protec Medizintechnik (Oberstenfeld, D)
pH-Meter	Schott Instruments (Mainz, D)
Pipetus®	Hirschmann (Eberstadt, D)
Präzisionswaage	Kern & Sohn (Balingen, D)
Rotor Gene-Q Real-time PCR Cycler	Qiagen (Hilden, D)
Röntgenfilmkassette	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Schüttler	Eppendorf (Hamburg, D)
Schüttler unimax 1010 mit Inkubator	Heidolph (Hamburg, D)
Semi-Dry Blotter Modell HEP 1	Owl (Portsmouth, USA)
Seriendosierer DistriMan	Gilson (Bad Camberg, D)
Stereomikroskop	Breukhoven Microscope Systems (Capelle a/d IJssel, NL)
Sterilisator	WTB Binder (Tuttlingen, D)
Sterilwerkbank (HS12/2)	Heraeus (Hanau, D)
Thermocycler Veriti® 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Thermostatschrank	Lovibond (Dortmund, D)
Tischzentrifuge Universal 320R	Hettich (Tuttlingen, D)
Trockenschrank	Heraeus (Hanau, D)
Überkopfschüttler (intelli-mixer)	neoLab (Heidelberg, D)

---

Ultraschallbad Sonorex	Bandelin electronic (Berlin, D)
Vakuum-Folienschweißer FS 6171-07	Siemssen Product Service GmbH (Münster, D)
Vakuumpumpe Laboport	neoLab (Heidelberg, D)
Variopipetten 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson (Bad Camberg, D)
VisiBlue™ Transilluminator	UVP (Cambridge, UK)
Vortex mixer REAX control	Heidolph Instruments (Schwabach, D)
Wasseraufbereitungssystem Synergy	Millipore (Schwalbach, D)
Wasserbad	LAUDA (Königshofen, D)
Zentrifuge Mikro 120	Hettich (Tuttlingen, D)

### A.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle A.3 gibt die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des jeweiligen Herstellers und der entsprechenden Bestellnummer wieder. Die Produkte wurden bezogen von AppliChem (Darmstadt, D), Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D), Fermentas (St. Leon-Rot, D), Life Technologies GmbH (Darmstadt, D), Merck KGaA (Darmstadt, D), Promega (Madison, USA), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D) und Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D).

**Tabelle A.3: Chemikalien und Reagenzien**

Produkt	Hersteller	Bestellnummer
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth	6908.1
1-Methyl-2-Propanol	Sigma-Aldrich	58460
2-Mercaptoethanol	Carl Roth	4227.3
2x YT-Medium	Carl Roth	X966.2
Acrylamid-Lösung (30 %)	Carl Roth	3029.1
Adenosin-5-triphosphat Dinatriumsalz (ATP)	Carl Roth	HN38.2

---

Agar Agar SERVA Kobe I	Serva	11392
	Electrophoresis	
Agarose	Carl Roth	T846.2
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma-Aldrich	A2153
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth	9592.3
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth	K0291
Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat	Bio-Rad	500-0006
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	32768
Calciumchlorid Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Carl Roth	5239.2
Carbenicillin Dinatriumsalz	AppliChem	C1389
Cholesterol	Sigma-Aldrich	C8667
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich	D5758
di-Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	Carl Roth	P749.2
Dimethylsulfoxid, (DMSO) ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ )	Carl Roth	4720.2
di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Carl Roth	P030.1
DNA-Beladungspuffer (6x)	Fermentas	R0611
Essigsäure	Carl Roth	7332.1
Ethanol (> 99.5 %)	Carl Roth	5054.3
Ethanol (70 %, vergällt)	Carl Roth	T913.3
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth	CN06.1
Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas	SM0321
Glycerin	Carl Roth	3783.1
Glycin	Carl Roth	3908.2
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich	I3021
Isopropanol (2-Propanol, 99.8 %)	Carl Roth	6752.3
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth	2316.4
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Carl Roth	3904.1
Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth	6751.1

---

Levamisol Hydrochlorid	Sigma-Aldrich	46944
Luminol	Carl Roth	4203.1
LysoTracker® Red DND-99	Life Technologies	S7020
Magnesiumchloride Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O)	Carl Roth	2189.2
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O)	Carl Roth	P027.2
Methanol	Carl Roth	4627.4
MG-132	Calbiochem (Merck)	474790
Milchpulver	Carl Roth	T145.1
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth	2367.3
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth	9105.3
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth	3957.1
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth	6771.1
Natriumhypochlorid-Lösung (NaClO in H <sub>2</sub> O, 12 % Cl)	Carl Roth	9062.3
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth	4360.2
Nystatin Suspension	Sigma-Aldrich	N1638
P-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich	C9008
Pepton aus Casein	Merck	111931
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad	1610374S
Quercetin Dihydrat	Carl Roth	7138.1
Suc-LLVY-AMC	Sigma-Aldrich	S6510
SYBR Safe	Life Technologies	S33102
SYTOX® Green nucleic acid stain in DMSO	Life Technologies	S7020
Tetracyclin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich	T77660
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth	4855.2
TRIS-Hydrochlorid (TRIS-HCL)	Carl Roth	9090.3
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich	P2287
α-D(+)-Glukose Monohydrat	Carl Roth	6780.1

## A.4 Puffer und Lösungen

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen mit der Angabe von Konzentration, den einzelnen Bestandteilen und entsprechenden Mengenangaben sowie dem jeweiligen Lösungsmittel aufgeführt.

**Tabelle A.4: Stammlösungen**

Stammlösung	Konzentration	Lösungsmittel
Ampicillin *	100 mg/ml	50 % Ethanol
CaCl <sub>2</sub> #	1 M	H <sub>2</sub> O bidest.
Carbenicillin *	25 mg/ml	50 % Ethanol
Cholesterol *	5 mg/ml	Ethanol
EDTA †	0,5 M	H <sub>2</sub> O bidest.
IPTG *	1 M	50 % Ethanol
Kanamycin #	25 mg/ml	H <sub>2</sub> O bidest.
KCl	50 mM	H <sub>2</sub> O bidest.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> #	1 M	H <sub>2</sub> O bidest.
KOH †	5 N	H <sub>2</sub> O bidest.
Levamisol #	2 mM	M9-Puffer
Luminol *	250 mM	DMSO
LysoTracker® Red DND-99 *	1 mM	DMSO
MG-132 *	1 mM	DMSO
MgCl <sub>2</sub> #	2,5 mM	H <sub>2</sub> O bidest.
MgSO <sub>4</sub> #	0,1 M	H <sub>2</sub> O bidest.
MgSO <sub>4</sub> #	1 M	H <sub>2</sub> O bidest.
NaOH †	5 N	H <sub>2</sub> O bidest.
p-Coumarinsäure *	90 mM	DMSO
Proteinase K *	20 mg/ml	H <sub>2</sub> O bidest.
Quercetin-Dihydrat	10 mM	Ethanol : TWEEN® 20 (92:8 v / v)

SDS †	20 % w/v	H <sub>2</sub> O bidest.
Suc-LLVY-AMC *	14 mM	DMSO
SYTOX® Green nucleic acid stain	5 mM	M9:Tween®20
Tetracyclin *	25 mg/ml	50 % Ethanol
TRIS pH 6,8 †	0,5 M	H <sub>2</sub> O bidest.
TRIS pH 8,3 †	1 mM	H <sub>2</sub> O bidest.
TRIS pH 8,5 †	1 M	H <sub>2</sub> O bidest.
TRIS pH 8,8 †	1,5 M	H <sub>2</sub> O bidest.
α-D(+)-Glukose Monohydrat	1 M	M9-Puffer

Die Stammlösungen wurden bei -20 °C \*, bei 4 °C #, oder bei RT † gelagert. Die Stammlösung für Glukose wurde stets frisch angesetzt.

## Puffer und Lösungen für die Kultivierung von *C. elegans*

**Tabelle A.5: Bleichlösung**

<b>Bleichlösung</b>	
NaOH (5 N)	0,5 ml
NaClO (12 % Cl)	0,5 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	0,5 ml

Die Bleichlösung wurde für jeden *egg-prep* frisch angesetzt.

**Tabelle A.6: Einfrier-Puffer A**

<b>Einfrier-Puffer A</b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,8 g
NaCl	2,9 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 500 ml
→ pH 5,95	
→ autoklavieren	

Die Lagerung des Einfrier-Puffers A fand bei 4 °C statt.



**Tabelle A.7: Einfrier-Puffer B****Einfrier-Puffer B**

Einfrier-Puffer A	700 ml
Glycin	300 ml

Die Lagerung des Einfrier-Puffers B fand bei 4 °C statt.

**Tabelle A.8: Ethanol:Tween®20****Ethanol:Tween®20**

Ethanol	92 ml
Tween®20	8 ml

Ethanol:Tween®20 wurde bei 4 °C gelagert.

**Tabelle A.9: M9-Puffer****M9-Puffer**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O bidest.	999 ml

→ autoklavieren, abkühlen auf 60 °C, anschließende Zugabe von

MgSO <sub>4</sub> (1 M)	1 ml
-------------------------	------

Der M9-Puffer war bei RT lagerfähig.

**Tabelle A.10: M9:Tween®20****M9:Tween®20**

M9-Puffer	495 ml
Tween®20	5 ml

M9:Tween®20 wurde bei RT gelagert.

**Tabelle A.11: NaCl-Pepton****NaCl-Pepton**

NaCl	2,5 g
Pepton	3 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1 l
→ autoklavieren	

Im Anschluss an das Autoklavieren wurde die NaCl-Pepton-Lösung bei RT gelagert.

**Puffer und Lösungen für biochemische Methoden****Tabelle A.12: 3x Lämmli-Puffer****3x Lämmli-Puffer**

TRIS (pH 6,8, 1 M)	2,4 ml
20 % SDS (w/v)	3 ml
Glycin	3 ml
β-Mercaptoethanol	1,6 ml
Bromphenolblau	0,006 g

Der 3x Lämmli-Puffer wurde bei -20 °C gelagert.

**Tabelle A.13: 10x Lauf-Puffer****10x Lauf-Puffer**

TRIS	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1 l

Der 10x Lauf-Puffer war bei RT lagerfähig und wurde vor Gebrauch 1:10 mit H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt.

**Tabelle A.14: 10x TBS-Puffer****10x TBS-Puffer**

NaCl	8,77 g
TRIS	6,06 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 100 ml
→ pH 7,5	

Der 10x TBS-Puffer war bei RT lagerfähig und wurde vor Gebrauch 1:10 mit H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt.

**Tabelle A.15: 10x TBS-T-Puffer****10x TBS-T-Puffer**

Tween®20	500 µl
10x TBS-Puffer	ad 100 ml

Der 10x TBS-T-Puffer war bei RT lagerfähig und wurde vor Gebrauch 1:10 mit H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt.

**Tabelle A.16: Block-Puffer****Block-Puffer**

Milchpulver	1 g
1x TBS-T-Puffer	100 ml

Der Block-Puffer war 1 Woche bei 4 °C lagerfähig.

**Tabelle A.17: Blot-Puffer nach Towbin****Blot-Puffer nach Towbin**

TRIS	3,03 g
Glycin	14,4 g
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1 l

Der Blot-Puffer war bei RT lagerfähig.

**Tabelle A.18: ECL-Lösung****ECL-Lösung****Lösung A**

TRIS (pH 8,5, 1 M)	5 ml
p-Coumarinsäure	110 µl
Luminol	250 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	45 ml

**Lösung B**

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)	100 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	900 µl

Für die Detektion von HRP-konjugierten Antikörpern wurden 10 ml der ECL-Lösung A mit 30 µl der ECL-Lösung B vermischt. Dieses Gemisch war vor Gebrauch frisch anzusetzen, wobei die einzelnen Lösungen 1 Woche bei 4 °C lagerfähig waren.

**Tabelle A.19: Lyse-Puffer I****Lyse-Puffer I**

HEPES (pH 7,4)	12 g
NaCl	9 g
EDTA	1,5 g
DDT	0,3 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1 l

Der Lyse-Puffer I wurde bei 4 °C gelagert.

**Tabelle A.20: Proteasomaktivitäts-Messpuffer**

<b>Proteasomaktivitäts-Messpuffer</b>	
HEPES (pH 7,4)	12 g
NaCl	9 g
EDTA	1,5 g
ATP	2,8 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1 l

Der Proteasomaktivitäts-Messpuffer war bei -20 °C lagerfähig.

**Tabelle A.21: Strip-Puffer**

<b>Strip-Puffer</b>	
TRIS	7,51 g
SDS	20 g
DTT	15,43 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1 l

Der Strip-Puffer wurde bei RT gelagert. Vor Gebrauch wurde das DTT frisch hinzugefügt.

## **Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden**

**Tabelle A.22: 50x TAE-Puffer**

<b>50x TAE-Puffer</b>	
TRIS	242 g
Essigsäure	57,1 ml
EDTA	100 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1 l

Der 50x TAE-Puffer war bei RT lagerfähig und wurde vor Gebrauch 1:50 mit H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt.

**Tabelle A.23: DEPC-Wasser****DEPC-Wasser**

DEPC	1 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1 l
→ autoklavieren	

DEPC dient der Inaktivierung von Nukleasen und wurde in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung von nukleasefreiem H<sub>2</sub>O verwendet. DEPC-H<sub>2</sub>O war bei RT lagerfähig.

**Tabelle A.24: Lyse-Puffer II****Lyse-Puffer II (Wurm-Lyse-Puffer für die SW-PCR)**

TRIS (pH 8,3, 10 mM)	0,121 g
KCl	0,3725 g
MgCl <sub>2</sub>	50,825 g
IGEPAL	450 µl
Tween@20	450 µl
Gelatine	100 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 100 ml
→ autoklavieren	
Proteinase K (25 mg/ml)	5 µl

Der Lyse-Puffer II wurde bei RT gelagert. Ein Gemisch aus 5 µl Proteinase K-Stammlösung und 995 µl Puffer wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.

## A.5 Medien

In den folgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendeten Medien sowie deren Bestandteile mit entsprechenden Mengenangaben dargestellt.

**Tabelle A.25: 2x YT-Agar**

<b>2x YT-Agar</b>	
2x YT-Medium	6,2 g
Agar	3 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 200 ml
→ autoklavieren	
Für die Kultivierung von HT115 zusätzlich:	
Ampicillin (100 mg/ml)	200 µl
Tetracyclin (25 mg/ml)	200 µl

2x YT-Agarplatten wurden für die Kultivierung von *E. coli* OP50 und HT115 verwendet. Nach dem Abkühlen des Agars auf 55 °C wurden die Platten unter sterilen Bedingungen gegossen und waren bei 4 °C lagerfähig.

**Tabelle A.26: 2x YT-Medium**

<b>2x YT-Medium</b>	
2x YT-Medium	31 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1 l
→ pH 7,0	
→ autoklavieren	

Flüssiges 2x YT-Medium wurde für die *E. coli* OP50- und HT115-Flüssigkultivierung verwendet. Im Anschluss an das Autoklavieren fand die Lagerung bei RT statt.

**Tabelle A.27: NGM-Agar**

<b>NGM-Agar</b>	
Agar	17 g
Pepton	2,5 g
NaCl	3 g
H <sub>2</sub> O bidest.	947 ml
→ autoklavieren, abkühlen auf 60 °C	
CaCl <sub>2</sub> (0,1 M)	1 ml
Carbenicillin (25 mg/ml)	1 ml
Cholesterol (5 mg/ml)	1 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M, pH 6,0)	25 ml
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	1 ml
Nystatinsuspension	25 ml

NGM-Agarplatten wurden für die Kultivierung von *C. elegans* verwendet. Im Anschluss an das Gießen der Platten unter sterilen Bedingungen fand die Lagerung bei RT statt.

**Tabelle A.28: Flüssig-NGM**

<b>Flüssig-NGM</b>	
CaCl <sub>2</sub> (0,1 M)	10 µl
Cholesterol (5 mg/ml)	10 µl
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M, pH 6,0)	250 µl
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	10 µl
NaCl-Pepton	9,71 ml
Carbenicillin (25 mg/ml) für Experimente mit <i>E. coli</i> OP50	10 µl
Kanamycin (25 mg/ml) für Experimente mit <i>E. coli</i> HT115	20 µl

Alle Experimente mit *C. elegans* wurden in frisch angesetzttem Flüssig-NGM durchgeführt. Für RNAi-Experimente wurde Carbenicillin durch Kanamycin ersetzt, um die *E. coli* HT115 Bakterien zu inaktivieren.



## A.6 *C. elegans* Stämme

Tabelle A.29 gibt die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *C. elegans* Stämme mit Angabe des jeweiligen Genotyps wieder. Die Stämme SJ4005, SJ4058 und TK22 wurden vom CGC (University of Minnesota, St. Paul, USA) bezogen. Die Stämme mit den Genotypen *zcls4 [hsp-4p::GFP] V; mev-1(kn1)* und *zcls9 [hsp-60p::GFP] V; mev-1(kn1)* wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert (Absatz 3.5.1).

**Tabelle A.29: *C. elegans* Stämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
N2	Wildtyp	[136]
SJ4005	<i>zcls4 [hsp-4p::GFP] V</i>	[193]
SJ4058	<i>zcls9 [hsp-60p::GFP] V</i>	[191]
TK22	<i>mev-1(kn1)</i>	[185]
SJ4005xTK22	<i>zcls4 [hsp-4p::GFP] V; mev-1(kn1)</i>	
SJ4058xTK22	<i>zcls9 [hsp-60p::GFP] V; mev-1(kn1)</i>	

## A.7 Bakterien Stämme

Tabelle A.30 gibt die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien-Stämme mit Angabe des jeweiligen Genotyps wieder. Der *E. coli*-Stamm OP50 wurde vom CGC (University of Minnesota, St. Paul, USA) bezogen, der HT115-Klon von Source Bioscience - Lifesciences (UK).

**Tabelle A.30: Bakterien Stämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> OP50	ura-	[136]
<i>E. coli</i> HT115	<i>F-</i> , <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> , <i>IN(rrnD-rrnE)1</i> , <i>lambda-</i> , <i>rnc14::Tn10(DE3 lysogen: lavUV5</i> <i>promoter -T7 polymerase)</i>	[293]

## A.8 RNAi-Klone

Die in dieser Arbeit verwendeten RNAi-Klone sind in Tabelle A.31 aufgeführt. Sie stammen aus den RNAi-Bibliotheken von Ahringer (*C. elegans* RNAi Library) [221, 294] und Vidal (*C. elegans* ORF RNAi Library) [295].

**Tabelle A.31: RNAi-Klone**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Cosmid</b>	<b>Beschreibung</b>
<i>abu-11</i>	T01D1.6	<i>activated in blocked unfolded protein response</i>
<i>atfs-1</i>	ZC376.7	<i>activating transcription factor associated with stress</i>
<i>hsp-4</i>	F43E2.8	<i>heat shock protein</i>
<i>hsp-6</i>	C37H5.8	<i>heat shock protein</i>
<i>hsp-60</i>	Y22D7AL.5	<i>heat shock protein</i>
<i>ire-1</i>	C41C4.4	<i>IRE1 kinase related</i>
<i>lgg-2</i>	ZK593.6	<i>LC3, GABARAP and GATE-16 family</i>
<i>lmp-2</i>	C05D9.2	<i>LAMP (lysosome-associated membrane protein) homolog</i>
<i>pek-1</i>	F46C3.1	<i>human PERK kinase homolog</i>
<i>xbp-1</i>	R74.3	<i>x-box binding protein homologue</i>

## A.9 Kits

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kits sind mit Hersteller und Bestellnummer in Tabelle A.32 aufgeführt.

**Tabelle A.32: Kits**

Kit	Hersteller	Bestellnummer
Brilliant II SYBR <sup>®</sup> Green QRT-PCR Master Mix Kit, 1-Step	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)	600825
Fast Plasmid <sup>™</sup> Mini Kit	5Prime (Hilden, D)	2300000
KAPA2G Fast Hot Start PCR Kit	Peqlab (Erlangen, D)	07-KK5530-02
Roti <sup>®</sup> -Prep RNA MINI	Carl Roth (Karlsruhe, D)	8485.1

## A.10 Enzyme und Antikörper

In Tabelle A.33 sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Antikörper mit Angabe des Herstellers und der Bestellnummer aufgelistet.

**Tabelle A.33: Enzyme und Antikörper**

Enzym	Schnittstelle	Hersteller	Bestellnummer
<i>Kpn2I</i> ( <i>BspEI</i> )	5' T↓C C G G A 3' 3' A G G C C↑T 5'	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, D)	ER0531
Antikörper		Hersteller	Bestellnummer
Rabbit-anti-ubiquitin (linkage-specific K48) (monoclonal)		Abcam (Cambridge, UK) (RabMab)	ab140601
Mouse-anti-actin (monoclonal)		Dianova (Hamburg, D)	DLN-07276
Mouse anti-rabbit IgG-HRP (polyclonal)		Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)	sc-2357
Goat anti-mouse IgG-HRP (polyclonal)		Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)	sc-2005

## A.11 Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des *National Center for Biotechnology (NCBI) Primer Designing Tools* entworfen und von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) synthetisiert. Die Sequenzen und Schmelztemperaturen ( $T_m$ ; engl. *melting temperature*) der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle A.34 aufgeführt.

**Tabelle A.34: Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	$T_m$ (C°)
GFP-fw-111	AGT GGA GAG GGT GAA GGT GA	60
GFP-rv-794	GGC AGA TTG TGT GGA CAG GT	60
hsp-4-qPCR-fw-14	CGT TGA TTT TGA TTG CCT TC	53,8
hsp-4-qPCR-rv-171	TGA TTC TGT TTC CTT GAT CG	53,4
mev-1-fw-24	CCA ACT GCG ATT CTG TGC C	52
mev-1-rv-573	CCT GTC CAA CAT TAT TGA CTC CC	52
pek-1-qPCR-fw-2554	ATC CAT AAC AGA GCG ATG AT	53,2
pek-1-qPCR-rv-2687	ATC CAA TCT TCA AGG GTC TT	53,2
18S rRNA-fw	ATG GTT GCA AAG CTG AAA CT	53,2
18S rRNA-rev	TCC CGT GTT GAG TCA AAT TA	53,2

$T_m$ : *melting temperature*

---

## A.12 Software

In Tabelle A.35 ist die Software, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, mit Angabe des Herstellers aufgezeigt.

**Tabelle A.35: Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Ascent Software for Fluoroskan 2.6	Thermo Labsystems (Bornheim, D)
GraphPad Prism 5	Graph Pad Software (San Diego, USA)
Image J 1.44	National Institute of Health (Bethesda, USA)
Motic Images Plus 2.0 ML	Beyersdörfer (Saarbrücken-Eschringen, D)
Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2 (Build 4)	Qiagen (Hilden, D)

---

## **B Appendix: Publikationen**

### **B.1 Publikation 1**

Fitzenberger E, **Deusing DJ**, Marx C, Boll M, Lüersen K, Wenzel U (2014) The polyphenol quercetin protects the *mev-1* mutant of *Caenorhabditis elegans* from glucose-induced reduction of survival under heat-stress depending on SIR-2.1, DAF-12, and proteasomal activity. *Mol Nutr Food Res* 58(5):984-994

## RESEARCH ARTICLE

# The polyphenol quercetin protects the *mev-1* mutant of *Caenorhabditis elegans* from glucose-induced reduction of survival under heat-stress depending on SIR-2.1, DAF-12, and proteasomal activity

Elena Fitzenberger<sup>1</sup>, Dorothe J. Deusing<sup>1</sup>, Carolin Marx<sup>1</sup>, Michael Boll<sup>1</sup>, Kai Lüersen<sup>2</sup> and Uwe Wenzel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Molecular Nutrition Research, Interdisciplinary Research Centre, Justus-Liebig-University of Giessen, Giessen, Germany

<sup>2</sup> Molecular Prevention, Institute of Human Nutrition and Food Science, Christian-Albrechts-University of Kiel, Kiel, Germany

**Scope:** Hyperglycemia is a hallmark of diabetes mellitus but slighter increases of blood glucose levels are observed also during ageing. Using the *Caenorhabditis elegans mev-1* mutant, we identified molecular mechanisms underlying the protection from glucose toxicity by the polyphenol quercetin.

**Methods and results:** We fed *C. elegans mev-1* mutants on a liquid medium supplemented with 10 mM glucose, which resulted in a reduced survival at 37°C. The polyphenol quercetin (1 µM) was able to prevent glucose-induced lifespan reduction completely. RNA interference revealed that the sirtuin SIR-2.1, the nuclear hormone receptor DAF-12, and its putative co-activator MDT-15 were critical for the quercetin effects. Moreover, RNA interference for key factors of proteostasis reduced survival, which was not further affected by glucose or quercetin, suggesting that those proteins are a target for both substances. Besides unfolded protein response, proper functionality of the proteasome was shown to be crucial for the survival enhancing effects of quercetin and the polyphenol was finally demonstrated to activate proteasomal degradation.

**Conclusion:** Our studies demonstrate that lowest concentrations of quercetin prevent a glucose-induced reduction of survival. SIR-2.1, DAF-12, and MDT-15 were identified as targets that activate unfolded protein response and proteasomal degradation to limit the accumulation of functionally restricted proteins.

**Keywords:**

*Caenorhabditis elegans* / Nuclear hormone receptor / Proteostasis / SIR-2.1 / Unfolded protein response



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Received: September 30, 2013

Revised: November 19, 2013

Accepted: November 21, 2013

**Correspondence:** Dr. Elena Fitzenberger, Molecular Nutrition Research, Interdisciplinary Research Centre, Justus-Liebig-University of Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany

**E-mail:** elena.fitzenberger@ernaehrung.uni-giessen.de

**Fax:** +49-641-99-39229

**Abbreviations:** AGEs, advanced glycation end products; NGM, nematode growth medium; ROS, reactive oxygen species; UPR<sup>ER</sup>, unfolded protein response of the endoplasmic reticulum; UPR<sup>mt</sup>, unfolded protein response of mitochondria

## 1 Introduction

Hyperglycemia is a hallmark of diabetes mellitus that is held responsible for a number of late onset complications [1]. A modest increase in blood glucose levels, however, is also observed during healthy ageing [2]. Mechanisms suggested to contribute to the detrimental effects of glucose encompass enhanced generation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) in combination with increased protein oxidation [3, 4], the formation of advanced glycation end products (AGEs) [5, 6], and disturbances of mitochondrial functionality [7, 8].

In order to slow the ageing process, caloric restriction has been consistently shown to work from yeast to humans [9]. Beyond a conservation of insulin sensitivity [10], reductions of oxidative stress [11] and AGE formation [12], as well as a proper functionality of the proteostasis network were found to be associated with this situation [13]. The proteostasis network describes a protein quality control system that involves among others proteins acting in unfolded protein response in mitochondria (UPR<sup>mt</sup>) or the endoplasmic reticulum (UPR<sup>ER</sup>), or which play a role for the cellular degradation of proteins by the proteasome or by autophagosomes [14]. This protein quality control system has been suggested to be of vital importance for the maintenance and function of the proteome and thus the health and viability of cells and organisms [15, 16].

Many of the beneficial effects of caloric restriction on health and lifespan are mediated by sirtuins, which function as NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylases [17, 18]. Certain polyphenols, such as resveratrol from red grapes and red wine, have been identified as sirtuin-activating compounds that mimic caloric restriction and delay the ageing process in metazoans [19]. Also in mice it was demonstrated that resveratrol shifts the physiology of middle-aged mice on a high-calorie diet toward that of mice on a standard diet and significantly increased their survival [20]. Nevertheless, the exact mechanisms through which those effects are achieved are not fully elucidated [21]. In addition to resveratrol, a number of other polyphenols from red wine, including quercetin, were shown to act via identical mechanisms as resveratrol on ageing-relevant processes [22]. In a wild-type strain of the nematode *Caenorhabditis elegans*, it was shown that the extension of stress protective and life prolonging actions of quercetin are not only due to its strong antioxidant capacity but may also be mediated by modulation of signaling pathways [23].

In the present study, we used the *mev-1* mutant of *C. elegans*, which is characterized by enhanced mitochondrial ROS production [24], to find that 1  $\mu$ M of the polyphenol quercetin is able to completely prevent the reduction of survival under heat-stress at 37°C which was caused by 10 mM glucose. The concentration of the polyphenol applied reflects plasma concentrations in humans after ingestion of a polyphenol-rich diet [25]. In order to investigate the role of the proteostasis network for this effect, RNA interference (RNAi) was accomplished to knockdown key proteins of the protein quality control system. Quantitative PCR and Western blotting served the evaluation of effects on the expression level of critical factors. Finally, activities of proteasomal degradation were assessed in order to describe associations between the lifespan extension by quercetin and proteasomal protein degradation.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Strains and maintenance

*Caenorhabditis elegans* strains were maintained on nematode growth medium (NGM) agar plates seeded with *Es-*

*cherichia coli* OP50 at 20°C according to standard protocols [26]. *Caenorhabditis elegans* TK22 *mev-1(kn1)*, TJ356 *daf-16::gfp(zls356)*, and *E. coli* OP50 were obtained from the *C. elegans* Genetics Center (University of Minnesota, MN, USA). Transgenic *mev-1* nematodes expressing the DAF-16::GFP transgene zIS356 in TK22(*mev-1*) were generated by crossing as described below. *Escherichia coli* HT115 RNAi clones were purchased from Source Bioscience (Cambridge, UK) and included a negative control (empty L4440 vector), *sir-2.1* (R11A8.4), *aak-2* (T01C8.1), *jnk-1* (B0478.1), *hsf-1* (Y53C10A.12), *daf-9* (T13C5.1), *daf-12* (F11A1.3), *daf-16* (R13H8.1), *mdt-15* (R12B2.5), *dve-1* (ZK1193.5), *ubl-5* (F46F11.4), *hsp-6* (C37H5.8), *hsp-60* (Y22D7AL.5), *atfs-1* (ZC376.7), *abu-1* (AC3.3), *xbp-1* (R74.3), *ubq-1* (F25B5.4), *uba-1* (C47E12.5). The RNAi clone *abu-11* (T01D1.6) was constructed using standard cloning techniques as described previously [27].

For all experiments, synchronous nematode populations were used that were obtained by bleaching [27]. Synchronous nematodes were raised in liquid culture using NGM liquid and packed *E. coli* OP50 according to Stiernagle [28]. Carbenicillin was added to the NGM liquid in order to inactivate *E. coli*. A volume of 46  $\mu$ L of NGM liquid was dispensed in each well of a 96-well microplate, to which 10  $\mu$ L M9 buffer containing ten synchronized L1 larvae were added. L1 larvae were maintained shaking at 20°C and reached the adult stage within 3 days. Nematodes were treated with effectors at the young adult stage for 48 h.

### 2.2 Glucose and quercetin treatment

A 1 M glucose solution was prepared in M9 buffer. This was diluted with M9 buffer for a 100 mM working solution. A 10 mM quercetin stock solution was prepared in ethanol/Tween<sup>®</sup>20 (92/8 v/v). This was diluted with ethanol/M9 buffer yielding a 10  $\mu$ M working solution containing 10% ethanol.

When nematodes had reached the young adult stage, 7  $\mu$ L of glucose working solution (or control solution) and 7  $\mu$ L of quercetin working solution (or control solution) were added to the media. After 48 h incubation, worms were prepared for measurement. We used a quercetin concentration of 1  $\mu$ M in all experiments, which proved as potent in preventing glucose toxicity as higher concentrations upto 100  $\mu$ M.

### 2.3 Generation of *mev-1(kn1)*, *daf-16::gfp(zls356)* double mutants

To obtain *mev-1(kn1)*, *daf-16::gfp(zls356)* double mutants, *mev-1(kn1)* hermaphrodites were first crossed with N2 wild-type males and heterozygous F1 males were then mated with *daf-16::gfp(zls356)* hermaphrodites using standard crossing protocol. In the F2 generation of the second cross, we screened for double mutants that express DAF-16-GFP fusion protein and carry the *mev-1(kn1)* allele. The missense



mutation of the *mev-1(kn1)* allele that created a restriction fragment-length polymorphism [29] was identified by single-worm PCR using the primer pair *mev-1-fw-5'* CCA ACT GCG ATT CTG TGC C-3' and *mev-1-rev-5'* CCT GTC CAA CAT TAT TGA CTC CC-3' followed by *Bsp13I* restriction analyses.

## 2.4 RNAi experiments

RNAi experiments were performed in liquid cultures [30,31]. In brief, expression of gene-specific dsRNA in the corresponding RNAi-feeding strain was induced with 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside for 4 h at 37°C. Subsequently, bacterial cells were washed and resuspended in NGM liquid, to which 40  $\mu$ g/mL kanamycin were added to inactivate *E. coli* HT115. A volume of 46  $\mu$ L of this suspension was dispensed into each well of a 96-well plate (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany), to which ten synchronized L1 larvae were added. In general, L1 larvae reached the adult stage within 3 days of incubation with agitation at 20°C. Nematodes were treated with effectors at the young adult stage for 48 h. In case of *ubq-1* and *uba-1* RNAi, nematodes were raised on negative control RNAi until they reached the young adult stage, in order to circumvent developmental delays caused by RNAi. Subsequently, the NGM liquid with control RNAi bacteria was replaced by *ubq-1* or *uba-1* RNAi bacteria.

## 2.5 Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from 10 000 worms using Trizol. One-step real-time PCR reactions were performed in triplicate using 1  $\mu$ L of RNA template (10 ng/ $\mu$ L), Brilliant II SYBR Green QRT-PCR Mastermix and appropriate primers in a CFX™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, München, Germany). Cycling conditions were 1  $\times$  (15 min 50°C), 1  $\times$  (10 min 95°C), 40  $\times$  (30 s 95°C, 15 s 52°C, 30 s 60°C), 1  $\times$  (1 min 95°C), 1  $\times$  (30 s 52–95°C). Changes in target gene expression were calculated according to Pfaffl [32] using equation  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . For each sample, the fold change in the target gene was normalized to 18S rRNA and relative to the control expression. Primers used for qPCR are given in Supporting Information Table 1.

Relative mRNA levels in nematodes cultured on RNAi bacteria were significantly lower ( $p < 0.01$ ) than mRNA levels of the control that was fed L4440, and were below 0.25 for all genes tested.

## 2.6 Western blot

For detection of DAF-12, a mouse anti-DAF-12 polyclonal antibody at a 1:500 dilution was used and  $\beta$ -actin, as a loading control, was detected with a mouse anti-actin polyclonal antibody at 1:500. As secondary antibody, goat anti-mouse

IgG polyclonal at 1:1000 was used as horseradish peroxidase conjugate. Groups of 10 000 nematodes were treated with lysis buffer (sucrose 0.8 M, EDTA 1 mM, Tris-HCL 10 mM, PMSF 0.5 mM), twice freeze-thawed at  $-80^{\circ}\text{C}$  and room temperature, and subsequently sonicated on ice. Protein concentration of the lysate was determined by the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad). Lysates were separated on 8.5% SDS-polyacrylamide gels, and proteins were transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane for 1 h at 1.0 mA/cm<sup>2</sup> membrane area. The membrane was blocked in 15 mL of 1% milk in TRIS-buffered saline/0.05% Tween<sup>®</sup>20, and probed with antibodies diluted in blocking solution for 1 h. Following 2  $\times$  5 min washes with TBS-T, 2  $\times$  5 min TBS, and incubation in freshly prepared enhanced chemiluminescence solution (1 M TRIS pH 8.5, 90 mM p-Coumaric acid, 250 mM Luminol, 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 1 min, a radiographic film was exposed to detect the immunoreactive bands. Band intensities were quantified using ImageJ (NIH).

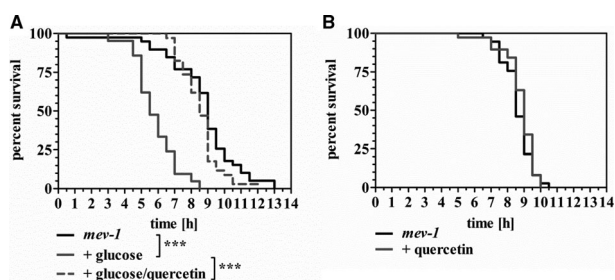
## 2.7 Fluorescence microscopy

Microscopic analyses of nematodes were performed with a PeqLab EVOS fl digital microscope for light and fluorescence microscopy. Detection of DAF-16::GFP localization in the constructed transgenic *mev-1* strain was scored microscopically using a band-pass filter set with excitations at 450–490 nm and emissions at 468–452 nm.

## 2.8 Survival analysis at 37°C

Lifespan analysis under heat-stress conditions (at 37°C) was performed 48 h after the addition of glucose as previously described [33]. In brief, nematodes were washed off the wells with M9 buffer into 15 mL tubes followed by additional three washing steps with M9 buffer. In each well of a black 384-well low-volume microtiter plate (Greiner Bio-One), 6.5  $\mu$ L M9 buffer/Tween<sup>®</sup>20 (1% v/v) solution were added. Subsequently, one nematode was dispensed in 1  $\mu$ L M9 buffer into each well and mixed with 7.5  $\mu$ L SYTOX green (final concentration 1  $\mu$ M in M9 buffer/Tween<sup>®</sup>20; Life Technologies, Karlsruhe, Germany). To prevent water evaporation, the plates were sealed with Rotilab sealing film and covered with a lid (Greiner Bio-One). Heat shock (37°C) was induced and fluorescence was measured with a Fluoroskan Ascent microtiter plate reader (Thermo Labsystems, Bonn, Germany) every 30 min for a period of 16 h. To detect SYTOX green fluorescence, excitation wavelength was set to 485 nm and emission was measured at 538 nm.

To determine the survival time for each nematode, an individual fluorescence curve was generated. Time of death was defined as 1 h after an increase in fluorescence over the baseline level was observed and was verified by touch provocation first. From the individual times of death, Kaplan–Meier survival curves were drawn.



**Figure 1.** Quercetin protects from glucose-induced reduction of survival in *C. elegans* TK22 (*mev-1*). Young adult *mev-1* nematodes were exposed to medium alone or medium either supplemented with 10 mM glucose alone or in addition with 1  $\mu$ M quercetin for 48 h before survival of *mev-1* was measured at 37°C. A representative experiment of three is shown. Number of worms in the presented experiment: control 59, 10 mM glucose 49, 10 mM glucose/1  $\mu$ M quercetin 54 (A). Survival in the absence of glucose, as measured by SYTOX green nucleic acid stain as described in section 2, is unaffected by 1  $\mu$ M quercetin alone. A representative experiment out of three is shown. Number of worms: control 47, 1  $\mu$ M quercetin 58 (B).

## 2.9 Proteasomal activity

For protein extraction, nematodes were treated with lysis buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT) and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . After homogenization with Pq-lab Precellys 24-Dual, the concentration of solubilized proteins was determined by the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad). Quantification of specific proteasome activity was done by a fluorogenic peptide substrate assay as described [34]. In brief, the solubilized proteins were incubated with succinyl-leucyl-leucyl-valine-tyrosine-aminomethyl-coumarine (final concentration 140  $\mu$ M; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) in proteasome activity assay buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 5 mM ATP) at room temperature. The fluorescence intensity was measured in triplicate over 3 h every 10 min with excitations at 355 nm and emissions at 460 nm, using a Fluoroskan Ascent microtiter plate reader (Thermo Labsystems). To determine the specific proteasome activity, differences of activities measured in the presence of proteasome inhibitor MG132 (final concentration 10  $\mu$ M; Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany) were subtracted from activities due to overall fluorogenic peptide cleavage.

## 2.10 Calculations and statistics

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Log rank test was performed to compare survival rates with  $p$  values  $< 0.05$  being significant. Kaplan–Meier survival curves are shown for lifespan experiments. For group comparisons,  $t$ -test or analysis of variance was performed. Following analysis of variance, differences between groups were determined by

Bonferroni–Holm multiple comparison test. Results are presented as means  $\pm$  SD.

## 3 Results

### 3.1 Quercetin prolongs the lifespan of glucose-treated *mev-1* nematodes at 37°C

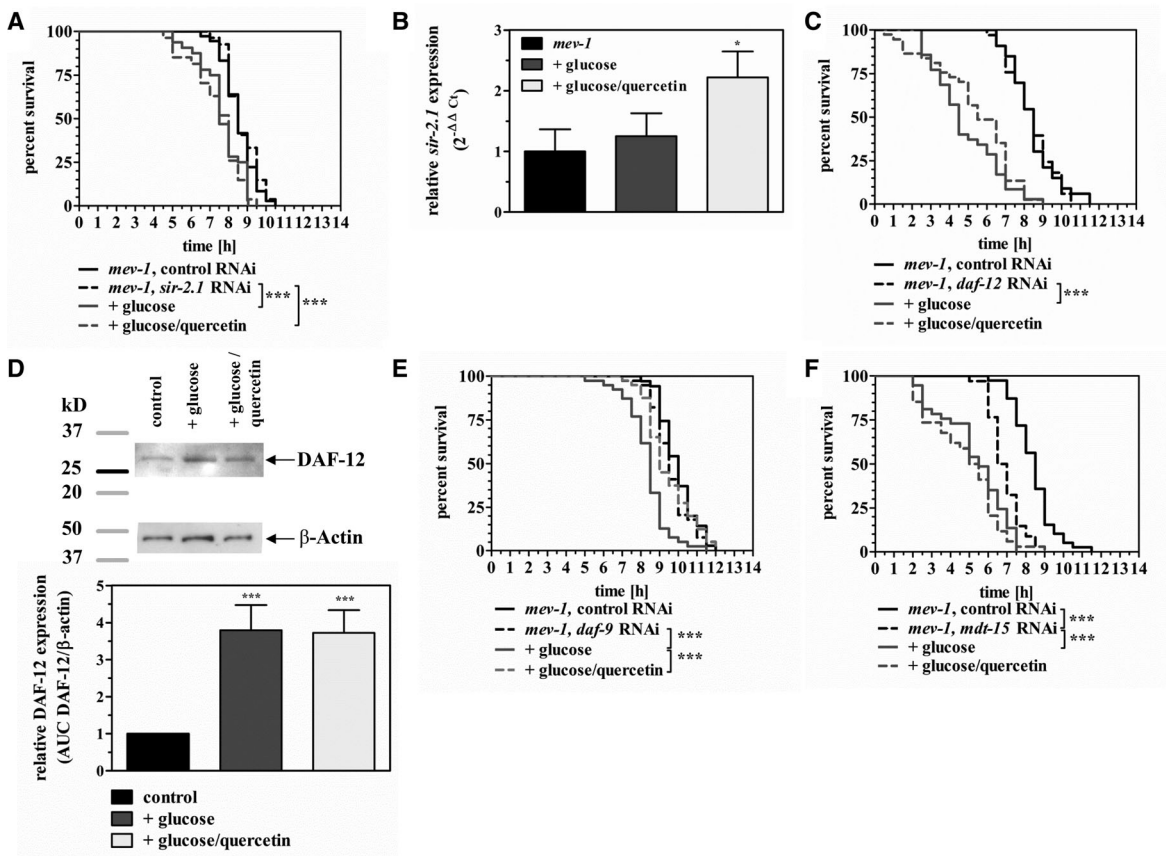
We have previously shown that glucose feeding decreases the survival of *mev-1* nematodes under heat-stress at 37°C [27]. Here, we demonstrate that the polyphenol quercetin at a concentration of only 1  $\mu$ M was able to rescue the lifespan reduction induced by 10 mM glucose completely (Fig. 1A). Those effects were clearly dependent on the presence of glucose, since quercetin did not affect lifespan in the absence of the sugar (Fig. 1B).

### 3.2 Prolongation of survival under glucose exposure by quercetin is dependent on SIR-2.1, DAF-12, and MDT-15

Based on the fact that quercetin is a sirtuin-activating compound, we next examined the role of the SIRT1 homologue SIR-2.1 in order to enable quercetin-mediated lifespan extension in the presence of glucose. SIR-2.1 proved to be essentially necessary for the quercetin effects (Fig. 2A). RNAi for any of the four sirtuins in *C. elegans* displayed no significant influence on lifespan in the absence of glucose and knock-down of *sir-2.2*, *sir-2.3*, or *sir-2.4* did not block the lifespan rescuing activity of quercetin (data not shown). At the mRNA level, quercetin was found to stimulate *sir-2.1* expression in the presence of glucose (Fig. 2B). Besides *sir-2.1*, the *daf-12* gene encoding a nuclear hormone receptor was identified as crucial to enable quercetin the recovery of a normal lifespan under glucose exposure (Fig. 2C). At the protein level, quercetin did not increase DAF-12 expression over levels observed in the presence of glucose alone (Fig. 2D), suggesting that its activation by the polyphenol is not due to enhanced protein synthesis. Since *daf-9*, encoding a cytochrome P<sub>450</sub> dependent enzyme that generates cholesterol-derived steroid-like ligands, termed dafachronic acids, for DAF-12 has no influence on the activities of quercetin (Fig. 2E), it can be suggested that DAF-12 affects survival in its ligand-free form. RNAi of a putative co-activator of DAF-12, the *C. elegans* mediator subunit MDT-15, likewise to *daf-12* RNAi prevented an increased survival by quercetin in the presence of glucose (Fig. 2F).

### 3.3 Quercetin does not target a number of other stress-activated pathways

In order to evaluate whether other known pathways for stress resistance play a role for the prevention of glucose toxicity



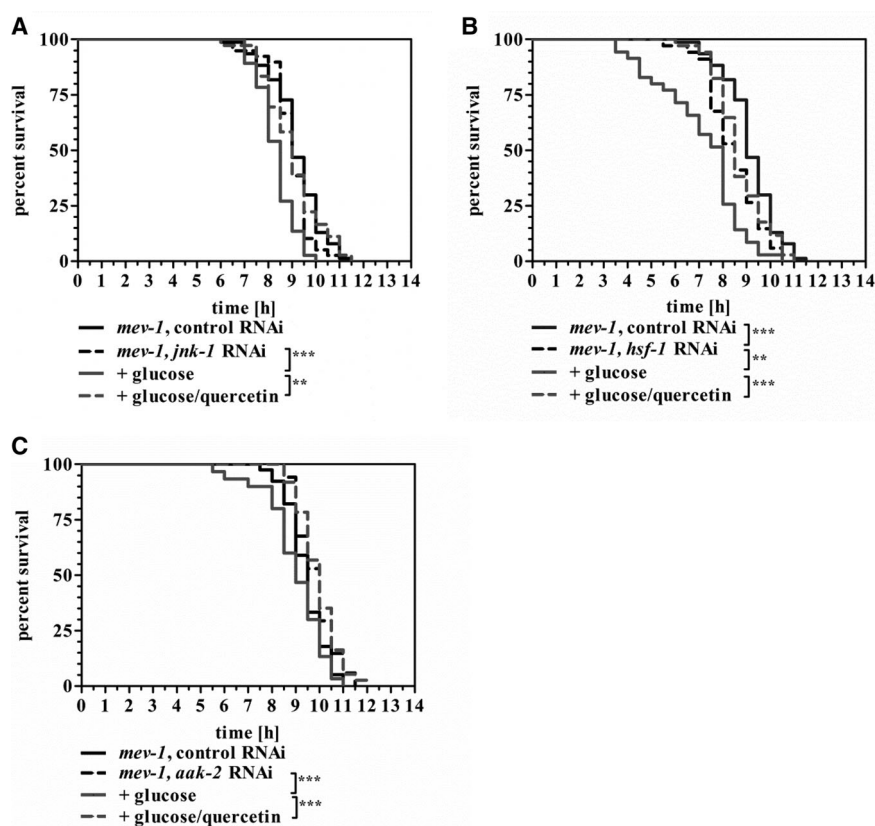
**Figure 2.** Protection from glucose-induced lifespan reduction by quercetin requires *sir-2.1*, *daf-12*, and *mdt-15*. RNAi for *sir-2.1* completely prevented the rescue exerted by 1  $\mu$ M quercetin in *mev-1* nematodes treated with 10 mM glucose ( $n = 3$ , number of worms: control RNAi 56, *sir-2.1* RNAi 57, *sir-2.1* RNAi + 10 mM glucose 52, *sir-2.1* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 49) (A). Quercetin at the same concentration increased the *sir-2.1* transcript levels in the presence of glucose (B);  $*p < 0.05$  versus the control. Under *daf-12* RNAi exposure ( $n = 4$ , 55 nematodes versus 52 nematode in the control), 10 mM glucose drastically reduced the survival (51 nematodes). One micromolar quercetin was not able to rescue this reduction (58 nematodes) (C). Western blotting results revealed that DAF-12 expression at the protein level is increased after treatment of *mev-1* with 10 mM glucose, which is not further affected by the addition of 1  $\mu$ M quercetin.  $\beta$ -actin was detected as a loading control for the normalization of band intensities between the different treatments. Quantification of three independent Western blots was carried out using ImageJ (NIH) software;  $***p < 0.001$  versus control (D). RNAi for *daf-9* did not prevent the lifespan rescue by quercetin in glucose-treated nematodes ( $n = 3$ , number of nematodes: control RNAi 48, *daf-9* RNAi 54, *daf-9* RNAi + 10 mM glucose 51, *daf-9* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 60) (E), whereas RNAi for *mdt-15* prevented survival-rescuing activities of quercetin in the presence of glucose ( $n = 3$ , number of nematodes: control RNAi 48, *mdt-15* RNAi 44, *mdt-15* RNAi + 10 mM glucose 49, *mdt-15* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 54) (F).

by quercetin, corresponding key proteins were silenced by RNAi. Knockdown of *jnk-1*, encoding the stress-activated protein kinase JUN, and of *hsf-1*, encoding a central heat shock factor, both did not prevent the quercetin-induced, complete recovery of lifespan to control levels under glucose exposure (Fig. 3A and B). Also RNAi for *aak-2*, encoding the AMP-activated protein kinase was without influence on the extension of survival by quercetin in glucose exposed *mev-1* nematodes (Fig. 3C). In the absence of insulin/IGF-1 signaling the forkhead transcription factor DAF-16 in wild-type nematodes is translocated to the nucleus activating the transcription of genes whose products are involved in mediating stress resistance. It is shown here, that DAF-16 in *mev-1* nematodes is localized exclusively in the nucleus of *mev-1*, independent of

the presence of glucose or quercetin (Fig. 4A), suggesting an intrinsic response to the stress caused by enhanced endogenous ROS generation. However, the transcriptional activity of DAF-16 appears to be dispensable for the effects of quercetin, as evidenced by the lifespan prolongation caused by quercetin in the presence of *daf-16* RNAi (Fig. 4B).

### 3.4 The extension of survival by quercetin is dependent on UPR<sup>mt</sup> and UPR<sup>ER</sup>

Since our previous studies have shown that glucose impairs UPR<sup>mt</sup> and UPR<sup>ER</sup> as parts of the proteostasis network, we investigated the necessity of key components for the lifespan



**Figure 3.** Stress-resistance pathways not used by quercetin to increase the life span of glucose-treated *mev-1* mutants. Knockdown of *jnk-1*, ( $n = 4$ , number of nematodes: control RNAi 59, *jnk-1* RNAi 54, *jnk-1* RNAi + 10 mM glucose 47, *jnk-1* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 56) (A), *hsf-1*, (control RNAi 59, *hsf-1* RNAi 54, *hsf-1* RNAi + 10 mM glucose 55, *hsf-1* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 54) (B), or *aak-2* (control RNAi 59, *aak-2* RNAi 56, *aak-2* RNAi + 10 mM glucose 59, *aak-2* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 57) (C) did not affect the lifespan extension caused by 1  $\mu$ M quercetin in nematodes treated with 10 mM glucose.

extending effects of quercetin in the presence of glucose at 37°C. It was found that knockdown of key factors for UPR<sup>mt</sup>, such as *hsp-6*, *hsp-60*, *dve-1*, *ubl-5*, and *atfs-1* all completely prevented a prolongation of survival at 37°C (Fig. 5A–E). *Hsp-6* and *hsp-60* encode mitochondria-specific chaperones that are members of the HSP70 and HSP40 superfamilies of molecular chaperones, whereas DVE-1 binds to *hsp-6* and *hsp-60* promoters upon mitochondrial stress and UBL-5 is suggested to permit the interactions of DVE-1 with *cis*-elements of the DNA. Finally, ATFS-1 is a protein that translocates to the nucleus during mitochondrial stress to activate a protective transcriptional response and to release the suppression of UPR<sup>mt</sup>.

Likewise to the effects caused by RNAi for factors of UPR<sup>mt</sup>, the knockdown of proteins with relevance for UPR<sup>ER</sup> such as XBP-1 (Fig. 6A), which controls a signaling pathway to prevent ER stress, or of genes activated in blocked UPR (abu) (Fig. 6B and C) excluded quercetin from exerting a survival-enhancing activity in the presence of glucose.

### 3.5 Activation of the proteasome is crucial for the lifespan extension by quercetin

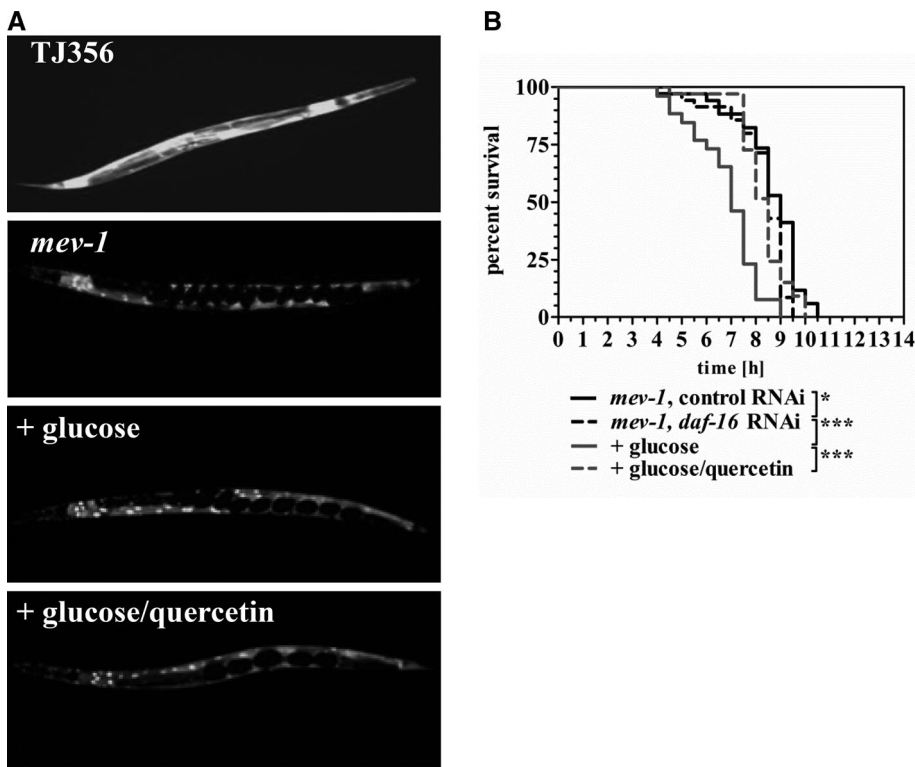
Besides the correct folding of proteins, their degradation determines the maintenance of proteostasis and thus normal cellular functions and viability. Reducing the expression of

*ubq-1*, which encodes the *C. elegans* ubiquitin, and of *uba-1*, which encodes the ubiquitin-activating enzyme, both prevented the rescuing effect of quercetin with regard to life span (Fig. 7A and B). Estimations of the proteasome activity in the presence of glucose revealed that quercetin caused a significant activation of proteasomal degradation which was completely prevented by the knockdown of *sir-2.1* (Fig. 7C). Additionally, inhibiting proteasomal degradation by use of the specific proteasome inhibitor MG132 (200  $\mu$ M) completely blocked the rescuing effect of quercetin with respect to survival (Fig. 7D).

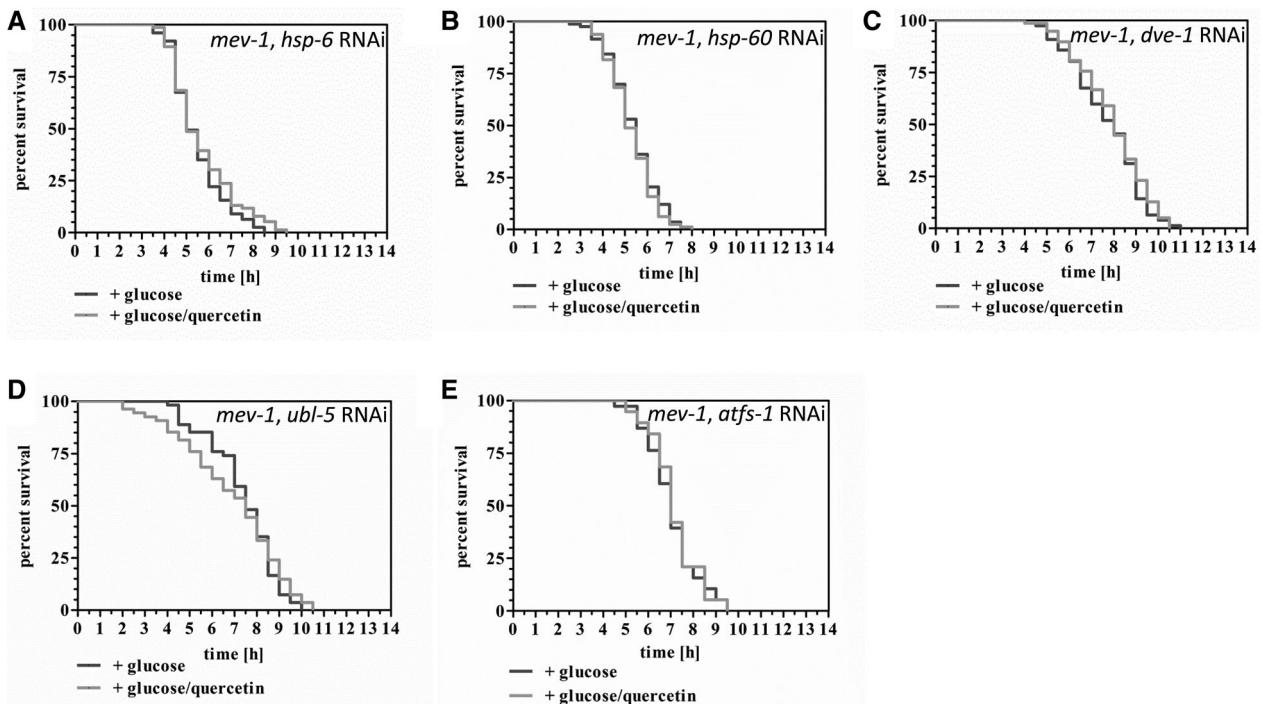
## 4 Discussion

Enhanced plasma glucose concentrations are known to trigger biochemical reactions that are associated with diabetic complications and premature death in humans but which are also discussed to play a role in the physiological ageing process [35, 36]. Among those glucose-driven reactions are the generation of ROS, AGEs, sorbitol, diacylglycerol, or UDP-*N*-acetyl-glucosamine, accumulating especially in cells with unrestricted glucose uptake [37]. A unifying hypothesis has been proposed whereby mitochondrial overproduction of ROS in response to chronic hyperglycemia may be the key initiator for each of these pathogenic pathways [38, 39].

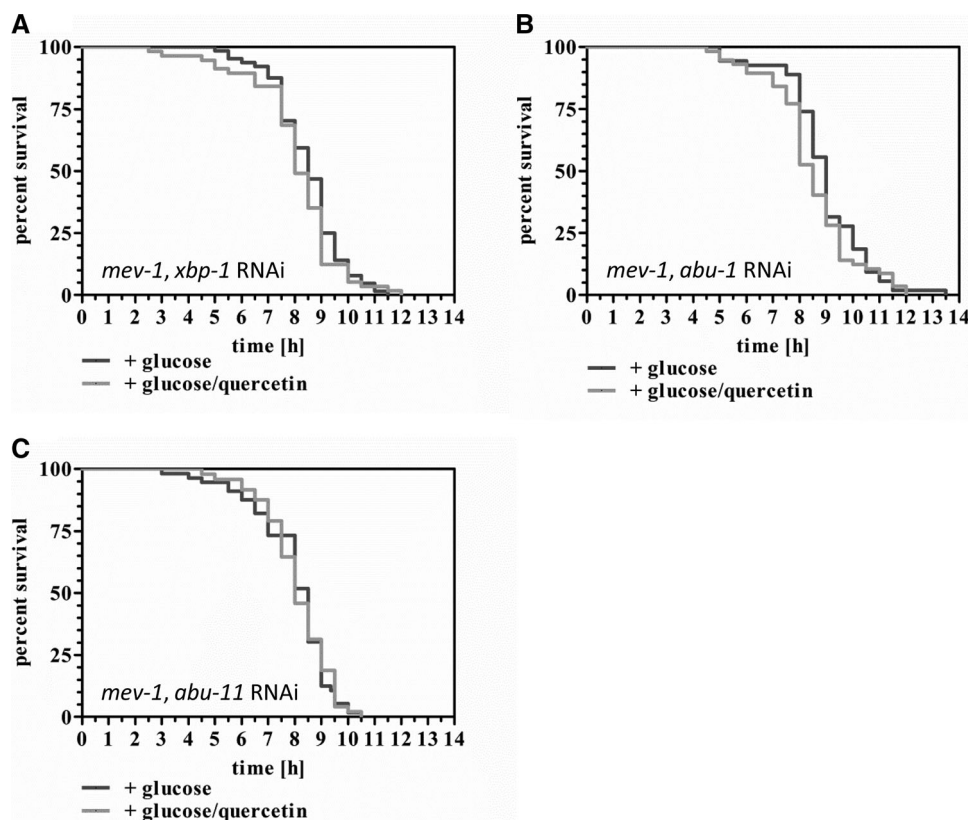




**Figure 4.** The survival-increasing effects of quercetin are independent of DAF-16. Localization of DAF-16 was assessed by use of a constructed *mev-1* strain expressing the DAF-16::GFP transgene zIS356. In nematodes treated with medium alone, or with 10 mM glucose, or with 10 mM glucose plus 1  $\mu$ M quercetin, DAF-16::GFP was found to be localized exclusively in the nuclei, in clear contrast when the same transgene was expressed in wild-type nematodes (TJ356) (A). After *daf-16* RNAi in *mev-1* quercetin was still able to rescue the lifespan shortening effect of glucose ( $n = 4$ , number of nematodes: control RNAi 54, *daf-16* RNAi 55, *daf-16* RNAi + 10 mM glucose 46, *daf-16* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 53) (B).



**Figure 5.** RNAi for key proteins of UPR<sup>mt</sup> prevents the lifespan extension caused by quercetin in the presence of glucose. Nematodes were exposed to 10 mM glucose in the absence or presence of 1  $\mu$ M quercetin for 48 h before survival was recorded at 37°C after *mev-1* nematodes were subjected to the following RNAi: *hsp-6* ( $n = 4$ , number of nematodes: *hsp-6* RNAi + 10 mM glucose 77, *hsp-6* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 76) (A), *hsp-60* (*hsp-60* RNAi + 10 mM glucose 83, *hsp-60* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 82) (B), *dve-1* (*dve-1* RNAi + 10 mM glucose 77, *dve-1* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 78) (C), *ubl-5* (*ubl-5* RNAi + 10 mM glucose 54, *ubl-5* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 54) (D), or *atfs-1* (*atfs-1* RNAi + 10 mM glucose 58, *atfs-1* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 58) (E).



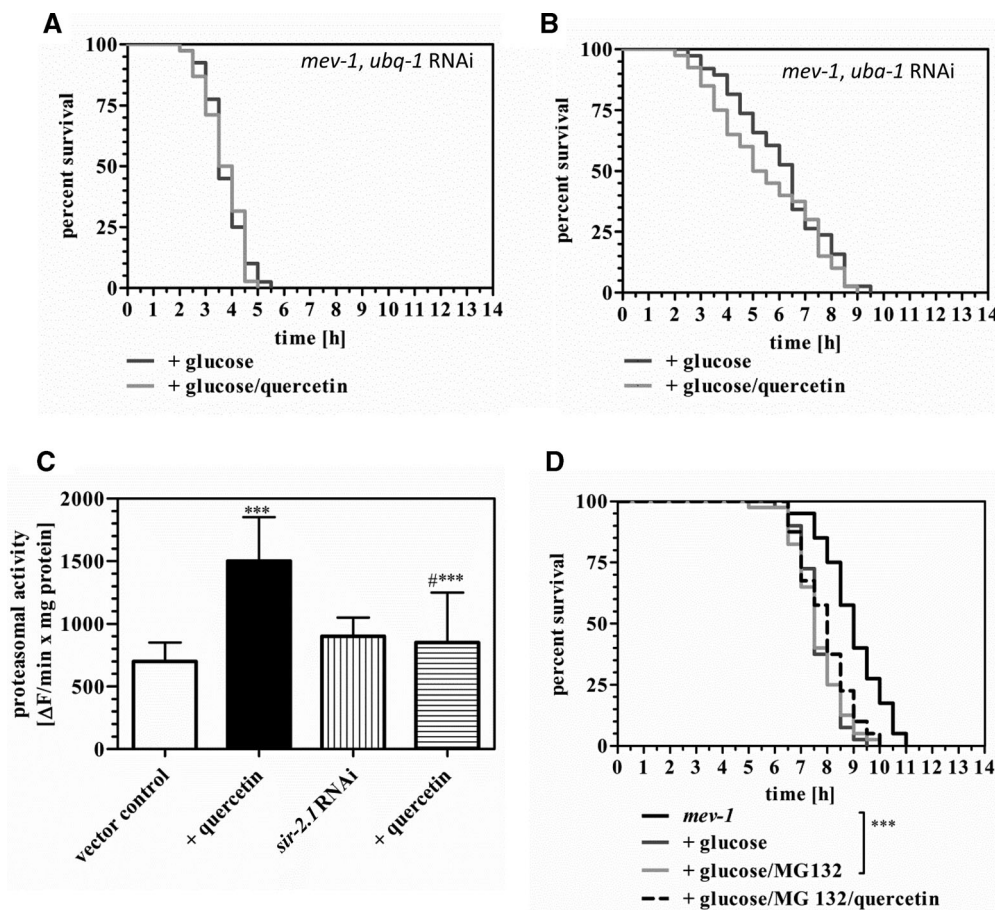
**Figure 6.** UPR<sup>ER</sup> is a target of glucose and quercetin. Quercetin (1  $\mu$ M) is not able to increase the survival time under knockdown of either *xbp-1* ( $n = 3$ , number of nematodes: *xbp-1* RNAi + 10 mM glucose 58, *xbp-1* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 57) (A), *abu-1* ( $n = 3$ , *abu-1* RNAi + 10 mM glucose 58, *abu-1* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 57) (B), or *abu-11* ( $n = 4$ , *abu-11* RNAi + 10 mM glucose 58, *abu-11* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu$ M quercetin 48) (C).

This postulate emphasizes the importance of mitochondrial dysfunction in the progression and development of diabetic complications but maybe also in the ageing process.

In a recent study we found that feeding 10 mM glucose to the *C. elegans* mutant *mev-1* indeed leads to functional impairments and further enhanced ROS generation in mitochondria [27]. Moreover, the application of glucose led to reduced lifespan at 37°C as also shown in the present study. The application of glucose, and also of quercetin in the present study, in a liquid medium provides a very efficient uptake of dissolved compounds through pharyngeal pumping of the nematodes [40] thus making the model beneficial for nutrition research. It was found previously, that scavenging of ROS did not affect the lifespan reduction caused by glucose [27]. Likewise to the role of ROS, even AGEs have been challenged regarding their contribution to glucose-induced degenerations [27, 41] or ageing [42]. Instead impairment of the protein quality control was suggested to possibly play a more important role in diabetic complications and ageing and thus appears as a promising target to prevent ageing phenomena by clearing cellular damage [41–43]. As a matter of fact, knocking down key proteins involved in UPR<sup>mt</sup> or UPR<sup>ER</sup> reduced the survival of *mev-1* nematodes and prevented a further lifespan reduction by glucose, suggesting that glucose acts on lifespan through inhibition of UPR [27].

In order to prevent glucose-induced acceleration of ageing processes, it might be reasonable to activate biochemical

pathways that are triggered by caloric restriction, since this kind of intervention has been generally recognized to slow the ageing process from simple organisms to primates [9]. As important mediators of this lifespan extension, sirtuins were identified [17, 18] and also in *C. elegans*, *sir-2.1*, the homologue of mammalian SIRT1, was shown to increase lifespan when overexpressed [44], although the robustness of those effects in *C. elegans* were questioned by others [45]. Sirtuins can be effectively activated by a number of secondary plant compounds [46] and many studies have demonstrated that hormetic effects of such compounds depend on *sir-2.1* [47, 48]. Also in the present study, the observed increased survival of *mev-1* nematodes caused by 1  $\mu$ M quercetin in the presence of 10 mM glucose was strictly dependent on *sir-2.1*. Many of the hormetic effects of SIR-2.1 need the cooperation with the forkhead transcription factor DAF-16. Both enabling nuclear localization and acting as a transcriptional co-activator [49] were shown as mechanisms underlying such a concerted action of SIR-2.1 and DAF-16. Using a transgenic DAF-16::GFP expressing strain, it was demonstrated here that DAF-16 remains completely localized in the nucleus of *mev-1*, even in the presence of glucose. This demonstrates first of all that even under insulin/IGF-1 signaling, DAF-16 is not effectively phosphorylated in order to promote a cytosolic re-localization in *mev-1* and secondly that the dependence of quercetin on SIR-2.1 does not rely on DAF-16 translocation from cytosol to nucleus. Nevertheless, it could have been possible that



**Figure 7.** Quercetin activates the proteasome. Effects of 10 mM glucose alone or plus 1  $\mu\text{M}$  quercetin on lifespan were determined in *mev-1* nematodes treated with RNAi bacteria in order to reduce the expression of *ubq-1* ( $n = 3$ , *ubq-1* RNAi + 10 mM glucose 50, *ubq-1* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu\text{M}$  quercetin 48) (A), or *uba-1* (*uba-1* RNAi + 10 mM glucose 48, *uba-1* RNAi + 10 mM glucose + 1  $\mu\text{M}$  quercetin 50) (B). Activity of the proteasome as influenced by 1  $\mu\text{M}$  quercetin was estimated in nematodes fed on either HT115 vector control or *sir-2.1* dsRNA-producing bacteria, all in the presence of 10 mM glucose (C). Cleavage of the fluorogenic peptide succinyl-leucyl-leucyl-valine-tyrosine-aminomethyl-coumarin served as an indicator of proteasomal activity after values obtained in the presence of the specific proteasome inhibitor MG123 at 10  $\mu\text{M}$  had been subtracted from total slopes. \*\*\* $p < 0.001$  versus the vector control, #### $p < 0.001$  versus quercetin effects in the vector control. Moreover, application of 200  $\mu\text{M}$  MG123 prevented the survival rescue of quercetin under glucose exposure ( $n = 3$ , control 40, 10 mM glucose 40, 10 mM glucose + 200  $\mu\text{M}$  MG123 40, 10 mM glucose + 200  $\mu\text{M}$  MG123 + 1  $\mu\text{M}$  quercetin 40) (D). \*\*\* $p < 0.001$  versus the control.

quercetin requires DAF-16 for a co-transcriptional activity in order to promote its SIR-2.1-dependent effects on survival. However, applying *daf-16* RNAi revealed the dispensability of the transcription factor for the effects of quercetin on survival in *mev-1*, similar to results described for the polyphenol resveratrol in wild-type animals [50]. Besides DAF-16 also HSF-1 was neither a target of glucose nor did its absence prevent the survival increase by quercetin in *mev-1*. Interestingly, the down-regulation of both factors was identified to mediate the reductions of lifespan by glucose in wild-type animals [51]. That the different results are due to the different genetic background can be excluded, however, since we observed lifespan reductions by 10 mM glucose also in *daf-16* or *hsf-1* mutant strains with an otherwise genetic wild-type background (not shown). It therefore appears more plausi-

ble that the discrepancies are due to a more efficient uptake of glucose in liquid media [27] which restricts survival more efficiently.

Besides DAF-16, the nuclear hormone receptor DAF-12 has been recognized to affect longevity and survival and was identified to be crucial for the survival-enhancing properties of quercetin in the present study. The shortened lifespan of a DAF-12 loss-of-function mutant has been attributed to accelerated ageing in young adulthood [52] but DAF-12 proved also necessary for gonadal longevity [53]. The role of DAF-12 for stress resistance and longevity is massively influenced by its endogenous ligands, the dafachronic acids. These are 3-keto bile acid-like steroids produced from cholesterol under assistance of DAF-9, a cytochrome P<sub>450</sub> with activity similar to mammalian CYP27A1 [54]. Dafachronic acids are able to



regulate *C. elegans* lifespan according to signaling state quite differently, shortening the lifespan of long-lived *daf-9* mutants and abolishing their stress resistance, whereas they extend the lifespan of germ-line ablated *daf-9* mutants [55]. In the present study, DAF-9 was without influence on quercetin-induced extension of lifespan under glucose exposure. Instead, MDT-15, a subunit of the *C. elegans* mediator complex, was identified to mediate the quercetin effects also. Given the identification of MDT-15 as an interacting protein and transcriptional co-activator of the nuclear hormone receptor NHR-49 [56], and that both NHR-49 and DAF-12 possess biological activities similar to peroxisomal proliferator activated receptors [57, 58], it appears plausible that MDT-15 acts as a co-activator of DAF-12 also.

Finally, the activation of SIR-2.1, DAF-12, and MDT-15 is suggested to prevent glucose-induced impairments of the protein quality control, i.e. UPR<sup>mt</sup> and UPR<sup>ER</sup>, and of proteasomal degradation, since the knockdown of key factors involved in these parts of proteostasis diminished the life span prolonging activities of quercetin completely. The fact that knockdown of *sir-2.1* not only prevents the ability of quercetin to rescue the survival under glucose exposure but also the activation of the proteasome under identical conditions, provokes a model where upstream targets such as SIR-2.1, DAF-12, and MDT-15 trigger UPR and proteasomal degradation to provide the perfect equilibrium of functionally active proteins that are finally crucial for the survival of the cells that constitute an organism.

*The authors have declared no conflict of interest.*

## 5 References

- Monnier, L., Colette, C., Owens, D., The glycaemic triumvirate and diabetic complications: is the whole greater than the sum of its component parts? *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2012, **95**, 303–311.
- Preuss, H. G., Effects of glucose/insulin perturbations on aging and chronic disorders of aging: the evidence. *J. Am. Coll. Nutr.* 1997, **16**, 397–403.
- Beal, M. F., Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2002, **32**, 797–803.
- Chevion, M., Berenshtein, E., Stadtman, E. R., Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic. Res.* 2000, **33**, S99–S108.
- Semba, R. D., Nicklett, E. J., Ferrucci, L., Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2010, **65**, 963–975.
- Puddu, A., Viviani, G. L., Advanced glycation endproducts and diabetes. Beyond vascular complications. *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug. Targets* 2011, **11**, 132–140.
- Hebert, S. L., Lanza, I. R., Nair, K. S., Mitochondrial DNA alterations and reduced mitochondrial function in aging. *Mech. Ageing. Dev.* 2010, **131**, 451–462.
- Newsholme, P., Gaudel, C., Krause, M., Mitochondria and diabetes. An intriguing pathogenetic role. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012, **942**, 235–247.
- Fontana, L., Partridge, L., Longo, V. D., Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science* 2010, **328**, 321–326.
- Zheng, Y., Zhang, W., Pendleton, E., Leng, S. et al., Improved insulin sensitivity by calorie restriction is associated with reduction of ERK and p70S6K activities in the liver of obese Zucker rats. *J. Endocrinol. Dev.* 2009, **203**, 337–347.
- Sohal, R. S., Ku, H. H., Agarwal, S., Forster, M. J. et al., Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* 1994, **74**, 121–133.
- Gugliucci, A., Kotani, K., Taing, J., Matsuoka, Y. et al., Short-term low calorie diet intervention reduces serum advanced glycation end products in healthy overweight or obese adults. *Ann. Nutr. Metab. Dev.* 2009, **54**, 197–201.
- Dasuri, K., Zhang, L., Ebenezer, P., Liu, Y. et al., Aging and dietary restriction alter proteasome biogenesis and composition in the brain and liver. *Mech. Ageing Dev.* 2009, **130**, 777–783.
- Gestwicki, J. E., Garza, D., Protein quality control in neurodegenerative disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2012, **107**, 327–353.
- Bar-Lavan, Y., Kosolapov, L., Frumkin, A., Ben-Zvi, A., Regulation of cellular protein quality control networks in a multicellular organism. *FEBS J.* 2012, **279**, 526–531.
- Ben-Gedalya, T., Cohen, E., Quality control compartments coming of age. *Traffic* 2012, **13**, 635–642.
- Chen, D., Guarente, L., SIR2: a potential target for calorie restriction mimetics. *Trends Mol. Med.* 2012, **13**, 64–71.
- Corbi, G., Conti, V., Scapagnini, G., Filippelli, A. et al., Role of sirtuins, calorie restriction and physical activity in aging. *Front. Biosci.* 2012, **4**, 768–778.
- Wood, J. G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K. et al., Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 2004, **430**, 686–689.
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A. et al., Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006, **444**, 337–342.
- Agarwal, B., Baur, J. A., Resveratrol and life extension. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011, **1215**, 138–143.
- Pietrocola, F., Mariño, G., Lissa, D., Vacchelli, E. et al., Proautophagic polyphenols reduce the acetylation of cytoplasmic proteins. *Cell Cycle* 2012, **11**, 3851–3860.
- Kampkötter, A., Timpel, C., Zurawski, R. F., Ruhl, S. et al., Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2008, **149**, 314–323.
- Ishii, N., Takahashi, K., Tomita, S., Keino, T. et al., A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mutat. Res.* 1990, **237**, 165–171.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. et al., Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, **81**, 230S–242S.



- [26] Brenner, S., The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics. Dev.* 1974, 77, 71–94.
- [27] Fitzenberger, E., Boll, M., Wenzel, U., Impairment of the proteasome is crucial for glucose-induced lifespan reduction in the mev-1 mutant of *Caenorhabditis elegans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013, 1832, 565–573.
- [28] Stiernagle, T., in: Hope, I. (Ed.), *C. elegans: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford 1999, pp. 51–67.
- [29] Ishii, N., Fujii, M., Hartman, P. S., Tsuda, M. et al., A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* 1998, 394, 694–697.
- [30] Lehner, B., Tischler, J., Fraser, A. G., RNAi screens in *Caenorhabditis elegans* in a 96-well liquid format and their application to the systematic identification of genetic interactions. *Nat. Protocols* 2006, 1, 1617–1620.
- [31] Timmons, L., Court, D., Fire, A., Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 2001, 263, 103–112.
- [32] Pfaffl, M. W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001, 92, 2002–2007.
- [33] Gill, M. S., Olsen, A., Sampayo, J. N., Lightgow, G. J., An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, 35, 558–565.
- [34] Pispas, J., Palmén, S., Holmberg, C., Jäntti, J., *C. elegans* dss-1 is functionally conserved and required for oogenesis and larval growth. *BMC Dev. Biol.* 2008, 8, 51.
- [35] Selman, C., Withers, D. J., Mammalian models of extended healthy lifespan. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2011, 366, 99–107.
- [36] Mooradian, A. D., Thurman, J. E., Glucotoxicity: potential mechanisms. *Clin. Geriatr. Med.* 1999, 15, 255.
- [37] Nishikawa, T., Kukidome, D., Sonoda, K., Fujisawa, K. et al., Impact of mitochondrial ROS production on diabetic vascular complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2007, 77, S41–S45.
- [38] Forbes, J. M., Coughlan, M. T., Cooper, M. E., Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 2008, 57, 1446–1454.
- [39] Senoo-Matsuda, N., Hartman, P. S., Akatsuka, A., Yoshimura, S. et al., A complex II defect affects mitochondrial structure, leading to ced-3- and ced-4-dependent apoptosis and aging. *J. Biol. Chem.* 2004, 278, 22031–22036.
- [40] Hartwig, K., Heidler, T., Moch, J., Daniel, H. et al., Feeding a ROS-generator to *Caenorhabditis elegans* leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormone. *Genes Nutr.* 2009, 4, 59–67.
- [41] Pfister, F., Riedl, E., Wang, Q., vom Hagen, F. et al., Oral carnitine supplementation prevents vascular damage in experimental diabetic retinopathy. *Cell. Physiol. Biochem.* 2011, 28, 125–136.
- [42] Morselli, E., Maiuri, M. C., Markaki, M., Megalou, E. et al., Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis.* 2010, 1, e10.
- [43] Madeo, F., Tavernarakis, N., Kroemer, G., Can autophagy promote longevity? *Nat. Cell Biol.* 2010, 12, 842–846.
- [44] Tissenbaum, H. A., Guarente, L., Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2001, 410, 227–230.
- [45] Burnett, C., Valentini, S., Cabreiro, F., Goss, M. et al., Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature* 2011, 477, 482–485.
- [46] Wood, J. G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K. et al., Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 2004, 430, 686–689.
- [47] Heidler, T., Hartwig, K., Daniel, H., Wenzel, U., *Caenorhabditis elegans* lifespan extension caused by treatment with an orally active ROS-generator is dependent on DAF-16 and SIR-2.1. *Biogerontology* 2010, 11, 183–195.
- [48] Pietsch, K., Saul, N., Chakrabarti, S., Stürzenbaum, S. R. et al., Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. *Biogerontology* 2011, 12, 329–347.
- [49] Berdichevsky, A., Viswanathan, M., Horvitz, H. R., Guarente, L., *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14–3–3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell* 2006, 125, 1165–1177.
- [50] Viswanathan, M., Kim, S. 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, 9, 605–615.
- [51] Lee, S. J., Murphy, C. T., Kenyon, C., Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell Metab.* 2009, 10, 379–391.
- [52] Fisher, A. L., Lithgow, G. J., The nuclear hormone receptor DAF-12 has opposing effects on *Caenorhabditis elegans* lifespan and regulates genes repressed in multiple long-lived worms. *Aging Cell* 2006, 5, 127–138.
- [53] Antebi, A., Regulation of longevity by the reproductive system. *Exp. Gerontol.* 2013, 48, 596–602.
- [54] Motola, D. L., Cummins, C. L., Rottiers, V., Sharma, K. K. et al., Identification of ligands for DAF-12 that govern dauer formation and reproduction in *C. elegans*. *Cell* 2006, 124, 1209–1223.
- [55] Gerisch, B., Rottiers, V., Li, D., Motola, D. L. et al., A bile acid-like steroid modulates *Caenorhabditis elegans* lifespan through nuclear receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 5014–5019.
- [56] Taubert, S., Van Gilst, M. R., Hansen, M., Yamamoto, K. R., A mediator subunit, MDT-15, integrates regulation of fatty acid metabolism by NHR-49-dependent and -independent pathways in *C. elegans*. *Genes. Dev.* 2006, 20, 1137–1149.
- [57] Van Gilst, M. R., Hadjivassiliou, H., Jolly, A., Yamamoto, K. R., Nuclear hormone receptor NHR-49 controls fat consumption and fatty acid composition in *C. elegans*. *PLoS Biol.* 2005, 3, e53.
- [58] Dowell, P., Otto, T. C., Adi, S., Lane, M. D., Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Foxo1 signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 45485–45491.

## **B.2 Publikation 2**

Fitzenberger E, **Deusing DJ**, Wittkop A, Kler A, Kriesl E, Bonnländer B, Wenzel U (2014) Effects of plant extracts on the reversal of glucose-induced impairment of stress-resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Plant Foods Hum Nutr* 69(1):78-84

# Effects of Plant Extracts on the Reversal of Glucose-Induced Impairment of Stress-Resistance in *Caenorhabditis elegans*

Elena Fitzenberger · Dorothé Jenni Deusing ·  
Anette Wittkop · Adolf Kler · Erwin Kriesl ·  
Bernd Bonnländer · Uwe Wenzel

Published online: 4 January 2014  
© Springer Science+Business Media New York 2014

**Abstract** Enhanced blood glucose levels are a hallmark of diabetes and are associated with diabetic complications and a reduction of lifespan. In order to search for plant extracts that display preventive activities in such a scenario, we tested 16 extracts used in human nutrition for their survival enhancing activities in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Nematodes were exposed for 48 h to 10 mM glucose in the absence or presence of 0.1 % extract. Thereafter, survival was measured at 37 °C. Extracts made from coffee, kola, rooibos and cinnamon, did not influence the glucose-induced reduction of survival. Those made from ginseng, camomile, lime blossom, paraguay tea, balm, rhodiola, black tea, or knotgrass all extended the lifespan of the glucose-treated nematodes significantly but did not rescue survival completely. Extracts from the leaves of blackberries, from hibiscus, elderberries, or jiaogulan completely countered the glucose-induced survival reduction. A potent activation of the proteasome was shown for the most preventive extracts suggesting a more efficient degradation of proteins impaired by glucose. In conclusion, we present a simple animal model to screen for plant extracts with potency to reverse glucose toxicity. Extracts from blackberry leaves, hibiscus, elderberries, and jiaogulan were identified as very potent in this regard whose exact mechanisms of action appear worthwhile to investigate at the molecular level.

**Keywords** Glucose-induced toxicity · Ageing · *Caenorhabditis elegans* · Proteasome

## Abbreviations

AA	Ascorbic acid
AGEs	Advanced glycation end products
ER	Endoplasmic reticulum
MG	Methylglyoxal
NGM	Nematode growth medium
Suc-LLVY-AMC	Succinyl-leucyl-leucyl-valine-aminomethyl-coumarine

## Introduction

Hyperglycaemia is a condition which is generally observed in diabetes mellitus and which is recognized as the major cause for the development of late onset complications [1]. Slight increases of blood glucose levels are also characteristic for ageing of healthy individuals and are due to a decrease in insulin-sensitivity [2]. Accordingly, it appears plausible to conclude that beyond providing energy for the cells and organisms, toxicity is derived from too much glucose which contributes to premature death in animals and humans [3].

Mechanistically, diverse actions of glucose were suggested to be responsible for detrimental effects. Those encompass the enhanced generation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) leading to increased protein oxidation [4], the formation of advanced glycation end products (AGEs) due to non-enzymatic reactions of glucose with proteins and nucleic acids that results in products with impaired function [5], and disturbances of mitochondrial functionality [6]. Our previous studies have demonstrated that especially the latter parameter seems to reduce the survival of the model organism *Caenorhabditis elegans* in the presence of enhanced glucose concentrations [7]. Moreover, it was shown there that

E. Fitzenberger · D. J. Deusing · A. Wittkop · U. Wenzel  
Molecular Nutrition Research, Interdisciplinary Research Center,  
Justus-Liebig-University of Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32,  
35392 Giessen, Germany

A. Kler · E. Kriesl · B. Bonnländer  
Plantextrakt GmbH & Co. KG, Dutendorfer Str. 5-7,  
91487 Vestenbergsgreuth, Germany

U. Wenzel (✉)  
Interdisciplinary Research Center, Justus-Liebig-University of  
Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany  
e-mail: uwe.wenzel@ernaehrung.uni-giessen.de

directing misfolded proteins to proteasomal degradation completely counteracts glucose toxicity [7].

Although a number of plant foods are suggested to possess preventive effects on diabetic complications [8], it remains unknown whether phytochemicals exert protective effects against glycotoxin-induced damage [9]. We aimed therefore at testing the potency of 16 water soluble plant extracts fed for 48 h in the presence of 10 mM glucose to wildtype *C. elegans* on the survival of the nematodes under a subsequent heat-stress at 37 °C. In addition, we assessed the effects of extracts that reverse the detrimental glucose effects on proteasomal activities.

## Materials and Methods

### Reagents

SYTOX green nucleic acid stain was obtained from Life Technologies (Karlsruhe, Germany). Rotilab sealing film, 96- and 384-well plates were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). All extracts were from Plantextrakt GmbH & Co. KG (Vestenbergersreuth, Germany). All other materials used were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

### Extract Preparation

For the preparation of the extracts, the herbal and fruity raw materials which are listed in Table 1 are extracted with water or diluted ethanol. After the extraction process the solvent is

removed by gentle evaporation with reduced air pressure. The concentrated viscous extracts are usually blended with carrier substances, preferred maltodextrin, and are finally spray-dried.

### Determination of Reference Compounds

Total phenolics were measured with a modified version of the Folin-Ciocalteu method according to DIN ISO/DIS 14502/1 using gallic acid as a reference. Phenolic contents of the extracts from rooibos, cinnamon, lime blossom, knotgrass, and jiaogulan are given in Table 1.

The determination of procyanidins in blackberry leaves extract was carried out according to Ph.Eur. 7.0. Photometric determination at 518 nm in a 0.1 % aqueous extract acidified with 1 % citric acid served the calculation of malvinchloride in the extracts from hibiscus and elderberries. Concentrations of known reference compounds in the extracts of coffee (PhytoLab in-house method), kola (DIN 10801 and ISO 10727), ginseng (PhytoLab in-house method), camomile (PhytoLab in-house method), paraguay tea (DIN 10801 and ISO 10727), balm (PhytoLab in-house method), rhodiola (PhytoLab in-house method), and black tea (DIN 10801) were accomplished by HPLC, exploiting the characteristic UV/Vis absorption maxima (see Table 1 for contents).

### *C. elegans* Maintenance

*C. elegans* wildtype strain N2, variation Bristol, was obtained from the *C. elegans* Genetics Center, CGC (University of Minnesota, MN, USA). Nematodes were maintained on nematode growth medium (NGM) agar plates seeded with *E. coli*

**Table 1** Contents of reference compounds in plant extracts

Extract made of:	Latin name	Reference compound	Measured content [%]	Method used
Coffee seeds	<i>Coffea</i> spp.	chlorogenic acid	26.77	HPLC
Cola seeds	<i>Cola</i> spp.	caffeine	2.91	HPLC
Fermented Rooibos leaves	<i>Aspalathus linearis</i>	total polyphenols	18.14	UV/Vis
Cinnamon bark	<i>Cinnamomum</i> spp.	total polyphenols	10.87	UV/Vis
Ginseng roots	<i>Panax ginseng</i>	ginsenosides	5.18	HPLC
Camomile flowers	<i>Matricaria chamomilla</i>	apigenin and apigenin-7-glucoside	3.63	HPLC
Lime blossom flowers	<i>Tilia</i> spp.	total polyphenols	10.96	UV/Vis
Green Paraguay tea leaves	<i>Ilex paraguariensis</i>	caffeine	1.78	HPLC
Balm leaves	<i>Melissa officinalis</i>	rosmarinic acid	2.29	HPLC
Rhodiola root	<i>Rhodiola rosea</i>	salidroside	1.20	HPLC
Black tea leaves	<i>Camellia sinensis</i>	caffeine	4.03	HPLC
Knotgrass herb	<i>Polygonum aviculare</i>	total polyphenols	6.32	UV/Vis
Blackberry leaves	<i>Rubus fruticosus</i>	procyanidins	1.70	UV/Vis
Hibiscus calyces	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	anthocyanins	2.60	UV/Vis
Elderberry juice	<i>Sambucus nigra</i>	anthocyanins	14.30	UV/Vis
Jiaogulan leaves	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	total polyphenols	2.04	UV/Vis

OP50 at 20 °C according to standard protocols [10]. Methods such as freezing nematodes and obtaining synchronous populations using a bleaching method with hypochlorite treatment of egg-laying adults were also performed according to standard protocols [11].

#### Treatment of Nematodes with Glucose and Plant Extracts

Synchronous nematodes were raised in liquid culture using NGM liquid and packed *E. coli* OP50 according to Stiernagle [11]. Carbenicillin was added to the NGM liquid in order to inactivate *E. coli*. A volume of 46 µl of NGM liquid was dispensed in each well of a 96-well microplate, to which 10 µl M9-buffer containing 10 synchronized L1 larvae were added. L1 larvae were maintained shaking at 20 °C and reached the adult stage within three days. To young adult nematodes a volume of 6 µl glucose in M9-buffer was added reaching a final concentration of 10 mM. Plant extracts were prepared as 1 % (w/w) stock solutions in M9-buffer and sonicated for 5 min. 7 µl of plant extract stock solution was added to the incubation medium to reach a final concentration of 0.1 %. Control nematodes were always treated with identical volumes of M9-buffer only instead of glucose and/or plant extracts.

#### Determination of Survival at 37 °C

After incubation of young adult N2 nematodes for 48 h at 20 °C in the presence or absence of glucose or plant extracts lifespan was determined using a microplate thermotolerance assay [12]. In brief, nematodes were washed off the wells with M9-buffer/Tween<sup>®</sup>20 (1 %, v/v) into 15 ml tubes followed by additional three washing steps. In each well of a black 384-well low-volume microtitre plate 6.5 µl M9-buffer/Tween<sup>®</sup>20 (1 %, v/v) solution was added. Subsequently, one nematode was dispensed in 1 µl M9 buffer under a stereo-microscope (Breukhoven Microscope Systems) into each well and mixed with 7.5 µl SYTOX green to reach a final concentration of 1 µM. Heat shock (37 °C) was induced and fluorescence was measured with a Fluoroskan Ascent microtiter plate reader (Thermo Labsystems, Bonn, Germany) every 30 min. To detect SYTOX green fluorescence, excitation wavelength was set to 485 nm and emission was measured at 538 nm.

#### Proteasomal Activity

For protein extraction, nematodes were treated with lysis buffer (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, DTT 2 mM) and frozen at –80 °C. After homogenization with Peqlab Precellys 24-Dual (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany), protein concentration was determined by the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Munich, Germany). Specific proteasome activity was assessed using a fluorogenic peptide substrate assay [13]. In brief, the solubilized proteins

were incubated with Suc-LLVY-AMC (final concentration 140 µM) in proteasome activity assay buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 5 mM ATP) at room temperature. The fluorescence intensity was measured in triplicate over 3 h every 10 min with excitations at 355 nm and emissions at 460 nm, using the fluorescence plate reader. For calculation of specific proteasome activities, those measured in the presence of 10 µM proteasome inhibitor MG132 were subtracted from activities due to overall fluorogenic peptide cleavage.

#### Calculations and Statistics

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Log rank test was performed to compare survival rates with *p* values <0.05 being significant. Kaplan–Meier survival curves are shown for survival experiments. For group comparisons, analysis of variance (ANOVA) was performed. Differences between groups were determined by Bonferroni-Holm multiple comparison test. Results are presented as means±SD.

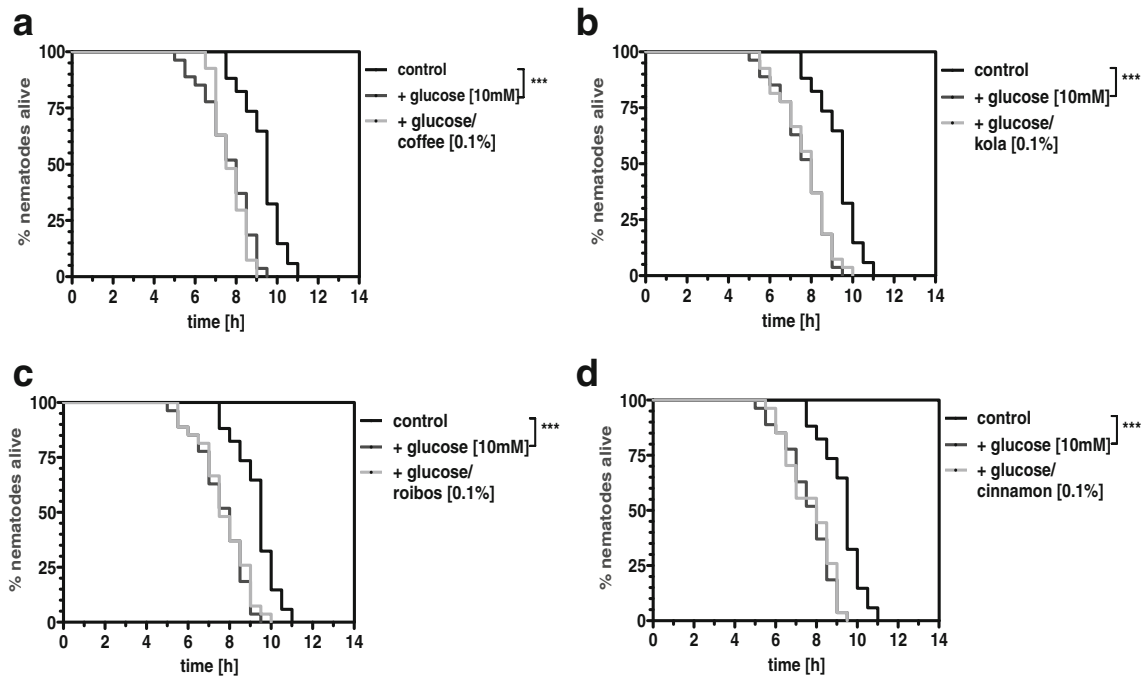
## Results and Discussion

#### Contents of Reference Compounds in Plant Extracts

Reference compounds of the 16 plant extracts were analyzed according to standard protocols. The different reference compounds were chosen based on their quantitative occurrence in the different original plants [14,15]. Respective contents of chlorogenic acid in coffee, caffeine in kola, paraguay tea and black tea, ginsenosides in ginseng, apigenin, and apigenin-7-glucoside in camomile, rosmarinic acid in balm, salidroside in rhodiola, procyanidins in leaves from blackberries, anthocyanins in hibiscus and elderberries, and total polyphenols in the other extracts are shown in Table 1.

#### Effects of Plant Extracts on Glucose-induced Reductions of Survival

As previously shown [7], nematodes exposed for 48 h at 20 °C to 10 mM glucose were short-lived in comparison to those which were left without glucose when both groups were transferred subsequently to 37 °C (Figs. 1, 2 and 3). Although we primarily tested thereby the ability of the nematodes to resist a thermal stress in response to the different pre-treatments, it must be emphasized here, that similar if not identical stress response adaptations, such as the regulation of proteostasis, are also crucial for the determination of lifespan [16]. In a recent publication [7], we have shown that indeed impairment of the proteostasis network is more relevant for lifespan reductions caused by glucose than the so far

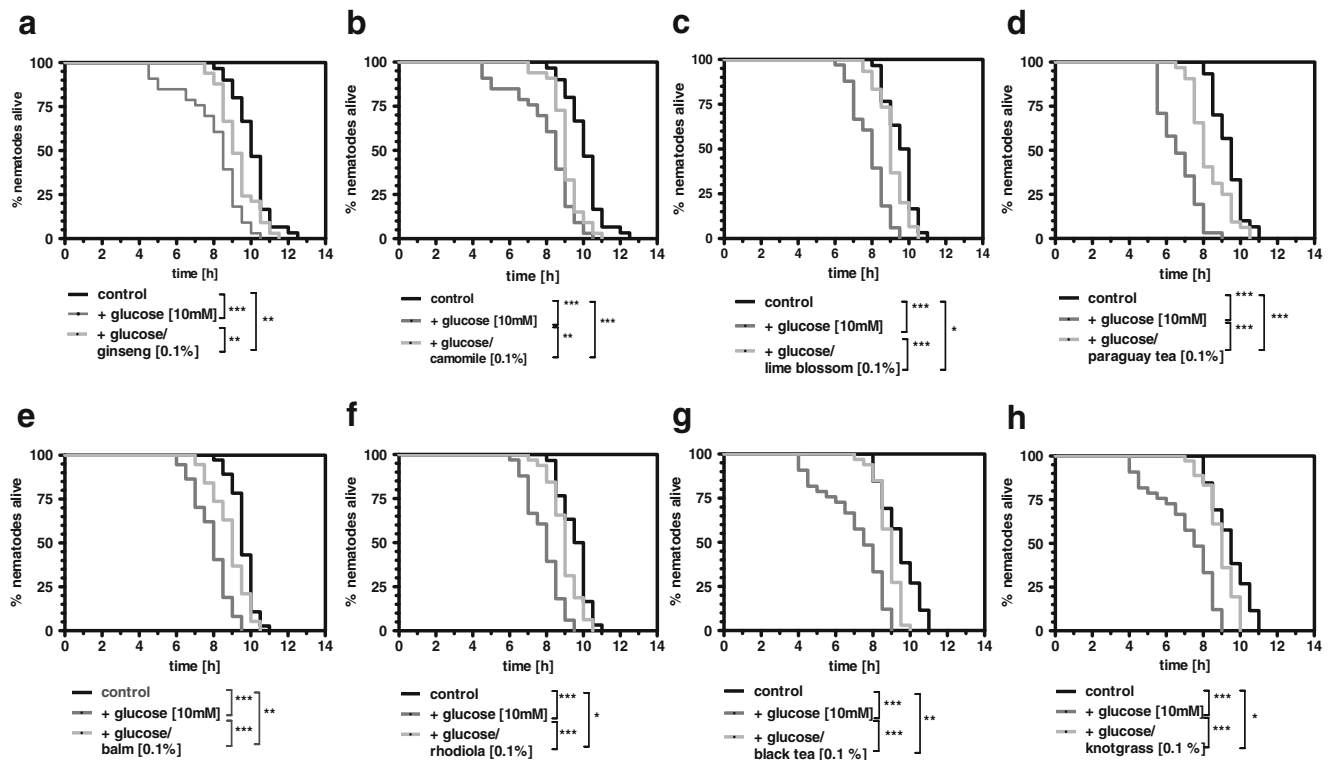


**Fig. 1** Reductions of survival due to glucose treatment are not affected by extracts of coffee (a), kola (b), roibos (c), or cinnamon (d) when applied for 48 h at 20 °C at 0.1 % to N2 wildtype nematodes in the

presence of 10 mM glucose. Subsequently, survival was recorded at 37 °C using SYTOX-green to indicate dead worms as described in the Methods section. \*\*\*  $p < 0.001$

as classical described indicators of glucose-toxicity, such as ROS-generation or AGE-formation. Accordingly, the

conclusion could be drawn that glucose causes very subtle impairments of protein structures that limit proteostasis and

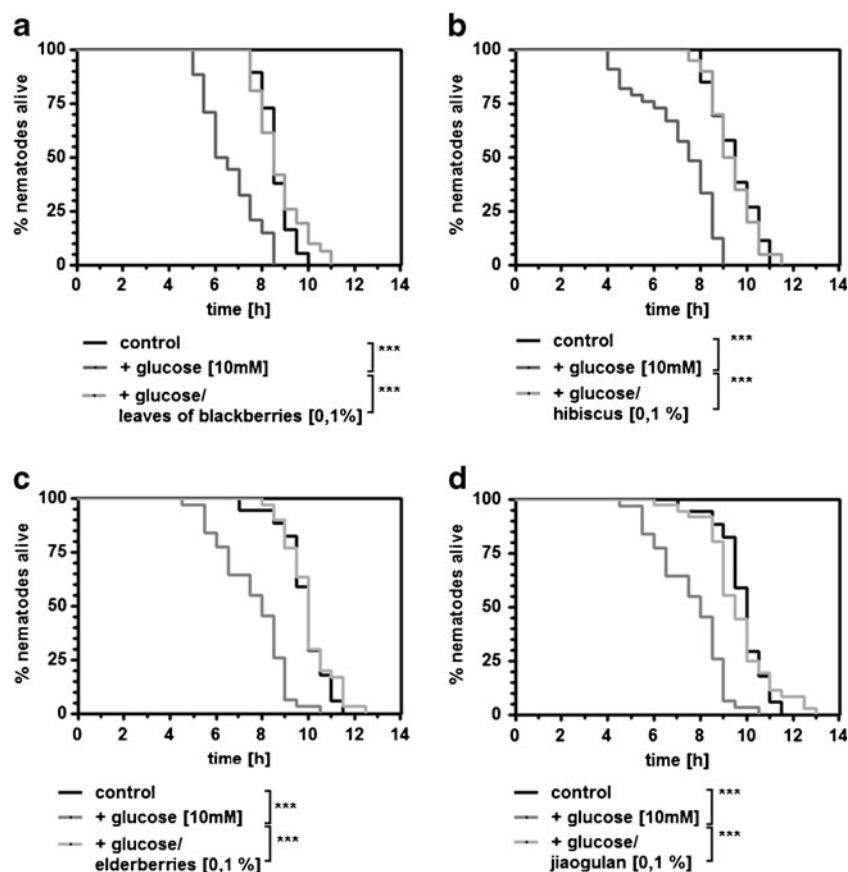


**Fig. 2** Plant extracts which prolong the survival of nematodes exposed to glucose. Plant extracts tested at a final concentration of 0.1 % for their ability to affect the lifespan of wildtype nematodes caused by 10 mM

glucose at 37 °C were as follows: ginseng (a), camomile (b), lime blossom (c), paraguay tea (d), balm (e), rhodiola (f), black tea (g), or knotgrass (h). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$



**Fig. 3** Four plant extracts completely reversed glucose-toxicity with regard to lifespan at 37 °C. Extracts prepared from leaves of blackberries (a), from hibiscus (b), elderberries (c), or jiaogulan (d) were tested at a final concentration of 0.1 % for their abilities to rescue the reductions of survival due to glucose. \*\*\*  $p < 0.001$

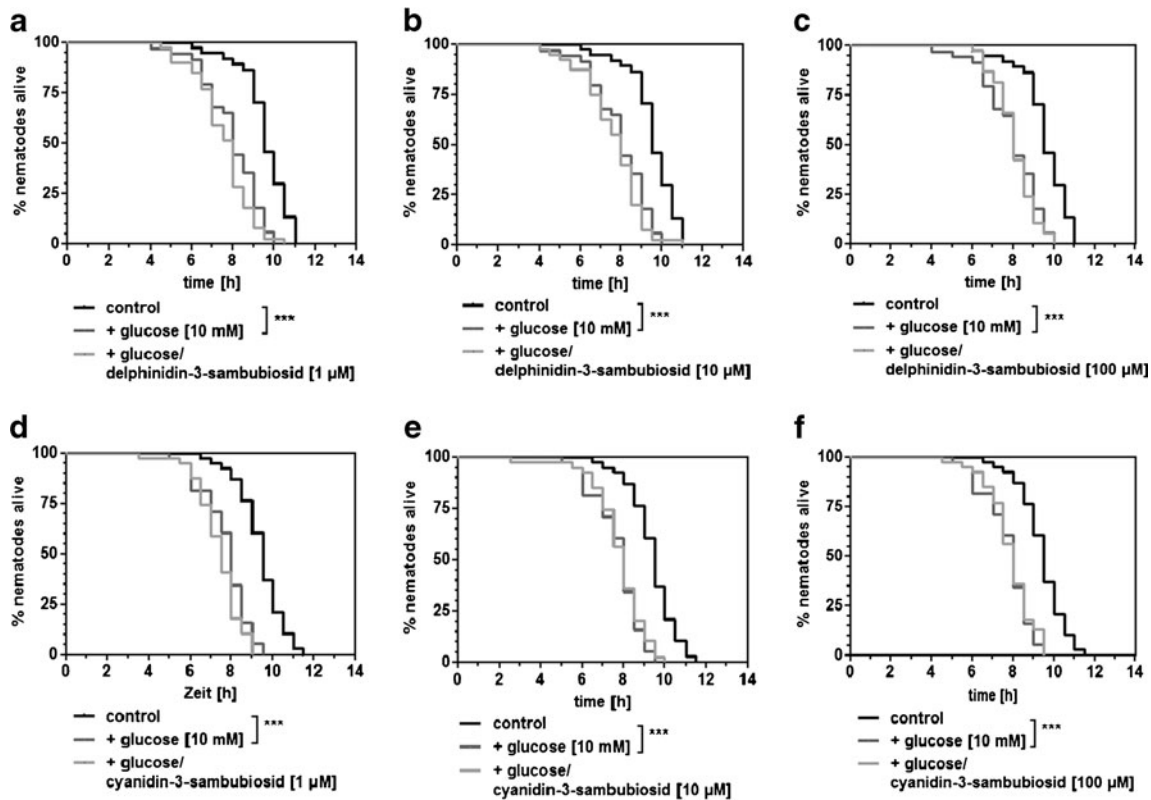


lifespan but are not, at least in our experimental setup, so extensive to cause an increase in protein-carbonyls or AGEs [7]. Therefore, the major aim of the present study was to use the same experimental setup as screening platform to identify plant extracts that are able to reverse glucose-induced reductions of survival.

Extracts from coffee (Fig. 1a), kola (Fig. 1b), rooibos (Fig. 1c) and cinnamon (Fig. 1d) were all without significant effect on the normal reduction of survival from addition of glucose. Extracts made from ginseng (Fig. 2a), camomile (Fig. 2b), lime blossom (Fig. 2c), paraguay tea (Fig. 2d), balm (Fig. 2e), rhodiola (Fig. 2f), black tea (Fig. 2g), or knotgrass (Fig. 2h) all extended the lifespan of the glucose-treated nematodes significantly but did not rescue survival completely. Since rooibos extract contains higher total polyphenol amounts than camomile extract, it must be concluded that the polyphenol species might be more relevant for the prevention of glucose-toxicity than the total amount. Extracts which completely reversed the lifespan reduction caused by glucose were those from leaves of blackberries (Fig. 3a), hibiscus (Fig. 3b), elderberries (Fig. 3c), or jiaogulan (Fig. 3d). Since extracts from hibiscus and especially from elderberries are characterized by a comparably high content of anthocyanins (Table 1), we tested two monomeric reference compounds, delphinidin-3-sambubiosid und cyanidin-3-sambubiosid, for

their influence on glucose-toxicity. Both compounds were tested at concentrations of 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , and 100  $\mu\text{M}$ . Taking into account that the concentrations of anthocyanins in elderberries is about 10 % (Table 1), those concentrations should cover the concentrations present in the extracts of elderberries but also from hibiscus. Neither anthocyanin affected survival reduction that was due to glucose exposure, at any tested concentration (Fig. 4), suggesting that the monomeric anthocyanins are not responsible for the lifespan rescuing activities exerted by the extracts. However, we can not rule out that synergistic effects were present in the extract which were absent when testing the monomeric forms. Nevertheless, it appears more likely that the survival relevant activities of extracts made from hibiscus or elderberries are mediated by oligomeric anthocyanins, given that the sum of monomeric forms, including delphinidin-3-sambubiosid and cyanidin-3-sambubiosid, in the hibiscus extract is 1.4 % [17], and thus almost half of the estimated anthocyanins in hibiscus (Table 1) consist of oligomeric structures. That oligomeric structures could provide a common basis for triggering stress response rather effectively, is substantiated by the presence of procyanidins in the leaves from blackberries (Table 1) and the gypenosides in jiaogulan [18].

None of the extracts tested affected survival of the nematodes in the absence of glucose (data not shown). These results let us



**Fig. 4** Lead anthocyanidines are not responsible for the survival rescue caused by anthocyanin-rich extracts in glucose-exposed nematodes. Delphinidin-3-sambubiosid was tested at 1 μM (a), 10 μM (b), and 100 μM (c) for its influence on survival at 37 °C in nematodes exposed

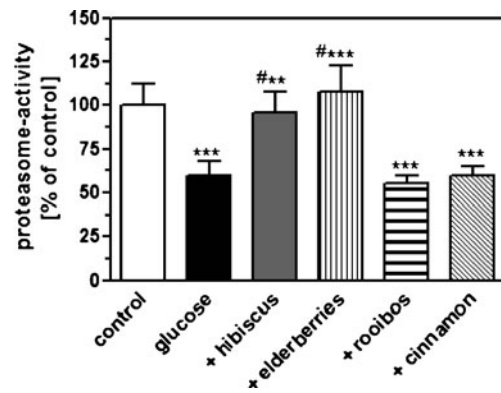
to 10 mM glucose. Likewise, 1 μM (d), 10 μM (e), and 100 μM (f) of cyanidin-3-sambubiosid did not affect survival reduction caused by glucose

suggest that in respect of preventing glucose-toxicity, the effective extracts cause a hormetic response, leading to an improved stress-resistance and that those adaptations are not necessarily seen with regard to survival in the absence of a stressor.

Activation of the Proteasome

Recent findings showed that the knockdown of key proteins of the ubiquitin-proteasome system, such as the nematode ubiquitin UBQ-1 or the ubiquitin-activating enzyme UBA-1, reduced the survival at 37 °C but prevented a further lifespan reduction by glucose [10]. On the contrary, knockdown of BEC-1 a key protein for the formation of autophagosomes, completely prevented lifespan reductions by glucose whereas the knockdown of UBQ-1 was dominant over that of BEC-1 [7]. We therefore concluded, that the activation of proteasomal degradation might be a promising strategy to prevent accumulation of glucose-impaired proteins and thus glucose-toxicity. This hypothesis was further supported by studies demonstrating that malfunction of cellular protein degradation can contribute to different aspects of the phenotype of ageing and to the pathogenesis of age-related diseases [19]. In the present study, we were able to show that incubation of wildtype *C. elegans* with extracts from hibiscus or

elderberries completely reversed the reductions of proteasomal activity which were due to glucose (Fig. 5). In this regard the extracts of rooibos or cinnamon were less effective (Fig. 5).



**Fig. 5** Proteasomal activity is enhanced by extracts from hibiscus and elderberries. Activity of the proteasome was estimated subsequent to the incubation of the nematodes for 48 h with 10 mM glucose and 0.1 % of the extracts due to the cleavage of the fluorogenic peptide Suc-LLVY-AMC. MG123 was used at 10 μM in order to inhibit specifically proteasomal degradation and values obtained were subtracted from values generated in the absence of the inhibitor. \*\*\*  $p < 0.001$  versus the control, \*\*\*  $p < 0.001$  versus control, #\*\*  $p < 0.01$  and #\*\*\*  $p < 0.001$  versus glucose treated nematodes.  $n = 4$



In conclusion, we used a high-throughput survival analysis in a simple model organism in order to identify plant extracts which reverse glucose-toxicity. Oligomeric structures consisting of anthocyanins, catechins or gypenosides are suggested as representatives for effective plant extracts with regard to the observed increase of survival under thermal stress. The portability of such informations to higher animals and likely also humans is substantiated by findings which demonstrate renal protective effects of extracts from guava fruit in diabetic mice [20], or antioxidant and antiglycative potential of a *Psidium guajava* leaf extract or a mulberry leaf extract in diabetic rats [21,22],

**Acknowledgments** We greatly acknowledge Mr. Alan McDonley for critical reading of the manuscript.

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Monnier L, Colette C, Owens D (2012) The glycaemic triumvirate and diabetic complications: is the whole greater than the sum of its component parts? *Diabetes Res Clin Pract* 95:303–311
- Preuss HG (1997) Effects of glucose/insulin perturbations on aging and chronic disorders of aging: the evidence. *J Am Coll Nutr* 16:397–403
- Mooradian AD, Thurman JE (1999) Glucotoxicity: potential mechanisms. *Clin Geriatr Med* 15:255
- Beal MF (2002) Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 32:797–803
- Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L (2010) Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65:963–975
- Newsholme P, Gaudel C, Krause M (2012) Mitochondria and diabetes. An intriguing pathogenetic role. *Adv Exp Med Biol* 942:235–247
- Fitzenberger E, Boll M, Wenzel U (2013) Impairment of the proteasome is crucial for glucose-induced lifespan reduction in the mev-1 mutant of *Caenorhabditis elegans*. *Biochim Biophys Acta* 1832:565–573
- Elosta A, Ghous T, Ahmed N (2012) Natural products as anti-glycation agents: possible therapeutic potential for diabetic complications. *Curr Diabetes Rev* 8:92–108
- Wu CH, Huang SM, Lin JA, Yen GC (2011) Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. *Food Funct* 2:224–234
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genet Dev* 77:71–94
- Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook* 1-11
- Gill MS, Olsen A, Sampayo JN, Lightgow GJ (2003) An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 35:558–565
- Pispa J, Palmén S, Holmberg CI, Jäntti J (2008) *C. elegans* dss-1 is functionally conserved and required for oogenesis and larval growth. *BMC Dev Biol* 8:51
- Tsai YC, Lin CL, Chen BH (2010) Preparative chromatography of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* and their antiproliferation effect on hepatoma cells. *Phytomedicine* 18:2–10
- Hager H (2012) Hagers handbuch der pharmazeutischen praxis. Springer, Hager-ROM, Berlin
- Raynes R, Leckey BD Jr, Nguyen K, Westerheide SD (2012) Heat shock and caloric restriction have a synergistic effect on the heat shock response in a sir2.1-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 287:29045–29053
- Frank T, Janssen M, Netzel M, Strass G, Kler A, Kriesl E, Bitsch I (2005) Pharmacokinetics of anthocyanidin-3-glycosides following consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. extract. *J Clin Pharmacol* 45:203–210
- Liu F, Ren D, Guo DA, Pan Y, Zhang H, Hu P (2008) Method development for gypenosides fingerprint by high performance liquid chromatography with diode-array detection and the addition of internal standard. *Chem Pharm Bull* 56:389–393
- Martinez-Vicente M, Sovak G, Cuervo AM (2005) Protein degradation and aging. *Exp Gerontol* 40:622–633
- Lin CY, Yin MC (2012) Renal protective effects of extracts from guava fruit (*Psidium guajava* L.) in diabetic mice. *Plant Foods Hum Nutr* 67:303–308
- Soman S, Rauf AA, Indira M, Rajamanickam C (2010) Antioxidant and antiglycative potential of ethyl acetate fraction of *Psidium guajava* leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Plant Foods Hum Nutr* 65:386–391
- Naowaboot J, Pannangpetch P, Kukongviriyapan V, Kongyingyoes B, Kukongviriyapan U (2009) Antihyperglycemic, antioxidant and antiglycation activities of mulberry leaf extract in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. *Plant Foods Hum Nutr* 64:116–121

### **B.3 Publikation 3**

**Deusing DJ**, Winter S, Kler A, Kriesl E, Bonnländer B, Wenzel U, Fitzenberger E (2015)  
A catechin-enriched green tea extract prevents glucose-induced survival reduction in *Caenorhabditis elegans* through *sir-2.1* and *uba-1* dependent hormesis. *Fitoterapia* 102:163-170



## A catechin-enriched green tea extract prevents glucose-induced survival reduction in *Caenorhabditis elegans* through *sir-2.1* and *uba-1* dependent hormesis



Dorothe Jenni Deusing<sup>a</sup>, Sarah Winter<sup>a</sup>, Adolf Kler<sup>b</sup>, Erwin Kriesl<sup>b</sup>, Bernd Bonnländer<sup>b</sup>, Uwe Wenzel<sup>a</sup>, Elena Fitzenberger<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Molecular Nutrition Research, Interdisciplinary Research Center, Justus-Liebig-University of Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany

<sup>b</sup> Plantextrakt GmbH & Co. KG, Dutendorfer Str. 5-7, D-91487 Vestenbergsgreuth, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 January 2015

Accepted in revised form 4 March 2015

Accepted 6 March 2015

Available online 11 March 2015

#### Chemical compounds studied in this article:

Epicatechin (PubChem CID: 72276)

Epicatechin gallate (PubChem CID: 107905)

Epigallocatechin (PubChem CID: 72277)

Epigallocatechin gallate (PubChem CID: 65064)

#### Keywords:

Glucose-induced toxicity

Green tea catechins

*Caenorhabditis elegans*

SIR-2.1

Proteasome

Hormesis

### ABSTRACT

Hyperglycemia is a hallmark of diabetes mellitus which leads to the onset of complications in the long term. Green tea through its high content of polyphenolic catechins, on the other hand, is suggested to prevent or at least delay such detrimental complications. In the present study we fed the nematode *Caenorhabditis elegans* on a liquid medium supplemented with 10 mM glucose in the absence or presence of a catechin-enriched green tea extract (CEGTE). After exposure of young adults for 48 h survival was subsequently measured under heat stress at 37 °C. Whereas CEGTE at 0.01% did not affect the survival of wild type nematodes, it completely reversed the glucose-induced survival reduction. Those effects were not achieved through the monomeric catechins included in CEGTE. RNA interference (RNAi) for *sir-2.1* not only prevented the survival extension by CEGTE under simultaneous glucose exposure but also caused a further reduction of survival. Likewise, the knockdown of *uba-1*, encoding the only E1-ubiquitin-activating enzyme in *C. elegans*, proved that UBA-1 is essential for the survival extension by CEGTE and that its loss of function changes CEGTE from a survival extending into a survival reducing extract. Stimulation of the proteasome by CEGTE was finally proven through measurements of the proteolytic cleavage of a fluorogenic peptide substrate.

To conclude, our studies provide evidence that CEGTE reverses glucose-induced damage in *C. elegans* through activation of adaptive responses mediated by SIR-2.1 and proteasomal degradation. The hormetic mode of action is revealed by a reduction of survival once the adaptive processes were blocked.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Enhanced blood glucose levels, known as hyperglycemia, are recognized as the major cause for the development of late

onset diabetic complications [1]. Chronic hyperglycemia imposes damage in various cell types and is strongly correlated with microvascular complications, including retinopathy, nephropathy, and neuropathy [2]. Altogether, prolonged elevated plasma glucose levels are associated with premature death in animals and humans [3]. Polyphenolic compounds as present in larger amounts in plant foods, have been suggested to prevent the development of long-term diabetes complications [4]. Besides displaying antioxidative and anti-inflammatory activities, through which polyphenols could interfere with increased ROS and inflammation as a consequence of enhanced glucose levels [5], specific influences on glucose transport and

**Abbreviations:** CEGTE, catechin-enriched green tea extract; EC, epicatechin; ECG, epicatechin gallate; EGC, epigallocatechin; EGCG, epigallocatechin gallate; MW, molecular weight; NGM, nematode growth medium; RNAi, RNA interference; SGLT, sodium-dependent glucose transporter; Suc-LLVY-AMC, succinyl-leucyl-leucyl-valine-aminomethyl-coumarine.

\* Corresponding author. Tel.: +49 6419939222.

E-mail address: [elena.fitzenberger@ernaehrung.uni-giessen.de](mailto:elena.fitzenberger@ernaehrung.uni-giessen.de) (E. Fitzenberger).

metabolism has also been described [4]. Those very specific effects include inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase [6,7], the key enzymes for the digestion of dietary carbohydrates, or the inhibition of SGLT-1 and SGLT-2, which are mainly responsible for intestinal glucose absorption and renal glucose reabsorption [7,8]. Moreover, selected polyphenols have been demonstrated to regulate the key pathways of carbohydrate metabolism and hepatic glucose homeostasis including glycolysis, glycogenesis and gluconeogenesis, which are usually impaired in diabetes [4,9,10]. The major green tea polyphenol constituents, the catechins, were described to affect many of those metabolic dysregulations of diabetes [4,11]. Although intervention studies provide evidence that green tea consumption could be beneficial in preventing late onset diabetic complications in animal models [4,12], more simple models are required in order to explore quickly the underlying molecular mechanisms.

Using the nematode *Caenorhabditis elegans* as a model organism we have previously shown that it enables the fast screening of the effects of various plant extracts on glucose toxicity [13]. The most potent extracts in reverting the survival reduction caused by exposure versus enhanced glucose levels were also proven to be effective with regard to revert the glucose-induced impairment of the proteasome [13]. In a more mechanistic study we have shown that the polyphenol quercetin, also prevents the glucose-induced survival reduction in *C. elegans*, most likely through *sir-2.1* triggered activation of the proteasome [14].

In the present study, we tested a catechin-enriched green tea extract (CEGTE) for its potential to prevent glucose toxicity in *C. elegans* by assessing the survival of nematodes at 37 °C. RNA interference (RNAi) was used to investigate the role of *sir-2.1* and of key components of the proteasome for adaptations to the glucose imposed stress. Finally, we assessed the effect of CEGTE on the chymotrypsin-like activity of the proteasome, according to the release of a fluorophore in the presence and absence of a specific proteasome inhibitor.

## 2. Methods and materials

### 2.1. Reagents

SYTOX green nucleic acid stain was obtained from Life Technologies (Karlruhe, Germany). Suc-LLVY-AMC and all other materials used were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

### 2.2. Plant material

CEGTE is a spray dried extract from leaves of *Camellia sinensis* L. (Kuntze), family Theaceae, enriched with catechins to a total amount of at least 60% that was provided by Plantextrakt GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth, Germany), batch no. 19202077. CEGTE contained 76.9% total catechins and 37.9% EGCG, respectively, as determined using HPLC (Table 1). Therefore, the extract was dissolved and analyzed against external standards.

For extraction, 0.5 g extract are dissolved in 25 ml hot water (70 °C). After the solution has cooled down, 5 ml acetonitrile and 20 ml water are added. The sample solution is diluted 1:20 with stabilizing solution and subsequently centrifuged at

**Table 1**

Lead compounds of CEGTE were analyzed by HPLC and are given in % of the dry extract. RT: retention time.

Lead compound	RT (min)	Content (%)
Epigallocatechin	8.250	5.88
Catechin	10.832	1.53
Epicatechin	16.821	3.64
Epigallocatechin gallate	18.988	37.85
Epicatechin gallate	23.979	14.58
Gallocatechin	5.844	3.24
Gallocatechin gallate	19.976	10.21
Total catechins		76.92
Caffeine	15.994	10.23
Theobromine	6.419	0.16
Theogallin	3.931	0.05
Gallic acid	4.338	0.18

13,400 rpm for 3 min. The supernatant solution is used for HPLC measurement.

Catechins are separated by an RP-phenyl-hexyl column using an acetonitrile–water gradient and detected by UV-detector. The flow rate was 1 ml/min. For calibration a caffeine working standard with specific response factors for the various catechin derivatives is used (Fig. 1).

### 2.3. *C. elegans* and bacterial strains

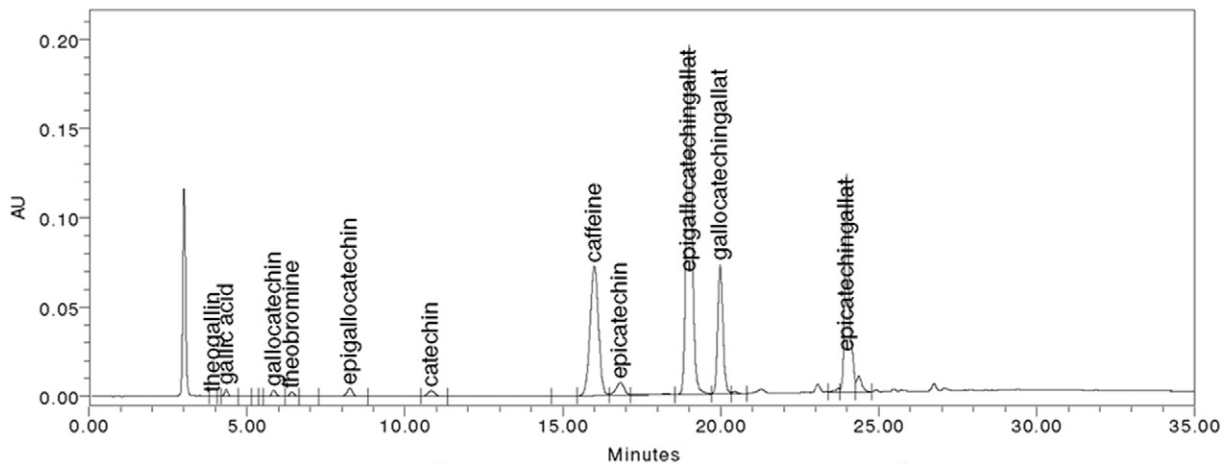
*C. elegans* wild type strain N2, variation Bristol, and *Escherichia coli* OP50 were obtained from *C. elegans* Genetics Center (CGC, University of Minnesota, USA). Nematodes were maintained on nematode growth medium (NGM) agar plates seeded with *E. coli* OP50 at 20 °C according to standard protocols [15]. For all experiments synchronous populations were used that were obtained by bleaching [16]. *E. coli* HT115 RNAi clones were purchased from Source Bioscience (Cambridge, UK) and included a negative control (L4440), *sir-2.1* (R1A8.4), and *uba-1* (C47E12.5).

### 2.4. RNAi experiments

RNAi experiments were performed in liquid cultures as described [17,18]. In brief, expression of gene-specific dsRNA in the corresponding RNAi strain was induced with 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside for 4 h at 37 °C. Subsequently bacteria cells were washed and resuspended in NGM liquid added with 40  $\mu$ g/ml kanamycin to inactivate *E. coli* HT115. A volume of 10  $\mu$ l M9-buffer containing 10 synchronized L1 larvae was dispensed into each well of a 96-well-plate (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) to which 46  $\mu$ l of *E. coli* HT115-NGM suspension were added. In general, L1 larvae reached the adult stage within 3 days of incubation with agitation at 20 °C. At this stage nematodes were treated with effectors for 48 h.

### 2.5. Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from 10,000 worms using Trizol. One-step-real-time PCR reactions were performed in triplicate using 1  $\mu$ l of RNA template (10 ng/ $\mu$ l), Brilliant II SYBR Green QRT-PCR Mastermix and appropriate primers in a CFX™ Real-



**Fig. 1.** HPLC profile of CEGTE. Catechin content of CEGTE was analyzed by HPLC as described in the [Methods and materials](#) section. The total catechin content of CEGTE was 76.92% and contained mainly EGCG (37.85%), ECG (14.58%) and EGC (5.88%). Further details of the HPLC profile are provided in [Table 1](#).

Time PCR Detection System (Bio-Rad, München, Germany). Cycling conditions were  $1 \times [15 \text{ min } 50^\circ\text{C}]$ ,  $1 \times [10 \text{ min } 95^\circ\text{C}]$ ,  $40 \times [30 \text{ s } 95^\circ\text{C}, 15 \text{ s } 52^\circ\text{C}, 30 \text{ s } 60^\circ\text{C}]$ ,  $1 \times [1 \text{ min } 95^\circ\text{C}]$ , and  $1 \times [30 \text{ s } 52^\circ\text{C} - 95^\circ\text{C}]$ . Changes in target gene expression were calculated according to Pfaffl [19] using the equation  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ . For determination of RNAi efficiency unique primer pairs (Eurofin MWG Operon, Ebersberg, Germany) recognizing only cDNA derived from endogenous mRNA were designed to avoid cross-reaction with genomic DNA and bacterially generated dsRNA and were as follows: 18S-rRNA fw-5'-ATG GTT GCA AAG CTG AAA CT-3', 18S-rRNA rev-5'-TCC CGT GTT GAG TCA AAT TA-3'; *sir-2.1* fw-5'-GAC AAA GAA CAG AAA GTA CAA CCA G-3', *sir-2.1* rev-5'-GGA GTG GCA CCA TCA TCA AG-3'; *uba-1* fw-5'-CAC TTT CTG GGG TCA ATC AG-3', *uba-1* rev-5'-TCC TCC GGC ATT ATT GCT A-3'. For each sample the fold change in the target gene (*sir-2.1* or *uba-1*) was normalized to 18S rRNA and relative to the expression in the vector control, which was fed on L4440 bacteria.

## 2.6. Survival analysis at 37 °C

Lifespan analysis under heat stress conditions (37 °C) was performed 48 h after the addition of effectors as previously described [20]. In brief, nematodes were washed off the wells with M9-buffer/Tween 20 into 15 ml tubes followed by additional three washing steps. In each well of a black 384-well low-volume microtiter plate (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) 6.5  $\mu\text{l}$  M9-buffer/Tween 20 (1% v/v) solution were added. Subsequently one nematode was dispensed in 1  $\mu\text{l}$  M9-buffer/Tween 20 into each well and mixed with 7.5  $\mu\text{l}$  SYTOX green (final concentration 1  $\mu\text{M}$ , Life Technologies, Karlsruhe, Germany). To prevent water evaporation the plates were sealed with Rotilab sealing film and covered with a lid (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). The induction of heat shock (37 °C) was done in a Fluoroskan Ascent microtiter plate reader (Thermo Labsystems, Bonn, Germany) and the measurement of SYTOX green fluorescence was performed therein every 30 min at excitations at 485 nm and emissions at 538 nm.

## 2.7. Chymotrypsin-like proteasomal activity

For protein extraction nematodes were treated with lysis buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT) and frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . After homogenization with Precellys 24-Dual (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) the concentration of solubilized proteins was determined by the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Munich, Germany). Quantification of specific proteasome activity was done by a fluorogenic peptide substrate assay as described [21]. In brief, the solubilized proteins were incubated with Suc-LLVY-AMC at a final concentration of 140  $\mu\text{M}$  in proteasome activity assay buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM ATP) at room temperature. The fluorescence intensity was measured in the in the Fluoroskan Ascent microtiter plate reader in triplicate over 3 h every 10 min with excitations at 355 nm and emissions at 460 nm. Fluorescence increase over this time was linear. To determine the specific proteasome activity, the average activity measured in the presence of proteasome inhibitor MG132 (final concentration 10  $\mu\text{M}$ ; Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany) was subtracted from activities due to overall fluorogenic peptide cleavage.

## 2.8. Calculations and statistics

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Log rank test was performed to compare survival rates with p-values  $<0.05$  being significant. Kaplan–Meier survival curves are shown for survival experiments. For group comparisons Analysis of variance (ANOVA) was performed. Following ANOVA, differences between groups were determined by Bonferroni–Holm multiple comparison test. Results are presented as means  $\pm$  SD.

## 3. Results

### 3.1. CEGTE prolongs the survival of glucose-treated wild type nematodes at 37 °C

As previously described [13], wild type *C. elegans* survived a heat shock significantly shorter when they had been exposed to



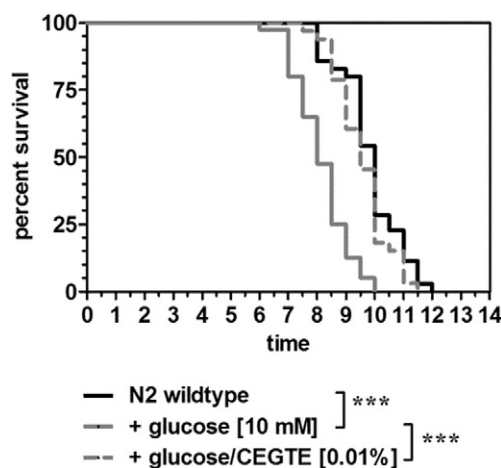
10 mM glucose for 48 h (Fig. 2). When CEGTE was added during the 48 h incubation of young adults at a concentration of 0.01% glucose toxicity was completely abolished (Fig. 2). In the absence of glucose, CEGTE did not affect the survival time of nematodes (data not shown). The high efficiency of CEGTE is further substantiated by a tenfold lower concentration needed for the reversal of the glucose mediated reduction of survival in comparison to other potent plant extracts described with regard to the same parameter [13]. Using concentrations of 0.1% of CEGTE resulted in the death of the whole population during the 48 h incubation period at 20 °C (data not shown).

### 3.2. Catechins are not responsible for the survival extension by CEGTE

Catechins and especially epigallocatechin gallate (EGCG) are major polyphenols in green tea and have been enriched in CEGTE. EGCG (MW = 458.4) is by 37.9% a constituent of CEGTE and results in a final concentration of 82.7  $\mu$ M when CEGTE is applied at 0.01%. In the present study we applied 100  $\mu$ M of the monomeric catechins representing concentrations that might be achieved by the application of 0.01% CEGTE at its maximum. Neither epicatechin (EC) (Fig. 3A), epicatechin gallate (ECG) (Fig. 3B), epigallocatechin (EGC) (Fig. 3C), nor EGCG was able to revert the survival reductions that were due to glucose exposure.

### 3.3. CEGTE acts via *sir-2.1* and the proteasome on glucose toxicity

Since we have recently found that the polyphenol quercetin prevents glucose toxicity depending on SIR-2.1 functionality [14], we investigated here whether CEGTE displays the same dependence for the same activity. Compared to quercetin, knockdown of *sir-2.1* (relative expression of  $0.22 \pm 0.05$  versus the vector control) not only prevented the reversal of glucose-induced survival reduction under heat-stress, but also caused



**Fig. 2.** CEGTE protects *C. elegans* from glucose toxicity. Treatment of nematodes with 10 mM glucose for 48 h decreases the survival of wild type *C. elegans* under subsequently applied heat-stress at 37 °C. Application of 0.01% CEGTE together with glucose prevents the glucose-induced reduction of survival completely. Nematodes were considered as dead according to the fluorescence generated by SYTOX-green when penetrating into dead cells, as described in the [Methods and materials](#) section. \*\*\* $p < 0.001$ .

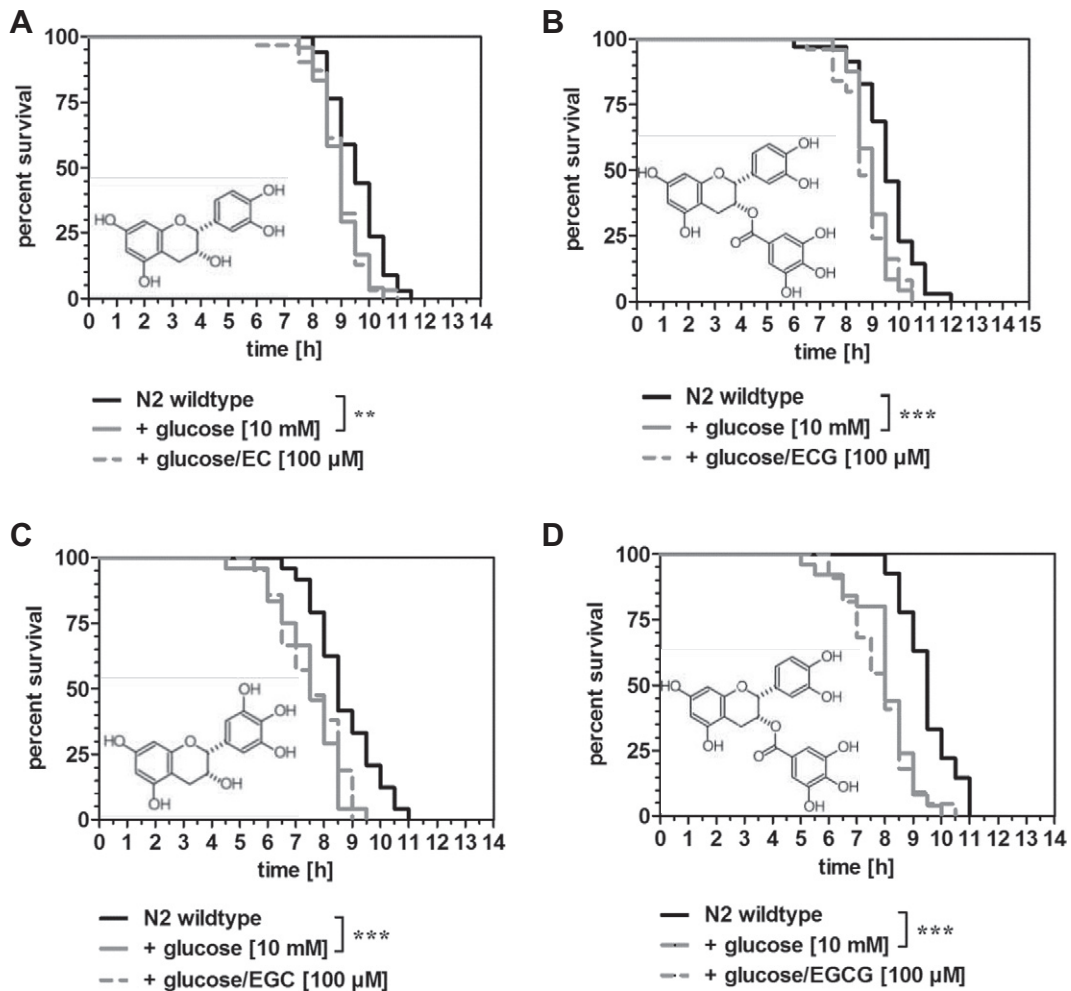
CEGTE to become toxic itself as evidenced by a further survival reduction when the extract was added to glucose treated nematodes (Fig. 4A). Similar effects were observed when *uba-1*, encoding the only known E1-ubiquitin-activating enzyme in *C. elegans* was knocked down (Fig. 4B). It has to be stressed here that those effects were only seen under diluted RNAi for *uba-1* (relative expression of  $0.45 \pm 0.11$  versus the vector control), which did not cause a survival reduction itself. When *uba-1* or *ubq-1*, encoding ubiquitin, was knocked down with undiluted RNAi-bacteria, survival reduction was too pronounced [14] to observe a further reduction of survival by CEGTE treatment (data not shown).

CEGTE was finally proven to enhance the chymotrypsin-like activity of the proteasome (Fig. 4C), substantiating the dependence of proteasomal activity in order to enable the protection from glucose-induced damage by CEGTE.

## 4. Discussion

Green tea is an important beverage consumed in East Asian diets which has been widely discussed to provide cancer chemoprevention, and to inhibit mechanisms involved in the generation of hypercholesterolemia, atherosclerosis, neurodegenerative diseases, and other aging-related disorders [22]. Catechins, especially EGCG, are the major polyphenolic constituents of green tea and have been extensively studied in the context of prevention of cardiovascular disease, cancer prevention, and glucose homeostasis [23,24]. With regard to the latter, green tea catechins were demonstrated to decrease glucose levels and to increase glucose tolerance in insulin-resistant mice [25]. EGCG attenuated dexamethasone and TNF- $\alpha$  promoted ROS generation and increased glucose uptake ability in this study [25], congruent with concepts that catechins are mainly acting through their antioxidative properties [26,27]. However, there are also reports suggesting that other mechanisms, including direct interactions with plasma membrane proteins, regulation of signal transduction pathways or mitochondrial function, might be more important in order to exert many of its beneficial biological actions [28]. Direct interaction of secondary plant compounds with proteins by the formation of ionic bonds is known to induce changes in conformation and bioactivity. Moreover, it has to be taken into account that green tea contains a complex mixture of catechins and other polyphenolic compounds that could synergistically affect the aforementioned mechanisms [29].

Although the catechins are chemical antioxidants which can quench free radical species and have been demonstrated to increase the resistance to oxidative stress in *C. elegans* [30], we have previously shown that the prevention of glucose-induced lifespan-reduction by the polyphenol quercetin is independent of antioxidant activities [31]. There is evidence that some of the effects of these compounds may be related to induction of oxidative stress indeed [32]. Such pro-oxidant effects may also induce endogenous antioxidant systems in normal tissues that in response offer protection against stressors such as carcinogens or glucose [32]. This leads to the concept of hormesis, saying that adaptive responses to mild stress may overcompensate for the stress, thereby protecting the organism from cellular damage that would accumulate in non-stressed individuals and contributes to the aging process or the development of disorders [33]. As a matter fact, it becomes

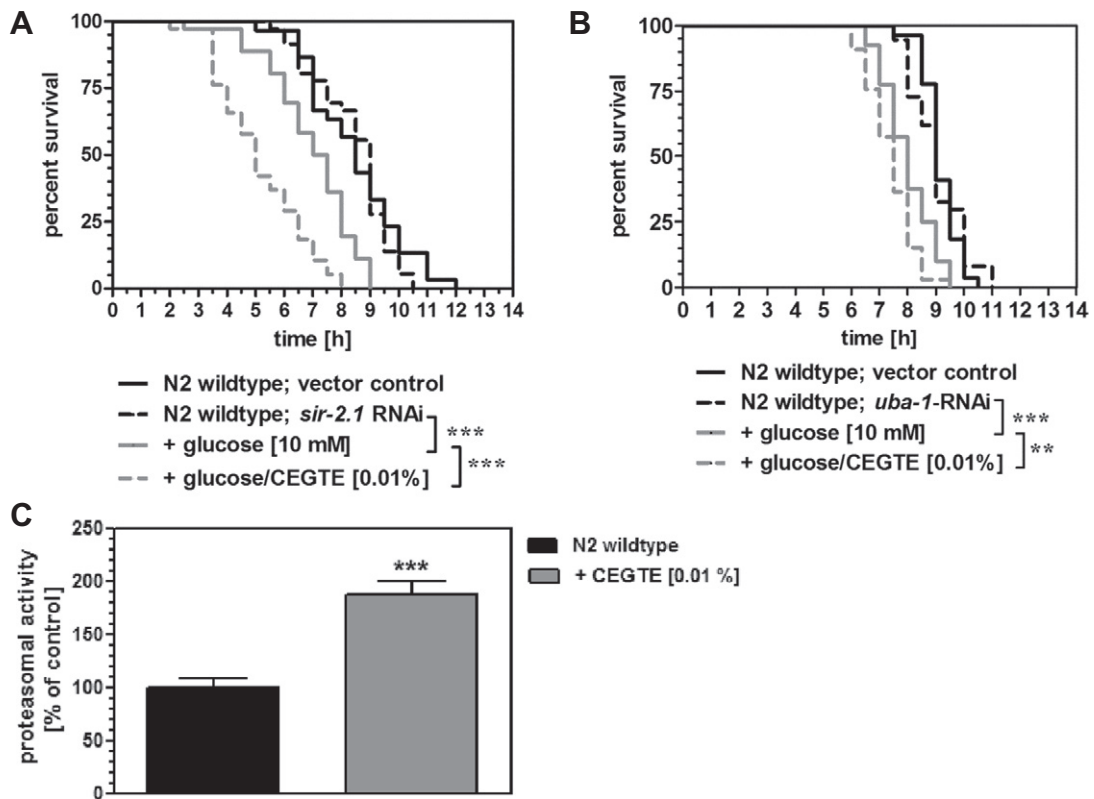


**Fig. 3.** Catechin monomers are ineffective regarding the reversal of glucose toxicity. The catechin monomers EC (A), ECG (B), EGC (C), and EGCG (D) included in CEGTE were tested at 100 μM on glucose-induced reductions of survival and proved to be without effects. The survival of nematodes treated with catechins in the presence of glucose is compared only to the exposed nematodes in the figures. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

increasingly evident that plant polyphenolic compounds do not exert their beneficial effects on animal and human physiology through their direct radical scavenging properties but through induction of a hormetic response likewise to caloric restriction [34,35]. Sirtuins, which are  $\text{NAD}^+$ -dependent deacetylases, have been identified as mediators of many of the biological responses to caloric restriction and several polyphenols were identified as potent sirtuin-activators which slow the pace of aging and increase the lifespan in metazoans [36,37]. Also catechins were shown to activate sirtuins directly or indirectly in a variety of models [38], and accordingly so-called “Mediterranean” diets, reflecting Mediterranean and Asian sirtuin-activating foods, may be a promising dietary strategy in preventing chronic diseases [39].

Using a catechin-enriched green tea extract (CEGTE) in the present study we were able to show that its addition to a liquid medium as a feeding strategy, completely prevented the reduction of survival caused by exposure to increased glucose levels. The glucose levels that were applied in the liquid medium has been previously shown to result in a concentration

of glucose inside the nematodes of approximately 8 mM [39], thus reflecting plasma glucose levels between physiological levels and the renal threshold for glucose in humans. The survival extending effects of CEGTE were completely dependent on the functional presence of SIR-2.1, whose homologue in mammals is SIRT-1, and when *sir-2.1* was knocked down by RNAi CEGTE became toxic, resulting in a reduced survival in the presence of glucose. Although we previously found that the polyphenol quercetin also extends the survival under glucose exposure in *mev-1* mutants of *C. elegans* in dependence of *sir-2.1* [14], it is the first time here that we observed a reduction of survival under treatment with polyphenols or plant extracts. The result, however, clearly suggests that SIR-2.1 is activated through CEGTE-mediated stress and then compensates for the detrimental effects of glucose. Interestingly, on 10-fold higher concentrations of CEGTE, i.e. 1%, nematodes died within 24 h, indicating that CEGTE is indeed a hormetic stressor, exerting beneficial effects at low concentrations while being toxic at higher concentrations. Similar results were obtained in a different model organism, the red flour beetle *Tribolium*



**Fig. 4.** CEGTE acts via SIR-2.1 and activation of the proteasome. RNAi for *sir-2.1* prevented the CEGTE mediated reversal of survival reductions by glucose (A). Likewise, knockdown of proteasomal *uba-1* blocked the survival extension by CEGTE (B). Survival curves of nematodes treated with CEGTE under RNAi are compared only to nematodes treated with the same RNAi in the absence of CEGTE. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Chymotrypsin-like proteasomal activity was significantly increased by CEGTE under exposure to 10 mM glucose (C). \*\*\* $p < 0.001$  versus the glucose treated control.

*castaneum*, fed on a grape seed extract which contains 40.1% oligomeric catechins, i.e. procyanidins [40]. The survival extending effects of the grape seed extract were proven to be dependent on a *foxo*-homologous gene and the reductions of its mRNA caused a left-shift of the survival curve under exposure to the plant extract [40]. Although monomeric catechins were substantially included in the grape seed extract they did not mediate the effects on survival in *T. castaneum* [40]. Experiments using *C. elegans* and rooibos in a high glucose environment revealed that this extract increases stress resistance and promotes longevity under stress, which is suggested to be mediated by regulating the insulin-like signaling pathway and its transcription factor DAF-16/FOXO [41]. Since *sir-2.1* transcriptionally cooperates with DAF-16 [42] such cooperation may also be required for the observed hormetic effects of *sir-2.1*. On the other hand, we have shown previously that DAF-16 is dispensable for the survival extending properties of the polyphenol quercetin in the same model of glucose toxicity [14]. Likewise to the experiments in *T. castaneum*, monomeric catechins were ineffective in *C. elegans*, too, regarding the reversal of glucose-induced reductions of survival in the present study and we suggested in a previous study that oligomeric structures from plant extracts could provide a common basis for triggering stress response rather effectively [13]. Moreover, the potent effects of CEGTE, which displays identical effects on prevention of glucose toxicity versus a

green tea extract that was not enriched with regard to catechins [13] at 10-fold lower concentrations (data not shown), indicates that together with the catechins something similar must have been co-concentrated. Procyanidins, which are present in green tea albeit at lower concentrations than monomeric catechins [43,44] and are known to be bioactive food factors of similar importance as tea catechins [45] might be such substances. Moreover, recent quantitative analysis of tea samples have demonstrated that the retrieved amount of procyanidins e.g. by HPLC methods considerably depends on the extraction method [46] suggesting that procyanidin content in green tea might be higher than believed so far. Altogether these statements are finally in agreement with previous findings that procyanidins from apples extend the lifespan of *C. elegans* [47].

Besides catechin-derivatives, caffeine is a major compound of CEGTE, which might contribute to the prevention of survival reduction caused by exposure to increased glucose levels. There is indeed evidence that 0.1% caffeine extends the lifespan of *C. elegans* wild type [48]. In 0.1% CEGTE, however, the caffeine content is 10-fold lower. Actually, this concentration was also tested in the aforementioned study. However, results on lifespan were not reported, indicating that this lower concentration was ineffective [48].

In search for possible targets through which activated sirtuins could finally affect glucose-induced adverse effects in



*C. elegans*, we found previously that impairment of the proteasome is crucial for glucose-induced survival reduction [31] and that quercetin protects from glucose toxicity via activation of the proteasome [14]. Moreover, hyperglycemia inhibited proteasomal activity in diabetic mice through methylglyoxal-induced covalent modifications of proteasomal subunits [49]. Also the beneficial activities of CEGTE were found to be associated with an increased activity of the proteasome in the present study substantiating the importance of proteasome functionality in order to prevent glucose toxicity by CEGTE. When the only ubiquitin-activating enzyme in *C. elegans*, *uba-1* was knocked down comparably slight by diluted RNAi, survival of the nematodes was further reduced by the addition of glucose, suggesting that also the proteasome is involved in the hormetic activities exploited by CEGTE. That the protein quality control system is probably a common mechanism by which plant extracts including those from green tea exert their beneficial effects is also supported by the finding that green tea catechins affect the expression of small heat shock proteins under oxidative stress and thereby reduced protein oligomerization [50].

In conclusion, our studies show that a catechin-enriched green tea extract exerts mild stress in *C. elegans* which leads to *sir-2.1* and *uba-1* dependent adaptations that enable the complete reversal of glucose-induced reduction of survival. Under functional impairment of these genes the plant extract caused a further decrease of survival stressing the importance of the genes for stress-resistance. The described hormesis induced by the green tea extract is not mediated through its catechin monomers though, since they were not able to reverse glucose-induced reduction of survival at all.

## References

- Monnier L, Colette C, Owens D. The glycemic triumvirate and diabetic complications: is the whole greater than the sum of its component parts? *Diabetes Res Clin Pract* 2012;95:303–11.
- Preuss HG. Effects of glucose/insulin perturbations on aging and chronic disorders of aging: the evidence. *J Am Coll Nutr* 1997;16:397–403.
- Mooradian AD, Thurman JE. Glucotoxicity: potential mechanisms. *Clin Geriatr Med* 1999;15:255.
- Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J Diabetes Metab Disord* 2013;12:43.
- Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Nagai R. Tea polyphenols regulate key mediators on inflammatory cardiovascular diseases. *Mediators Inflamm* 2009;2009:494928.
- Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol* 2006;52:149–53.
- Williamson G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol Nutr Food Res* 2013;57:48–57.
- Hummel CS, Lu C, Liu J, Ghezzi C, Hirayama BA, Loo DD, et al. Structural selectivity of human SGLT inhibitors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012;302:C373–82.
- Collins QF, Liu HY, Pi J, Liu Z, Quon MJ, Cao W. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis through 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2007;282:30143–9.
- Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M, Granner DK. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem* 2002;277:34933–40.
- Crespy V, Williamson G. A review of the health effects of green tea catechins in vivo animal models. *J Nutr* 2004;134:34315–40S.
- Wolfram S. Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *J Am Coll Nutr* 2007;26:373S–88S.
- Fitzenberger E, Deusing DJ, Wittkop A, Kler A, Kriesl E, Bonnländer B, et al. Effects of plant extracts on the reversal of glucose-induced impairment of stress-resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Plant Foods Hum Nutr* 2014;69:78–84.
- Fitzenberger E, Deusing DJ, Marx C, Boll M, Lüersen K, Wenzel U. The polyphenol quercetin protects the mev-1 mutant of *Caenorhabditis elegans* from glucose-induced reduction of survival under heat-stress depending on SIR-2.1, DAF-12, and proteasomal activity. *Mol Nutr Food Res* 2014;58(5):984–94.
- Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974;77:71–94.
- Stiernagel T. Maintenance of *C. elegans*. In: Hope I, editor. *C. elegans: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 1999. p. 51–67.
- Lehner B, Tischler J, Fraser AG. RNAi screens in *Caenorhabditis elegans* in a 96-well liquid format and their application to the systematic identification of genetic interactions. *Nat Protoc* 2006;1:1617–20.
- Timmons L, Court D, Fire A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 2001;263:103–12.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- Gill MS, Olsen A, Sampayo JN, Lightgow GJ. An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 2003;35:558–65.
- Pispa J, Palmèn S, Holmberg C, Jäntti J. *C. elegans* dss-1 is functionally conserved and required for oogenesis and larval growth. *BMC Dev Biol* 2008;8:51.
- Zaveri NT. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci* 2006;78:2073–80.
- Boon N. Health potential for functional green teas? *Int J Vitam Nutr Res* 2008;78:275–81.
- Khan N, Mukhtar H. Tea and health: studies in humans. *Curr Pharm Des* 2013;19:6141–7.
- Yan J, Zhao Y, Suo S, Liu Y, Zhao B. Green tea catechins ameliorate adipose insulin resistance by improving oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2012;52:1648–57.
- Dey A, Lakshmanan J. The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediated oxidative stress and injury in liver. *Food Funct* 2013;4:1148–84.
- Babu PV, Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2006;25(162):114–20.
- Kim HS, Quon MJ, Kim JA. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol* 2014;2:187–95.
- Wink M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. *Curr Drug Metab* 2008;9:996–1009.
- Abbas S, Wink M. Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med* 2009;75:216–21.
- Fitzenberger E, Boll M, Wenzel U. Impairment of the proteasome is crucial for glucose-induced lifespan reduction in the mev-1 mutant of *Caenorhabditis elegans*. *Biochim Biophys Acta* 1832;2013:565–73.
- Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys* 2010;501:65–72.
- Mattson MP. Hormesis and disease resistance: activation of cellular stress response pathways. *Hum Exp Toxicol* 2008;27:155–62.
- Calabrese V, Cornelius C, Cuzzocrea S, Iavicoli I, Rizzarelli E, Calabrese EJ. Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Mol Aspects Med* 2011;32:279–304.
- Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT, Iavicoli I, Di Paola R, Koverech A, et al. Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta* 1822;2012:753–83.
- Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 2004;430:686–9.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003;425:191–6.
- Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys* 2010;501:79–90.
- Pallauf K, Giller K, Huebbe P, Rimbach G. Nutrition and healthy ageing: calorie restriction or polyphenol-rich "Mediterranean" diet? *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:707421.
- Grünwald S, Fast A, Müller K, Boll M, Kler A, Bonnländer B, et al. Feeding a grape seed extract extends the survival of the red flour beetle *Tribolium castaneum* under heat-stress depending on nrf-2, jnk-1, and foxo-1 homologous genes but independent of catechin monomers. *Nutr Med* 2014;2:13.
- Chen W, Sudji IR, Wang E, Joubert E, van Wyk BE, Wink M. Ameliorative effect of aspalathin from rooibos (*Aspalathus linearis*) on acute oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Phytomedicine* 2013;20:380–6.

- [42] Berdichevsky A, Guarente L. A stress response pathway involving sirtuins, forkheads and 14-3-3 proteins. *Cell Cycle* 2006;5:2588–91.
- [43] de la Luz Cádiz-Currea M, Fernández-Arroyo S, Segura-Carretero A. Pine bark and green tea concentrated extracts: antioxidant activity and comprehensive characterization of bioactive compounds by HPLC-ESI-QTOF-MS. *Int J Mol Sci* 2014;14:20382–402.
- [44] Zadernowski R, Nowak-Polakowska H, Lossow B. Natural lipid antioxidants in selected plants seeds. *Acta Academ* 1995;107–118.
- [45] Yanagida A, Shoji A, Shibusawa Y, Shindo H, Tagshira M, Ikeda M, et al. Analytical separation of tea catechins and food-related polyphenols by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 2006;1112:195–201.
- [46] Sultana T, Stecher G, Mayer R, Jrojer L, Aureshi MN, Abel N, et al. Quality assessment and quantitative analysis of flavonoids from tea samples of different origins by HPLC-DAD-ESI-MS. *J Agric Food Chem* 2008;56:3444–53.
- [47] 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;77:122–7.
- [48] Lublin A, Isoda F, Patel H, Yen K, Nguyen L, Hajje D, et al. FDA-approved drugs that protect mammalian neurons from glucose toxicity slow aging dependent on cbp and protect against proteotoxicity. *PLoS One* 2011;6:e27762.
- [49] Queisser MA, Yao D, Geisler S, Hammes HP, Lochnit G, Schleicher ED, et al. Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal. *Diabetes* 2010;59:670–8.
- [50] Abbas S, Wink M. Epigallocatechin gallate inhibits beta amyloid oligomerization in *Caenorhabditis elegans* and affects the daf-2/insulin-like signaling pathway. *Phytomedicine* 2010;17:902–9.

## **B.4 Publikation 4**

**Deusing DJ**, Beyrer M, Fitzenberger E, Wenzel U (2015) Carnitine protects the nematode *Caenorhabditis elegans* from glucose-induced reduction of survival depending on the nuclear hormone receptor DAF-12. *Biochem Biophys Res Commun* 8;460(3):747-752



# Carnitine protects the nematode *Caenorhabditis elegans* from glucose-induced reduction of survival depending on the nuclear hormone receptor DAF-12



Dorothe Jenni Deusing, Melanie Beyrer, Elena Fitzenberger, Uwe Wenzel\*

Molecular Nutrition Research, Interdisciplinary Research Center, Justus-Liebig-University of Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 4 March 2015

Available online 25 March 2015

### Keywords:

Glucose-induced toxicity

*Caenorhabditis elegans*

Carnitine

Survival

Proteasome

Lysosomes

## ABSTRACT

Besides its function in transport of fatty acids into mitochondria in order to provide substrates for  $\beta$ -oxidation, carnitine has been shown to affect also glucose metabolism and to inhibit several mechanisms associated with diabetic complications. In the present study we used the *mev-1* mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans* fed on a high glucose concentration in liquid media as a diabetes model and tested the effects of carnitine supplementation on their survival under heat-stress. Carnitine at 100  $\mu$ M completely prevented the survival reduction that was caused by the application of 10 mM glucose. RNA-interference for *sir-2.1*, a candidate genes mediating the effects of carnitine revealed no contribution of the sirtuin for the rescue of survival. Under *daf-12* RNAi rescue of survival by carnitine was abolished. RNA-interference for  $\gamma$ -butyrobetaine hydroxylase 2, encoding the key enzyme for carnitine biosynthesis did neither increase glucose toxicity nor prevent the rescue of survival by carnitine, suggesting that the effects of carnitine supplementation on carnitine levels were significant. Finally, it was demonstrated that neither the amount of lysosomes nor the proteasomal activity were increased by carnitine, excluding that protein degradation pathways, such as autophagy or proteasomal degradation, are involved in the protective carnitine effects.

In conclusion, carnitine supplementation prevents the reduction of survival caused by glucose in *C. elegans* in dependence on a nuclear hormone receptor which displays high homologies to the vertebrate peroxisomal proliferator activated receptors.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

L-carnitine or 3-hydroxy-4-N,N,N-trimethylaminobutyric acid is essential for the normal function of all tissues [1]. Its endogenous synthesis in mammals starts from lysosomal proteolysis and the threefold N-methylation of lysine in lysosomes especially of liver and kidney [2]. As a member of the carnitine shuttle system carnitine is essential for the translocation of long-chain fatty acids into mitochondria for  $\beta$ -oxidation [3]. Moreover, carnitine is also

necessary for the efflux of acetyl and acyl groups out of the mitochondria in the case that substrate oxidation exceeds the energy demand, and therefore, accumulating acyl-CoA intermediates are converted back to acylcarnitines that are transported out of mitochondria and cells [1,4]. Interestingly, there appears to exist a link between carnitine deficiency in developing mitochondrial dysfunction and insulin resistance during states of chronic metabolic stress as is the case in obesity or aging [5,6]. In addition, the carnitine-dependent removal of mitochondrial acetyl-CoA releases the inhibition of pyruvate-dehydrogenase and enables thereby pyruvate utilization with the free mitochondrial CoA, allowing an increased oxidation rate, as was demonstrated in the heart [7] and also in peripheral tissues [8]. It is reasonable to suggest that the latter effects become prominent in cells which display an unrestricted glucose uptake in diabetes mellitus, such as endothelial cells [9], pericytes [10], neurons [11], and glomerular cells [12], and that carnitine supplementation might be required in order to adapt to the increased requirements. Indeed, previous studies have

**Abbreviations:** LTR, LysoTracker<sup>®</sup> Red; NGM, nematode growth medium; PPAR, peroxisome proliferator activated receptor; ROS, reactive oxygen species; RNAi, RNA-interference; Suc-LLVY-AMC, succinyl-leucyl-leucyl-valine-aminomethylcoumarine.

\* Corresponding author. Fax: +49 6419939229.

**E-mail addresses:** [Dorothe.J.Deusing@ernaehrung.uni-giessen.de](mailto:Dorothe.J.Deusing@ernaehrung.uni-giessen.de) (D.J. Deusing), [m.beyrer@web.de](mailto:m.beyrer@web.de) (M. Beyrer), [Elena.Fitzenberger@ernaehrung.uni-giessen.de](mailto:Elena.Fitzenberger@ernaehrung.uni-giessen.de) (E. Fitzenberger), [uwe.wenzel@ernaehrung.uni-giessen.de](mailto:uwe.wenzel@ernaehrung.uni-giessen.de) (U. Wenzel).

shown that carnitine supplementation in pharmacological doses improved glucose tolerance in humans and animals [1,13]. However, besides the described effects of carnitine on glucose and fatty acid metabolism, anti-oxidative activities, mitochondrial biogenesis but also adverse effects at higher doses have to be considered [14,15].

In previous studies we have shown that the *mev-1* mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans* provides a valid model to study the molecular mechanisms of glucose-induced toxicity which finally was evaluated according to the survival of the nematodes under heat-stress [16]. Moreover, we have identified several mechanisms linked to proteostasis, the biological machinery controlling the folding and degradation thus the functionality of proteins within a cell, which has to be necessarily activated through quercetin [17] or plant extracts [18] in order to enable those interventions to compensate the survival reduction as caused by glucose.

In the present study we used the *C. elegans mev-1* mutant in order to investigate whether carnitine is able to prevent the reduction of survival caused by the application of glucose. RNA-interference (RNAi) was accomplished to assess the contribution of single candidate genes on those effects. Moreover, the formation of lysosomes was quantified and the chymotrypsin-like activities were estimated in order to unravel whether autophagosomal and proteasomal degradation pathways were involved in carnitine mediated effects, respectively.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

SYTOX green nucleic acid stain was obtained from Life Technologies (Karlsruhe, Germany). L-Carnitine inner salt, Suc-LLVY-AMC and all other materials used were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany).

### 2.2. Strains and maintenance

*C. elegans* TK22 *mev-1(kn1)* and *E. coli* OP50 were obtained from *C. elegans* Genetics Center (CGC, University of Minnesota, USA). Nematodes were maintained on nematode growth medium (NGM) agar plates seeded with *E. coli* OP50 at 20 °C according to standard protocols [19]. For all experiments synchronous populations were used that were obtained by bleaching [20]. Synchronous nematodes were raised in liquid culture using NGM liquid blended with *E. coli* OP50 or an appropriate RNAi clone [20]. Carbenicillin was added to the NGM liquid in order to inactivate *E. coli*. A volume of 46 µL of NGM liquid was dispensed in each well of a 96-well microplate, to which 10 µL M9 buffer containing ten synchronized L1 larvae were added. L1 larvae were maintained shaking at 20 °C and reached the adult stage within 3 days. Nematodes were treated with effectors at the young adult stage for 48 h.

*E. coli* HT115 RNAi clones were purchased from Source Bioscience (Cambridge, UK) and included a negative control (L4440), *sir-2.1* (R11A8.4), *daf-12* (F11A1.3), and *ubq-1* (F25B5.4). The RNAi clone *gbh-2* (M05D6.7) was from *C. elegans* ORF-RNAi library [21].

### 2.3. Glucose and carnitine treatment

A 1 M glucose solution and a 10 mM carnitine solution were prepared in M9 buffer. This was diluted with M9 buffer for a 100 mM glucose working solution and a 1 mM carnitine working solution, respectively. When nematodes had reached the young adult stage, 7 µL of glucose working solution or in addition 7 µL of carnitine working solution were added to the media. M9 buffer was

added in equivalent amounts to the control. After 48 h incubation, worms were prepared for measurement.

### 2.4. RNAi experiments

RNAi experiments were performed in liquid cultures as described [22]. In brief, expression of gene-specific dsRNA in the corresponding RNAi bacterial strain was induced with 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside for 4 h at 37 °C. Subsequently bacteria cells were washed and resuspended in NGM liquid added with 40 µg/ml kanamycin to inactivate *E. coli* HT115. A volume of 10 µL M9-buffer containing 10 synchronized L1 larvae was dispensed into each well of a 96-well-plate to which 46 µL of *E. coli* HT115 NGM suspension were added. For preparations of nematodes in order to determine proteasomal activity ten-fold increased approaches were set up in 24-well-plates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). In general, L1 larvae reached the adult stage within 3 days of incubation with agitation at 20 °C before they were treated with effectors for 48 h (see Section 2.3).

### 2.5. Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from 10,000 worms using Trizol. One-step-real-time PCR reactions were performed in triplicate using 1 µL of RNA template (10 ng/µL), Brilliant II SYBR Green QRT-PCR Mastermix and appropriate primers in a CFXTM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, München, Germany). Cycling conditions were 1 × [15 min 50 °C], 1 × [10 min 95 °C], 40 × [30 s 95 °C, 15 s 52 °C, 30 s 60 °C], 1 × [1 min 95 °C], 1 × [30 s 52 °C–95 °C]. Changes in target gene expression were calculated according to Pfaffl [23] using equation  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . For determination of RNAi efficiency unique primer pairs (Eurofin MWG Operon, Ebersberg, Germany) recognizing only cDNA derived from endogenous mRNA were designed to avoid cross-reaction with genomic DNA and bacterially generated dsRNA and were as follows: *18S-rRNA* fw-5'-ATG GTT GCA AAG CTG AAA CT-3', *18S-rRNA* rev-5'-TCC CGT GTT GAG TCA AAT TA-3'; *sir-2.1* fw-5'-GAC AAA GAA CAG AAA GTA CAA CCA G-3', *sir-2.1* rev-5'-GGA GTG GCA CCA TCA TCA AG-3'; *daf-12* fw-5'-CAA CGT GGA TGA TAT GTT TG-3', *daf-12* rev-5'-GAA GAA ACC GAA GAA CTC TA-3'; *ubq-1* fw-5'-GCG TCT TAT CTT TGC TGG-3', *ubq-1* rev-5'-GAG CAC CAA GTG GAG AG-3'; *gbh-2* fw-5'-ACGGCGTAGAAGGAACATCA-3', *gbh-2* rev-5'-AGGTTCTGCTGAAA-GATGGA-3'. For each sample the fold change in the target gene was normalized to *18S rRNA* and relative to the expression in the vector control, which was fed on L4440 bacteria. Relative mRNA levels in nematodes cultured on RNAi bacteria were significantly lower ( $p < 0.01$ ) than mRNA levels of the vector control and were below 0.25 for all genes tested.

### 2.6. Survival at 37 °C

Lifespan analysis under heat stress conditions (37 °C) was performed 48 h after the addition of effectors as previously described [24]. In brief, nematodes were washed off the wells with M9-buffer/Tween<sup>®</sup>20 into 15 ml tubes followed by additional three washing steps. In each well of a black 384-well low-volume microtiter plate (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) 6.5 µL M9-buffer/Tween<sup>®</sup>20 (1% v/v) solution were added. Subsequently one nematode was dispensed in 1 µL M9-buffer/Tween<sup>®</sup>20 into each well and mixed with 7.5 µL SYTOX green (final concentration 1 µM, Life Technologies, Karlsruhe, Germany). To prevent water evaporation the plates were sealed with Rotilab sealing film and covered with a lid (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). The induction of heat shock (37 °C) and the measurement of fluorescence were done with a Fluoroskan Ascent microtiter plate reader (Thermo



Labsystems, Bonn, Germany) every 30 min. To detect SYTOX green fluorescence, excitation wavelength was set to 485 nm and emission was measured at 538 nm.

To determine the survival time for each nematode an individual fluorescence curve was generated. Time of death was defined as one hour after an increase in fluorescence over the baseline level. From the individual times of death Kaplan–Meier survival curves were drawn.

### 2.7. Staining of lysosomes

The formation of lysosomes was quantified using the low molecular weight fluorescent dye LysoTracker<sup>®</sup> Red DND-99 (LTR; Life Technologies, Schwerte, Germany), that specifically accumulates in acidic organelles [25]. In brief, synchronized young adult nematodes were incubated with LTR (final concentration 2  $\mu$ M) for 48 h simultaneously with the effectors. For epifluorescence microscopy (EVOS fl digital fluorescence microscope, AMG, Bothell, USA) worms were washed subsequently and anaesthetized by addition of 2 mM levamisole. LTR was visualized using the EVOS LED light cube RFP with an excitation at  $531 \pm 40$  nm and an emission at  $593 \pm 40$  nm. Images were taken at tenfold magnification and the quantification of fluorescence intensity was done using ImageJ (National Institute of Health, NIH).

### 2.8. Chymotrypsin-like proteasomal activity

For protein extraction nematodes were treated with lysis buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT) and frozen at  $-80$  °C. After homogenization with Peqlab Precellys 24-Dual the concentration of solubilized proteins was determined by the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Munich, Germany). Quantification of specific chymotrypsin-like proteasome activity was done by a fluorogenic peptide substrate assay as described [26]. In brief, the solubilized proteins were incubated with Suc-LLVY-AMC (final concentration 140  $\mu$ M, Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) in proteasome activity assay buffer (50 mM HEPES pH7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM ATP) at room temperature. The fluorescence intensity was measured in triplicate over 3 h every 10 min with excitations at 355 nm and emissions at 460 nm, using a Fluoroskan Ascent microtiter plate reader (Thermo Labsystems, Bonn, Germany). To determine the specific proteasome activity, the average activity measured in the presence of proteasome inhibitor MG132 (final concentration 10  $\mu$ M; Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany) was subtracted from activities due to overall fluorogenic peptide cleavage.

### 2.9. Calculations and statistics

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Log rank test was performed to compare survival rates with p values  $<0.05$  being significant. For group comparisons Analysis of Variance (ANOVA) was performed. Following ANOVA, differences between groups were determined by Bonferroni–Holm multiple comparison test. Results are presented as means  $\pm$  SD.

## 3. Results

### 3.1. Carnitine extends the survival of glucose-treated *mev-1* nematodes

As demonstrated previously, the addition of 10 mM glucose to the NGM reduced the survival time of *mev-1* nematodes significantly (Fig. 1). Here we show that carnitine at a concentration of

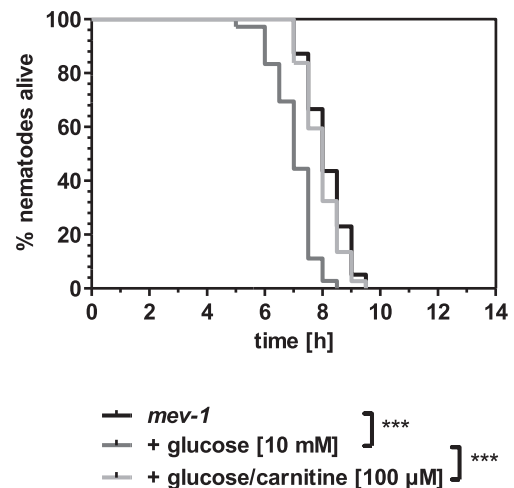
100  $\mu$ M was able to prevent the survival reduction induced by 10 mM glucose completely (Fig. 1).

### 3.2. The effects of carnitine on survival are dependent on *daf-12* but independent of *sir-2.1* and carnitine biosynthesis

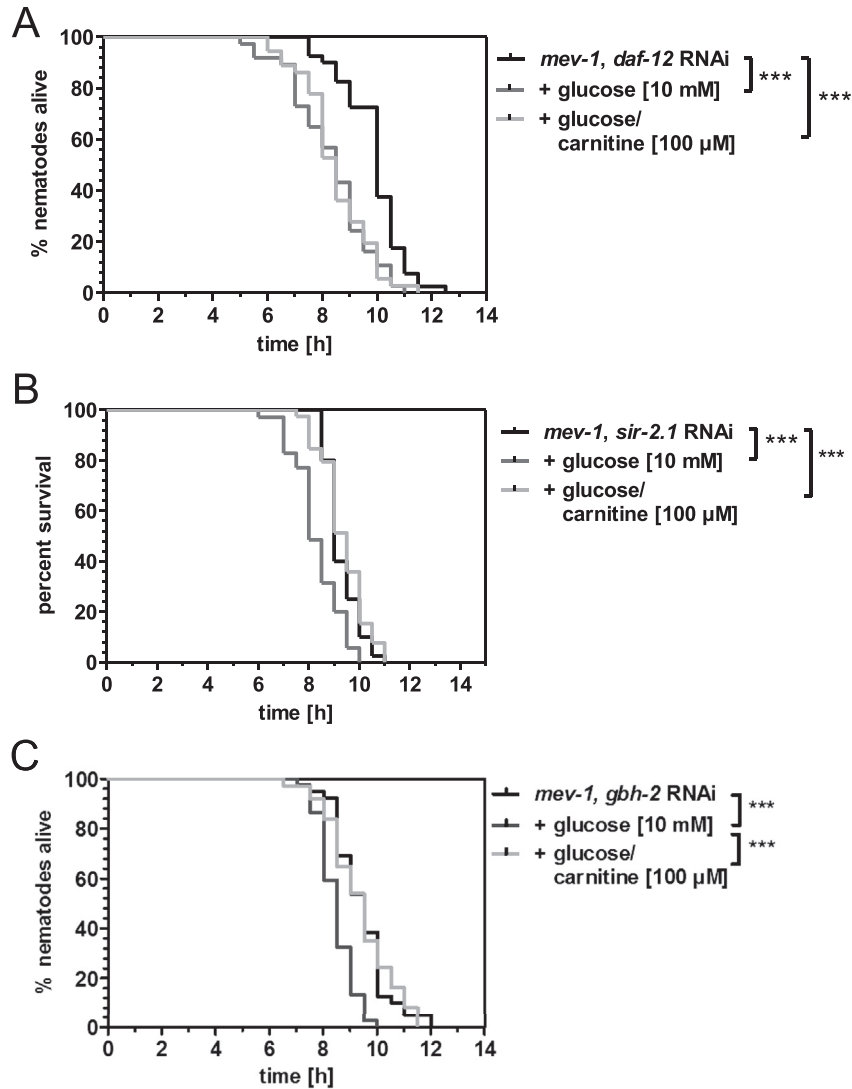
Since it was previously shown by us that the polyphenol quercetin compensates the glucose-induced reduction of survival depending on the transcription factors *sir-2.1* and *daf-12*, we tested here whether carnitine triggers the same signaling pathways as the polyphenol. Knockdown of the nuclear hormone receptor *daf-12* not only led to a high sensitivity of nematodes versus the addition of glucose but also prevented the survival extending effects of carnitine under simultaneous glucose exposure (Fig. 2A). In contrast, knockdown of *sir-2.1* was not able to prevent the survival extension caused by carnitine in *mev-1* mutants (Fig. 2B). In order to investigate whether carnitine synthesis contributes in any way to the survival extension caused by exogenous carnitine we performed RNAi for *gbh-2*, which encodes an ortholog of human gamma butyrobetaine hydroxylase 2. As shown in Fig. 2C, the knockdown of *gbh-2* did not prevent the carnitine-induced rescue of lifespan at 37 °C, indicating that carnitine biosynthesis does not contribute to the effects of exogenous carnitine.

### 3.3. Protein degradation pathways are not involved in the survival extension by carnitine

Since we have described previously that activation of the proteasome is crucial for the extension of survival in glucose-treated *mev-1* mutants by quercetin, we assessed in the present study the impact of carnitine on chymotrypsin-like proteasomal activity. This activity was reduced due to the addition of glucose but was further reduced by simultaneous carnitine application (Fig. 3A). Moreover, the extent of lysosomes as a measure of subsided autophagy, increased in the presence of glucose but was under these conditions not affected by applying in addition carnitine (Fig. 3B). In accordance with the resulting conclusion that the proteasome does not play a role for the carnitine effects on survival extension in the presence of glucose, *daf-12* RNAi did not display any influence on proteasomal activity (data not shown).



**Fig. 1.** Carnitine extends the survival of *C. elegans mev-1* mutants under glucose exposure. Treatment of nematodes with 10 mM glucose for 48 h decreases the survival of *mev-1* mutants under subsequently applied heat-stress at 37 °C. Additional application of 100  $\mu$ M L-carnitine prevents the glucose-induced reduction of survival completely.



**Fig. 2.** Knockdown of *daf-12* prevents the survival rescue by carnitine. RNAi for *daf-12* as accomplished by feeding HT115 RNAi bacteria from the L1 stage on, prevented the extension of survival by 100 μM carnitine in glucose treated *mev-1* nematodes (A). RNAi for *sir-2.1* did not display any effects on the survival extension caused by carnitine in glucose exposed *mev-1* (B). Likewise did the knockdown of *gbh-2* not affect the effects of carnitine on survival extension (C). Vector controls did not display significant differences of survival compared to RNAi for *daf-12*, *sir-2.1* or *gbh-2*, respectively, and are not shown for reasons of clarity.

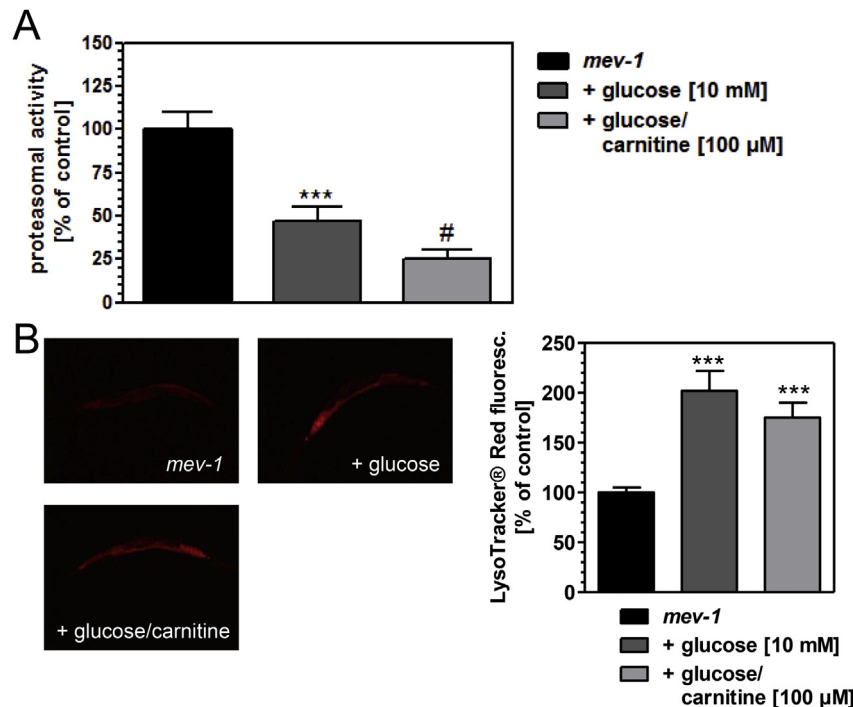
#### 4. Discussion

L-carnitine is an essential part of the carnitine shuttle that is necessary to import fatty acids into mitochondria in order to enable their  $\beta$ -oxidation [27]. Moreover, by providing a pool for acetyl-CoA it decreases the acetyl-CoA/CoA ratio in the mitochondrial matrix and thereby releases the product inhibition of the pyruvate dehydrogenase complex [1,28]. This has been finally shown to enable an increased glucose oxidation which is able to explain the improved glucose homeostasis and insulin-sensitivity observed in diabetic patients treated with carnitine [29].

In the model organism *C. elegans* used in the present study, carnitine applied at a concentration of 100 μM was able to completely prevent the reduction of survival caused by the addition of 10 mM glucose. Glucose concentrations were set in order to achieve levels in the nematodes which represent diabetes relevant concentrations of about 8 mM [30], whereas carnitine concentrations of 100 μM represent human plasma levels after exogenous carnitine administration [31]. Since we have found in our previous

study that the polyphenol quercetin protects *mev-1* nematodes to the same extent as carnitine depending on *sir-2.1* and the nuclear hormone receptor *daf-12*, we tested the influence of those factors also in the present study. Interestingly, the survival extending effects of carnitine were completely independent of the sirtuin activity. *Daf-12*, however, proved essential in order to allow carnitine to exert its stress-resistance enhancing effects. It has been described, that DAF-12 interacts with the *C. elegans* forkhead transcription factor, DAF-16, paralleling the interaction between PPAR- $\gamma$  and Foxo1 in mammals [32]. However, so far there is only very little information about the functional convergence of the nematode Foxo-1 homolog DAF-16 and PPAR- $\gamma$  homolog DAF-12 and although the mammalian factors antagonize each other, our previous study showed that the effects of quercetin were dependent on *daf-12* but independent of *daf-16* [17].

Interestingly, activity of the proteasome, which was increased due to exposure to quercetin [18], was not only inhibited by glucose, as described also in diabetic mice [33], but even more by carnitine. An inhibition of the proteasome has been described for



**Fig. 3.** Protein degradation pathways are not involved in the survival extension caused by carnitine. Chymotrypsin-like proteasomal activity was estimated according to the cleavage of Suc-LLVY-AMC in the absence and presence of the proteasome inhibitor MG132 as described in the Methods section. Proteasomal activity was significantly reduced by glucose and a further reduction was observed after additional application of carnitine (A). In contrast, the extent of lysosomes, as determined by LysoTracker® Red fluorescence, was increased by glucose whereas the simultaneous application of carnitine had no further effect (B). \*\*\* $p < 0.001$  versus the control, # $p < 0.05$  versus glucose treated *mev-1*.

carnitine also in the skeletal muscle of rats [34] and let us therefore suggest that carnitine increases the stress-resistance independent of the proteasomal activity. A second important pathway for protein degradation is autophagy which finally results in the formation of lysosomes in order to eliminate aggregated proteins, damaged organelles, and intracellular pathogens [35]. Glucose application markedly increased the formation of lysosomes, probably in order to degrade increasingly accumulating and aggregating non functional proteins. The triggering of this pathway, however, seems not to be beneficial for glucose treated nematodes, since blocking it prevents glucose toxicity by enhancing simultaneously proteasomal degradation [16]. Independent of the significance of autophagy for glucose mediated survival reduction, this pathway was found not to be affected by carnitine here.

Although the exact mechanisms through which carnitine affects stress-resistance and thereby survival in *C. elegans* have to be unraveled, it is suggested that DAF-12 and PPAR- $\gamma$  share functional homologies, such as the regulation of various genes involved in glucose homeostasis [36]. The fact that decreased binding of PPAR- $\gamma$  to the *cis*-acting PPAR-response element of several target genes with functions in glucose metabolism has been demonstrated fits into such a concept [37]. Finally, likewise to PPAR- $\gamma$ , DAF-12 could stimulate the biosynthesis of carnitine by increasing the expression of  $\gamma$ -butyrobetaine dioxygenase, the key enzyme in carnitine biosynthesis pathway [38]. Those effects, however were not relevant for the survival extension by exogenous carnitine in the present study since it remained unaltered after the knockdown of  $\gamma$ -butyrobetaine dioxygenase. Alternatively, the increased expression level of OCTN2, the transporter mediating cellular carnitine uptake, could explain the dependence of the carnitine effects on the PPAR- $\gamma$  homologue DAF-12 [39]. Our studies show that carnitine supplementation is able to enhance the resistance against heat-stress and thereby to increase the survival of *mev-1* nematodes. The nuclear

hormone receptor DAF-12 was identified as a key factor mediating those effects.

#### Conflict of interest

None.

#### Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.101>.

#### References

- [1] R. Ringseis, J. Keller, K. Eder, Role of carnitine in the regulation of glucose homeostasis and insulin sensitivity: evidence from in vivo and in vitro studies with carnitine supplementation and carnitine deficiency, *Eur. J. Nutr.* 51 (2012) 1–18.
- [2] F.M. Vaz, R.J. Wanders, Carnitine biosynthesis in mammals, *Biochem. J.* 361 (2002) 417–442.
- [3] J. Kerner, C. Hoppel, Fatty acid import into mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 1486 (2000) 1–17.
- [4] S. Violante, L. Ijlst, H. Te Brinke, I. Tavares de Almeida, R.J. Wanders, F.V. Ventura, S.M. Houten, Carnitine palmitoyltransferase 2 and carnitine/acylcarnitine translocase are involved in the mitochondrial synthesis and export of acylcarnitines, *FASEB J.* 27 (2013) 2039–2044.
- [5] T.R. Koves, J.R. Ussher, R.C. Noland, D. Slentz, M. Mosedale, O. Ilkayeva, J. Bain, R. Stevens, J.R. Dyck, C.B. Newgard, G.D. Lopaschuk, D.M. Muoio, Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance, *Cell. Metab.* 7 (2008) 45–56.
- [6] R.C. Noland, T.R. Koves, S.E. Seiler, H. Lum, R.M. Lust, O. Ilkayeva, R.D. Stevens, F.G. Hegardt, D.M. Muoio, Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 22840–22852.
- [7] T.L. Broderick, H.A. Quinney, G.D. Lopaschuk, Carnitine stimulation of glucose oxidation in the fatty acid perfused isolated working rat heart, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 3758–3763.



- [8] B. Capaldo, R. Napoli, P. Di Bonito, G. Albano, L. Sacca, Carnitine improves peripheral glucose disposal in non-insulin-dependent diabetic patients, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 14 (1991) 191–195.
- [9] T.T. Rajah, A.L. Olson, P. Grammas, Differential glucose uptake in retina- and brain-derived endothelial cells, *Microvasc. Res.* 62 (2001) 236–242.
- [10] M. Wakisaka, M. Yoshinari, S. Nakamura, T. Asano, K. Sonoki, A. Shi, M. Iwase, Y. Takata, M. Fujishima, Suppression of sodium-dependent glucose uptake by captopril improves high-glucose-induced morphological and functional changes of cultured bovine retinal pericytes, *Microvasc. Res.* 58 (1999) 215–223.
- [11] G.G. Piroli, C.A. Grillo, M.J. Charron, B.S. McEwen, L.P. Reagan, Biphasic effects of stress upon GLUT8 glucose transporter expression and trafficking in the diabetic rat hippocampus, *Brain Res.* 1006 (2004) 28–35.
- [12] D.A. Moutzouris, P.V. Kitsiou, A.A. Talamagas, G.I. Drossopoulou, T.I. Kassimatis, N.K. Katsilambros, Chronic exposure of human glomerular epithelial cells to high glucose concentration results in modulation of high-affinity glucose transporters expression, *Ren. Fail.* 29 (2007) 353–358.
- [13] S.D. Galloway, T.P. Craig, S.J. Cleland, Effects of oral L-carnitine supplementation on insulin sensitivity indices in response to glucose feeding in lean and overweight/obese males, *Amino Acids* 41 (2011) 507–515.
- [14] M. Dambrova, E. Liepinsh, Risks and benefits of carnitine supplementation in diabetes, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 123 (2015) 95–100.
- [15] T. Valero, Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches, *Curr. Pharm. Des.* 20 (2014) 5507–5509.
- [16] E. Fitzenberger, M. Boll, U. Wenzel, Impairment of the proteasome is crucial for glucose-induced lifespan reduction in the mev-1 mutant of *Caenorhabditis elegans*, *Biochim. Biophys. Acta* 1832 (2013) 565–573.
- [17] E. Fitzenberger, D.J. Deusing, C. Marx, M. Boll, K. Lüersen, U. Wenzel, The polyphenol quercetin protects the mev-1 mutant of *Caenorhabditis elegans* from glucose-induced reduction of survival under heat-stress depending on SIR-2.1, DAF-12, and proteasomal activity, *Mol. Nutr. Food Res.* 58 (2014) 984–994.
- [18] E. Fitzenberger, D.J. Deusing, A. Wittkop, A. Kler, E. Kriesl, B. Bonnländer, U. Wenzel, Effects of plant extracts on the reversal of glucose-induced impairment of stress-resistance in *Caenorhabditis elegans*, *Plant Foods Hum. Nutr.* 69 (2014) 78–84.
- [19] S. Brenner, The genetics of *Caenorhabditis elegans*, *Genetics* 77 (1974) 71–94.
- [20] T. Stiernagel (Ed.), Maintenance of *C. elegans*, WormBook, The C. elegans Research Community, WormBook, vol. 11, 2006, pp. 1–11.
- [21] J.F. Rual, J. Ceron, J. Koreth, T. Hao, A.S. Nicot, T. Hirozane-Kishikawa, J. Vandenhaute, S.H. Orkin, D.E. Hill, S. van den Heuvel, M. Vidal, Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library, *Genome Res.* 14 (2004) 2162–2168.
- [22] B. Lehner, J. Tischler, A.G. Fraser, RNAi screens in *Caenorhabditis elegans* in a 96-well liquid format and their application to the systematic identification of genetic interactions, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 1617–1620.
- [23] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e45.
- [24] M.S. Gill, A. Olsen, J.N. Sampayo, G.J. Lightgow, An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Free Radic. Biol. Med.* 35 (2003) 558–565.
- [25] A. Pierzyńska-Mach, P.A. Janowski, J.W. Dobrucki, Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles, *Cytom. A* 85 (2014) 729–737.
- [26] J. Pispa, S. Palmén, C.I. Holmberg, J. Jäntti, *C. elegans* dss-1 is functionally conserved and required for oogenesis and larval growth, *BMC Dev. Biol.* 8 (2008) 51.
- [27] S. Violante, L. Ijlst, J. Ruiter, J. Koster, H. van Lenthe, M. Duran, I.T. de Almeida, R.J. Wanders, S.M. Houten, F.V. Ventura, Substrate specificity of human carnitine acetyltransferase: implications for fatty acid and branched-chain amino acid metabolism, *Biochim. Biophys. Acta* 1832 (2013) 773–779.
- [28] G. Uziel, B. Garavaglia, S. Di Donato, Carnitine stimulation of pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) in isolated human skeletal muscle mitochondria, *Muscle Nerve* 11 (1988) 720–724.
- [29] G. Mingrone, A.V. Greco, E. Capristo, G. Benedetti, A. Giancaterini, A. De Gaetano, G. Gasbarrini, L-carnitine improves glucose disposal in type 2 diabetic patients, *J. Am. Coll. Nutr.* 18 (1999) 77–82.
- [30] A. Schlotterer, G. Kukudov, F. Bozorgmehr, H. Hutter, X. Du, D. Oikonomou, Y. Ibrahim, F. Pfisterer, N. Rabbani, P. Thornalley, A. Sayed, T. Fleming, P. Humpert, V. Schwenger, M. Zeier, A. Hamann, D. Stern, M. Brownlee, A. Bierhaus, P. Nawroth, M. Morcos, *C. elegans* as model for the study of high glucose-mediated life span reduction, *Diabetes* 58 (2009) 2450–2456.
- [31] E. Ferrannini, G. Buzzigoli, S. Bevilacqua, C. Boni, D. Del Chiaro, M. Oleggini, L. Brandi, F. Maccari, Interaction of carnitine with insulin-stimulated glucose metabolism in humans, *Am. J. Physiol.* 255 (1988) E946–E952.
- [32] P. Dowell, T.C. Otto, S. Adi, M.D. Lane, Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Foxo1 signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 45485–45491.
- [33] M.A. Queisser, D. Yao, S. Geisler, H.P. Hammes, G. Lochner, E.D. Schleicher, M. Brownlee, K.T. Preissner, Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal, *Diabetes* 59 (2010) 670–678.
- [34] J. Keller, A. Couturier, M. Haferkamp, E. Most, K. Eder, Supplementation of carnitine leads to an activation of the IGF-1/PI3K/Akt signalling pathway and down regulates the E3 ligase MuRF1 in skeletal muscle of rats, *Nutr. Metab. (Lond.)* 10 (2013) 28.
- [35] Y. Feng, D. He, Z. Yao, D.J. Klionsky, The machinery of macroautophagy, *Cell Res.* 24 (2014) 24–41.
- [36] J. Berger, D.E. Moller, The mechanisms of action of PPARs, *Annu. Rev. Med.* 53 (2002) 409–435.
- [37] E.S. Kim, F. Isoda, I. Kurland, C.V. Mobbs, Glucose-induced metabolic memory in Schwann cells: prevention by PPAR agonists, *Endocrinology* 154 (2013) 3054–3066.
- [38] R. Ringseis, G. Wen, K. Eder, Regulation of genes involved in carnitine homeostasis by PPAR $\alpha$  across different species (rat, mouse, pig, cattle, chicken, and human), *PPAR Res.* 2012 (2012) 868317.
- [39] G. D'Argenio, O. Petillo, S. Margarucci, A. Torpedine, A. Calarco, A. Koverech, A. Boccia, G. Paoletta, G. Peluso, Colon OCTN2 gene expression is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in humans and mice and contributes to local and systemic carnitine homeostasis, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 27078–27087.

## **B.5 Publikation 5**

**Eisermann DJ**, Wenzel U, Fitzenberger E. PEK-1 is crucial for hormesis induced by inhibition of the IRE-1/XBP-1 pathway in the *Caenorhabditis elegans mev-1* mutant. [submitted]

**PEK-1 is crucial for hormesis induced by inhibition of the  
IRE-1/XBP-1 pathway in the *Caenorhabditis elegans mev-1* mutant**

**Dorothe Jenni Eisermann · Uwe Wenzel · Elena Fitzenberger**

Molecular Nutrition Research, Interdisciplinary Research Center, Justus-Liebig-University of  
Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany.

Corresponding author at: Interdisciplinary Research Center, Justus-Liebig-University of  
Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany, Tel.: +49 6419939222,  
Fax: +49 6419939229; e-mail: elena.fitzenberger@ernaehrung.uni-giessen.de

**Keywords** proteostasis, unfolded protein response, proteasome, hormesis, *Caenorhabditis elegans*

**Abbreviations** ABU, activated in blocked unfolded protein response; ANOVA, analysis of variance; ATF-6, activating transcription factor 6; BiP, immunoglobulin binding protein; *C. elegans*, *Caenorhabditis elegans*; eIF2 $\alpha$ , eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ ; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER associated degradation; IRE-1, inositol requiring enzyme 1; PERK/PEK-1, protein kinase RNA-like ER kinase; RNAi, RNA interference; ROS, reactive oxygen species; Suc-LLVY-AMC, succinyl-leucyl-leucyl-valine-aminomethyl-coumarine; UPR, unfolded protein response; UPR<sup>ER</sup>, ER-specific UPR; UPS, ubiquitin-proteasome system; XBP-1, X-box binding protein 1

## Abstract

The accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) causes an imbalance of proteostasis and is related to many pathological conditions. In answer to this ER stress cells activate a network of three integrated signaling pathways consolidated as the unfolded protein response of the ER (UPR<sup>ER</sup>), which is also present in the stress-sensitive *Caenorhabditis elegans* mutant *mev-1*. Whereas inhibition of one of those pathways by RNA-interference (RNAi) versus *xbp-1* results in reduced survival of *mev-1* nematodes under heat stress, additional knockdown of the *xbp-1* splicing activator *ire-1* results in a PEK-1-dependent hormetic response. In contrast, increased survival under *ire-1/xbp-1* double RNAi was found to be independent of the presence of HSP-4, an UPR<sup>ER</sup>-specific chaperone, as evidenced under *ire-1/xbp-1/hsp-4* triple knockdown conditions. Moreover, *ire-1/xbp-1* double-RNAi significantly increased chymotrypsin-like proteasomal activity, which was completely blocked under additional RNAi versus *pek-1*.

In conclusion, we identified PEK-1 as a mediator of hormesis in the *mev-1* mutant of *C. elegans* which is induced by simultaneous inhibition of XBP-1 and its splicing activator IRE-1 and mediated through activation of the proteasome.

## 1. Introduction

Proteostasis is a complex network of protein quality control processes that ensure the maintenance and function of the proteome and thus provides an indispensable prerequisite for health and viability of the cell [1]. Endoplasmic reticulum (ER) stress, which results in the accumulation of misfolded proteins in the ER, is a common example of disturbed proteostasis. In answer to ER stress an adaptive response, the unfolded protein response of the ER (UPR<sup>ER</sup>), is activated in order to restore the proteostatic equilibrium [2]. The UPR<sup>ER</sup> is mediated by three parallel and partially complementary signaling pathways that regulate translation, chaperone expression and ER-associated degradation (ERAD) [3]. Each of these branches is controlled by an ER luminal sensor, i.e. PERK/PEK-1, IRE-1, and ATF-6. While PEK-1 is mainly responsible for global translation attenuation [4], ATF-6 is a transcription factor that activates the transcription of UPR genes [5]. IRE-1 is an ER transmembrane protein that catalyzes the splicing of *xbp-1* mRNA to initiate the generation of the active form of XBP-1 transcription factor [6]. The IRE-1/XBP-1 pathway in *C. elegans* is especially required for the metabolism of secreted proteins even during unstressed growth conditions [7] and for the proper localization of neuronal proteins [8]. Knockdown of *xbp-1* by RNA-interference (RNAi) leads to a reduced stress resistance in the nematode [9,10] and expression of a constitutively active form of XBP-1 was able to reverse age-onset loss of ER proteostasis [11]. Irrespective of the fact that *xbp-1* mRNA is a direct target of IRE-1 endonucleolytic activity and that processing is a precondition for the accumulation of activated *xbp-1* mRNA during the UPR [12], effects of IRE-1 on determination of germ cell fate, which are independent of its canonical downstream target *xbp-1*, have been described as well [13].

In the present study we investigated in how far the functional loss of IRE-1 affects the reduction of stress resistance observed under *xbp-1* RNAi. In order to identify downstream

targets responsible for the observed effects, *pek-1* and *hsp-4* were knocked down. Using a fluorogenic substrate proteasome activity was assessed, in order to correlate effects on stress resistance with activities of the ubiquitin-proteasome-system (UPS).

## 2. Methods and materials

### 2.1 Reagents

SYTOX green nucleic acid stain was obtained from Life Technologies (Karlsruhe, Germany). The Brilliant II SYBR Green QRT-PCR Master Mix Kit was purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, USA) and the Roti prep RNA MINI Kit was from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). The Bio-Rad Protein Assay was purchased from Bio-Rad (Munich, Germany) and the proteasome inhibitor MG-132 was from Calbiochem/Merck (Darmstadt, Germany). Suc-LLVY-AMC and all other materials used were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

### 2.2 Strains and maintenance

*Caenorhabditis elegans* TK22 *mev-1(kn1)* and SJ4005 *zcls4 [hsp-4p::GFP]* as well as *E. coli* OP50 were obtained from *C. elegans* Genetics Center (CGC, University of Minnesota, USA). Transgenic *C. elegans* nematodes expressing the *hsp-4p::gfp* transgene *zcls4* in the TK22 *mev-1* mutant were generated by crossing, as previously described [10]. Nematodes were maintained on liquid nematode growth medium as previously described [14].

*E. coli* HT115 RNAi clones from the *C. elegans* ORF-RNAi library [15] or Ahringer library [16] were obtained from Source Bioscience (Cambridge, UK) and included a negative control (L4440), *xbp-1* (R74.3), *ire-1* (C41C4.4), *pek-1* (F46C3.1) and *hsp-4* (F43E2.8).

### 2.3 RNAi experiments

In order to achieve a gene-specific knockdown, RNAi was performed by feeding *E. coli* RNAi clones expressing gene-specific dsRNA, as described before [14]. Knockdown of the corresponding genes was verified by qPCR. Relative mRNA levels in nematodes cultured on



RNAi bacteria were significantly lower ( $p < 0.01$ ) than mRNA levels of the vector control (L4440) and were below 0.32 for all genes and gene combinations tested.

#### *2.4 Quantitative real-time PCR*

Total RNA was extracted from 2500 worms using the Roti®-Prep RNA MINI Kit. One-step-real-time PCR reactions were performed in triplicate using 1  $\mu$ l of RNA template (10 ng/ $\mu$ l), the Brilliant II SYBR Green QRT-PCR Mastermix Kit and adequate primers in a Qiagen Rotor Gene-Q Real-time PCR Cycler (Hilden, Germany). Cycling conditions were 1 x 30 min 50 °C, 1 x 10 min 95 °C, 40 x [30 s 95 °C, 1 min 53 °C, 30 s 72 °C], 1 x 1 min 95 °C, 1 x [30 s 55 °C – 95 °C]. Changes in target gene expression were calculated according to Pfaffl [18] using equation  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . The fold change in the target gene was normalized to 18S rRNA and relative to the control expression for each sample. Primers used for qPCR were as follows: 18S-rRNA fw-5'-ATG GTT GCA AAG CTG AAA CT-3', 18S-rRNA rev-5'-TCC CGT GTT GAG TCA AAT TA-3', hsp-4-fw 5'-CGT TGA TTT TGA TTG CCT TC-3', hsp-4-rv 5'-TGA TTC TGT TTC CTT GAT CG-3', ire-1-fw 5'-GCT CTT CTC CTC TGT AAT TT-3', ire-1-rv 5'-ATC GTA AAA CAG GCT CTT C-3', xbp-1-fw 5'-ACG TAT TTA TGT GCT CCC AG-3', xbp-1-rev 5'-TAT CAT CGC CAA GAA GTT GT-3', pek-1-fw 5'-ATC CAT AAC AGA GCG ATG AT-3', pek-1-rv 5'-ATC CAA TCT TCA AGG GTC TT-3'.

#### *2.5 Survival analysis at 37°C*

Survival analysis under heat stress conditions was performed using a thermotolerance assay as previously described [14].

#### *2.6 Fluorescence microscopy*

Quantification of GFP-fluorescence was performed using the AMG EVOS fl digital fluorescence microscope (Bothell, USA). For epifluorescence microscopy nematodes were

washed twice with M9/Tween20 buffer and subsequently anaesthetized by addition of 2 mM levamisole. GFP fluorescence was analyzed using an EVOS GFP Light Cube with an excitation at 470/22 nm and an emission at 510/42 nm. Images were taken at tenfold magnification and the quantification of fluorescence intensity was done using ImageJ (National Institute of Health, NIH).

### *2.8 Chymotrypsin-like proteasomal activity*

The chymotrypsin-like proteasomal activity was quantified with the fluorogenic peptide substrate Suc-LLVY-AMC in absence and presence of the proteasome inhibitor MG-132 [14].

### *2.9 Calculations and statistics*

Statistical analyses were done with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Log rank test was performed to compare survival rates with p values < 0.05 being significant. Kaplan–Meier survival curves are shown for survival experiments. For group comparisons *t*-test or analysis of variance (ANOVA) was performed. Following ANOVA, differences between groups were determined by Bonferroni-Holm multiple comparison test. Results are presented as means  $\pm$  SD.

## Results

### 3.1 Knockdown of *ire-1* induces hormesis under *xbp-1* RNAi

We have previously shown that *xbp-1* RNAi leads to reduced survival of *C. elegans mev-1* mutants under heat stress [9]. Since the formation of the active XBP-1 transcription factor requires the splicing of *xbp-1* mRNA by IRE-1, we anticipated that loss of IRE-1 function should result in a reduction of survival just as *xbp-1* RNAi. Surprisingly, *ire-1* RNAi did not affect *C. elegans* lifespan at all (Fig. 1A). This result suggests an activation of a compensatory signaling mechanism to cope with loss of *ire-1*. The hormetic effect of *ire-1* RNAi was dominant over survival reduction due to *xbp-1* RNAi, as evidenced by the survival time in nematodes under *ire-1/xbp-1* double RNAi (Fig. 1B). This survival extension by *ire-1* RNAi prevails in spite of a smaller survival reduction by diluted *xbp-1* siRNA, which serves as the correct reference versus *ire-1/xbp-1* double RNAi (Fig. 1B).

### 3.2 The chaperone HSP-4 is dispensable for the hormetic effects of *ire-1* RNAi

Since HSP-4 is a chaperone which compensates for the functional loss of numerous ER chaperones in *C. elegans*, and because its compensatory upregulation is mediated via the IRE-1/XBP-1 signaling cascade, we speculated that vice versa the inhibition of IRE 1/XBP 1/HSP-4 signaling might induce the hormesis observed due to *ire-1/xbp-1* RNAi possibly by the upregulation of ER chaperones.

Whereas both *xbp-1* RNAi and *ire-1/xbp-1* double RNAi reduced *hsp-4* promoter activity (Fig. 2A) and *hsp-4* mRNA levels (Fig. 2B) to a similar degree in the *mev-1* mutant, *hsp-4* RNAi was not able to rescue the survival reduction caused by *xbp-1* RNAi (Fig. 2C).

### 3.3 PEK-1 activates the proteasome and mediates the hormetic effects of *ire-1/xbp-1* RNAi.

In order to investigate whether blocking the IRE-1/XBP-1 pathway by simultaneous knockdown of both factors activates a second important UPR<sup>ER</sup> pathway, we knocked down *pek-1*, coding for an ER luminal sensor responsible for translation attenuation.

Whereas *pek-1* RNAi did not affect the nematodes' survival (Fig. 3A), it prevented the survival extension caused by *ire-1/xbp-1* double RNAi (Fig. 3B). The obvious activation of PEK-1 due to *ire-1/xbp-1* double RNAi was not accomplished on the transcript level, as indicated by unaltered *pek-1* mRNA levels in *ire-1/xbp-1* RNAi treated *mev-1* (Fig. 3C).

Since we formerly found that activation of the proteasome is able to protect the nematodes against stress conditions, we looked at the impact of PEK-1 on proteasomal activities. RNAi for *xbp-1* reduced chymotrypsin-like proteasomal activity whereas additional knockdown of *ire-1* led to a twofold increase of proteasomal degradation versus the vector control (Fig. 3D). This increase in proteasomal activity by *ire-1/xbp-1* RNAi was completely blunted by the additional knockdown of *pek-1* (Fig. 3D).

#### 4. Discussion

The ER represents the functional environment for synthesis, folding and post-translational modification of secretory and membrane-associated proteins [1,2,19]. Synthesis and secretion of proteins in the ER are tightly regulated and depend on the capacity of protein folding and processing [20]. If the demands for protein folding overwhelm the capability of chaperones, ER stress is the result [1]. This is the case in several diseases, such as neurodegenerative diseases and diabetes [19]. Accordingly, a stringent control of ER functionality by the UPR<sup>ER</sup> is crucial to maintain ER homeostasis [20].

The IRE-1/XBP-1 signaling cascade represents the most conserved pathway within the UPR<sup>ER</sup>, regulating the transcription of genes involved for example in protein folding and the ERAD [6,21–23]. Although IRE-1 is responsible for splicing the *xbp-1* mRNA into a functional form [24,25], in the present study it was revealed that knockdown of *xbp-1* reduces the survival of stress-sensitive *mev-1* nematodes under heat stress, whereas *ire-1* knockdown did not. According to the function of IRE-1 it was moreover surprising that simultaneous RNAi for both factors prevented the reduction of survival caused by *xbp-1* RNAi.

Based on the fact that the chaperone HSP-4 is induced by the IRE-1/XBP-1 pathway and that increased HSP-4 expression compensates for the functional lack of numerous ER chaperones [26], we suggested that conversely the observed hormesis under *ire-1* RNAi might depend on the induction of ER chaperones when HSP-4 is repressed. However, we could not detect such a compensatory mechanism depending on HSP-4, since *hsp-4* knockdown was not able to prevent the survival reduction due to *xbp-1* RNAi.

Instead, a key factor for a second UPR<sup>ER</sup> pathway, namely PEK-1, was identified to mediate the hormetic effects of *ire-1* RNAi under knockdown of *xbp-1*. Hormesis observed with regard to survival of the nematodes under these conditions was reflected by an increase in proteasomal activities, which was completely blunted in the absence of functional PEK-1. In how far the ERAD is involved as an intermediate step between PEK-1 and the enhancement

of proteasomal degradation is currently unclear. However, it was demonstrated that NIH 3T3 fibroblasts contain a membrane-associated compartment in which substrates designated for degradation by the ERAD accumulate before they retranslocate to the cytosol [27]. This pericentriolar accumulation of ERAD-substrates depends on the mammalian PEK-1 homologue PERK [28] and provides the link between the ERAD and proteasomal degradation [29].

Since it has been shown in *C. elegans* that *xbp-1* mutants display a higher induction of *abu* genes under ER stress [30], it appeared also plausible that the encoded ABU proteins might be involved in the PEK-1 mediated hormesis. However, neither *abu-1* nor *abu-11* reduced the survival under *ire-1/xbp-1* RNAi (data not shown).

In conclusion, our studies show that inhibition of IRE-1 leads to hormetic survival extension in *mev-1* nematodes under functional absence of XBP-1. Those hormetic effects are mediated by enhanced activity of PEK-1, which is responsible for the increase in proteasomal degradation.

Figure 1: RNAi of *ire-1* inhibits survival reduction in response to *xbp-1* knockdown. Shown are Kaplan-Meier curves for survival of *mev-1* nematodes at 37°C as a response to *xbp-1* or *ire-1* RNAi (A) or the combination of both RNAi versus *xbp-1* RNAi (B).

**Fig. 1**

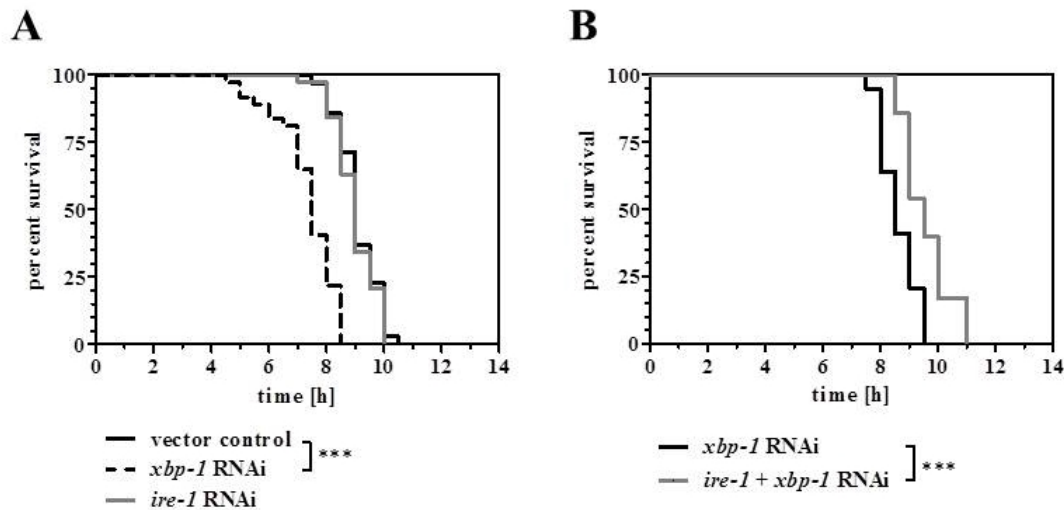


Figure 2: Reduced expression of HSP-4 does not compensate for functional loss of *xbp-1* in *mev-1* mutants. In *hsp-4p::gfp* transgenic *mev-1* nematodes, GFP expression was reduced to a similar degree by either *xbp-1* RNAi or *ire-1/xbp-1* double RNAi (A). On the left panel in (A) the fluorescence intensities are given whereas on the right panels fluorescence photographs of nematodes under the respective treatments are shown. Transcript levels for *hsp-4* were determined by quantitative RT-PCR with *18S-rRNA* as a reference gene (B). Survival analysis revealed that knockdown of *hsp-4* by RNAi does not affect the survival time under simultaneous *xbp-1* RNAi (C). \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  versus the vector control.

Fig. 2

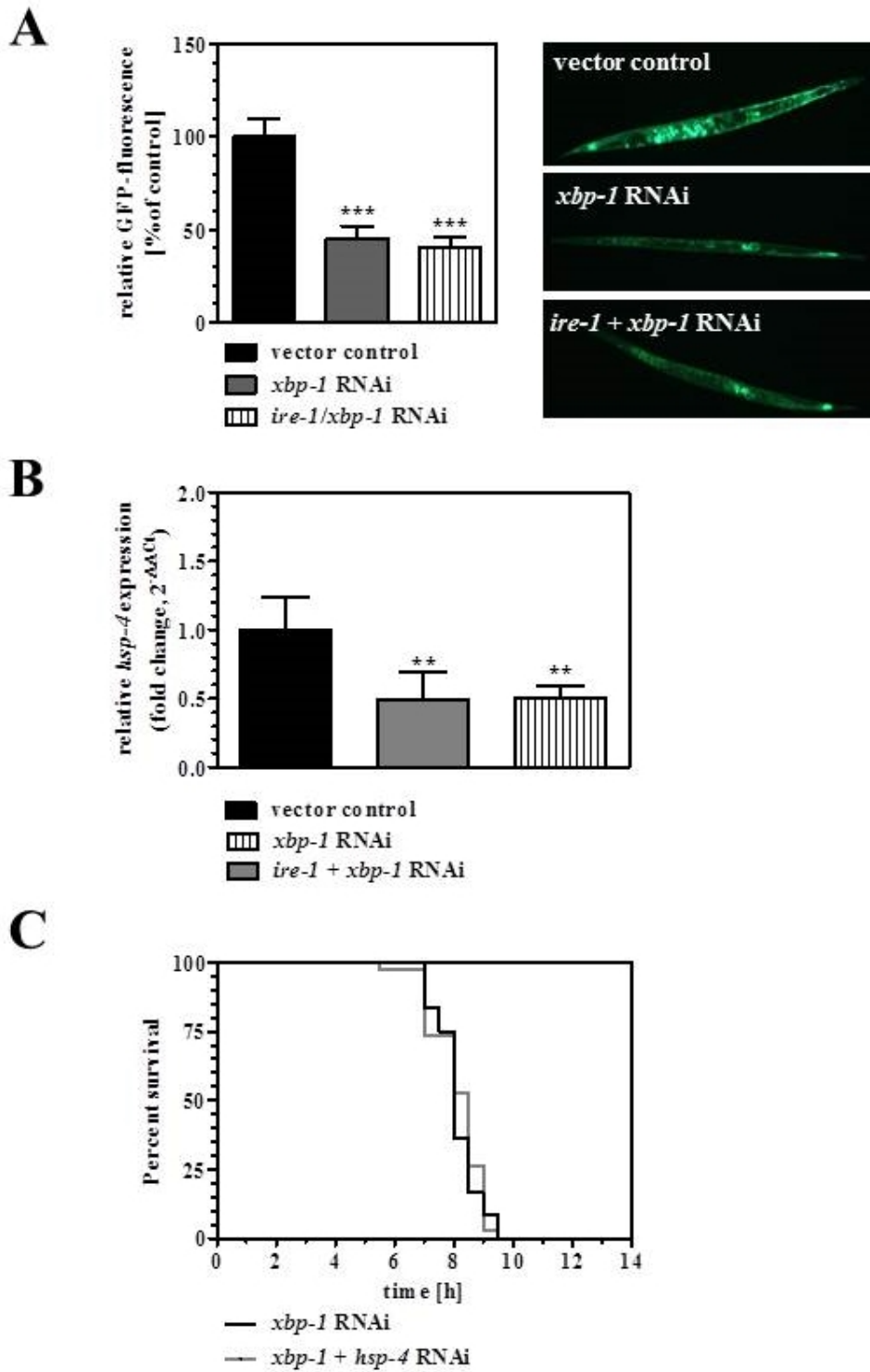
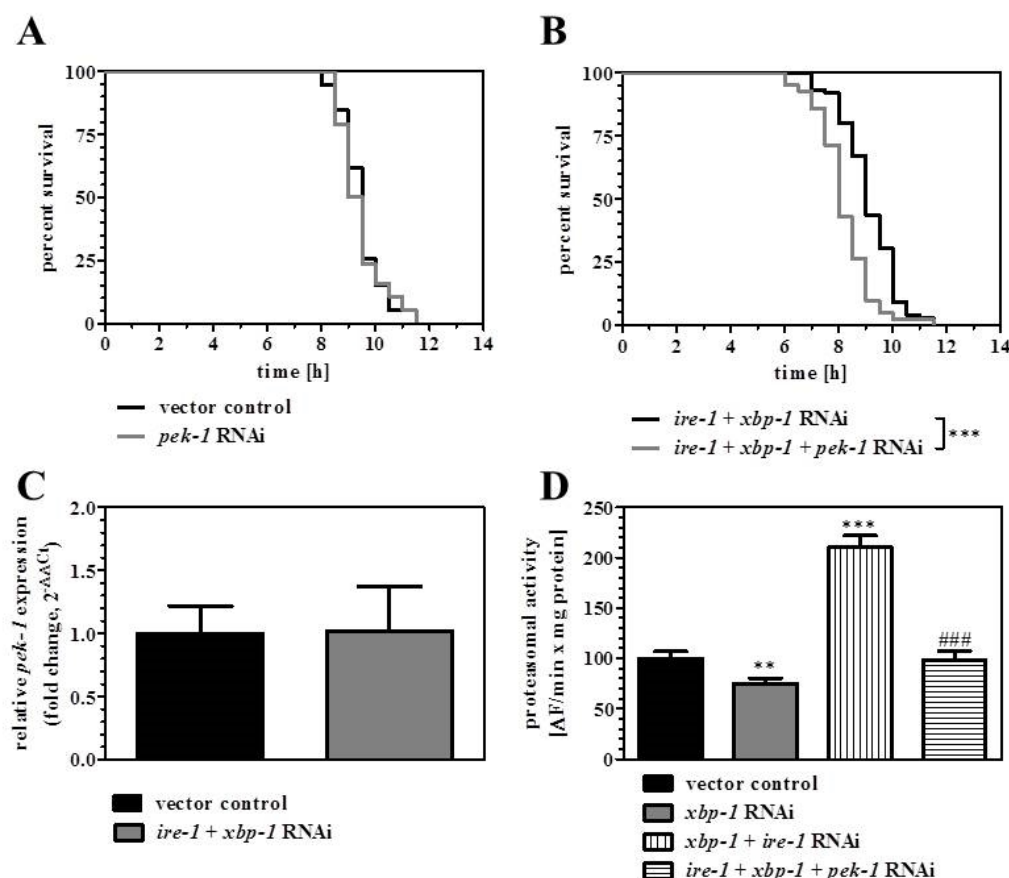




Figure 3: PEK-1 mediates lifespan extension and activation of the proteasome under simultaneous knockdown of *ire-1* and *xbp-1*. RNAi for *pek-1* did not influence the survival of *mev-1* nematodes (A), but prevented the survival enhancing effect of double RNAi for *ire-1* and *xbp-1* (B). *Pek-1* mRNA remained unaltered after *ire-1/xbp-1* knockdown (C). Proteasome activity, as assessed due to cleavage of the substrate Suc-LLVY-AMC in the presence and absence of the proteasome inhibitor MG123, was decreased by *xbp-1* RNAi but increased when in addition *ire-1* was knocked down (D). The *ire-1/xbp-1* induced increase in proteasome activity was blocked under *ire-1/xbp-1/pek-1* triple RNAi (D). \*\*p < 0.05, \*\*\* p < 0.001 versus the vector control, ### p < 0.001 versus *ire-1/xbp-1* RNAi.



## References

- [1] C. Hetz, E. Chevet, S.A. Oakes, Proteostasis control by the unfolded protein response, *Nat Cell Biol* 17 (2015) 829–838.
- [2] D.T. Rutkowski, R.J. Kaufman, A trip to the ER: coping with stress, *Trends Cell Biol* 14 (2004) 20–28.
- [3] J. Wu, R.J. Kaufman, From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response, *Cell Death Differ* 13 (2006) 374–384.
- [4] H.P. Harding, Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, D. Ron, Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response, *Mol Cell* 5 (2000) 897–904.
- [5] H. Yoshida, T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi, K. Mori, ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response, *Mol Cell Biol* 20 (2000) 6755–6767.
- [6] M. Schröder, R.J. Kaufman, The mammalian unfolded protein response, *Annu Rev Biochem* 74 (2005) 739–789.
- [7] M. Safra, S. Henis-Korenblit, A new tool in *C. elegans* reveals changes in secretory protein metabolism in *ire-1*-deficient animals, *Worm* 3 (2014) e27733.
- [8] T. Asakura, K.-i. Ogura, Y. Goshima, IRE-1/XBP-1 pathway of the unfolded protein response is required for properly localizing neuronal UNC-6/Netrin for axon guidance in *C. elegans*, *Genes Cells* 20 (2015) 153–159.
- [9] E. Fitzenberger, M. Boll, U. Wenzel, Impairment of the proteasome is crucial for glucose-induced lifespan reduction in the *mev-1* mutant of *Caenorhabditis elegans*, *Biochim Biophys Acta* 1832 (2013) 565–573.
- [10] E. Fitzenberger, D.J. Deusing, C. Marx, M. Boll, K. Lüersen, U. Wenzel, The polyphenol quercetin protects the *mev-1* mutant of *Caenorhabditis elegans* from glucose-

- induced reduction of survival under heat-stress depending on SIR-2.1, DAF-12, and proteasomal activity, *Mol Nutr Food Res* 58 (2014) 984–994.
- [11] R.C. Taylor, A. Dillin, XBP-1 is a cell-nonautonomous regulator of stress resistance and longevity, *Cell* 153 (2013) 1435–1447.
- [12] M. Calfon, H. Zeng, F. Urano, J.H. Till, S.R. Hubbard, H.P. Harding, S.G. Clark, D. Ron, IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA, *Nature* 415 (2002) 92–96.
- [13] M. Levi-Ferber, Y. Salzberg, M. Safra, A. Haviv-Chesner, H.E. Bülow, S. Henis-Korenblit, It's all in your mind: determining germ cell fate by neuronal IRE-1 in *C. elegans*, *PLoS Genet* 10 (2014) e1004747.
- [14] D.J. Deusing, M. Beyrer, E. Fitzenberger, U. Wenzel, Carnitine protects the nematode *Caenorhabditis elegans* from glucose-induced reduction of survival depending on the nuclear hormone receptor DAF-12, *Biochem Biophys Res Commun* 460 (2015) 747–752.
- [15] J.-F. Rual, J. Ceron, J. Koreth, T. Hao, A.-S. Nicot, T. Hirozane-Kishikawa, J. Vandenhaute, S.H. Orkin, D.E. Hill, van den Heuvel, Sander, M. Vidal, Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library, *Genome Res* 14 (2004) 2162–2168.
- [16] R.S. Kamath, A.G. Fraser, Y. Dong, G. Poulin, R. Durbin, M. Gotta, A. Kanapin, N. Le Bot, S. Moreno, M. Sohrmann, D.P. Welchman, P. Zipperlen, J. Ahringer, Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi, *Nature* 421 (2003) 231–237.
- [17] N. Ishii, M. Fujii, P.S. Hartman, M. Tsuda, K. Yasuda, N. Senoo-Matsuda, S. Yanase, D. Ayusawa, K. Suzuki, A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes, *Nature* 394 (1998) 694–697.
- [18] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res* 29 (2001) e45.

- [19] E. Lai, T. Teodoro, A. Volchuk, Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response, *Physiology (Bethesda, Md.)* 22 (2007) 193–201.
- [20] D. Scheuner, R.J. Kaufman, The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes, *Endocrine reviews* 29 (2008) 317–333.
- [21] D. Ron, P. Walter, Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response, *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007) 519–529.
- [22] S. Wang, R.J. Kaufman, The impact of the unfolded protein response on human disease, *J Cell Biol* 197 (2012) 857–867.
- [23] P. Walter, D. Ron, The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation, *Science* 334 (2011) 1081–1086.
- [24] N. Mimura, M. Fulciniti, G. Gorgun, Y.-T. Tai, D. Cirstea, L. Santo, Y. Hu, C. Fabre, J. Minami, H. Ohguchi, T. Kiziltepe, H. Ikeda, Y. Kawano, M. French, M. Blumenthal, V. Tam, N.L. Kertesz, U.M. Malyankar, M. Hokenson, T. Pham, Q. Zeng, J.B. Patterson, P.G. Richardson, N.C. Munshi, K.C. Anderson, Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 $\alpha$  is a promising therapeutic option in multiple myeloma, *Blood* 119 (2012) 5772–5781.
- [25] S.H. Back, M. Schröder, K. Lee, K. Zhang, R.J. Kaufman, ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1, *Methods* 35 (2005) 395–416.
- [26] W.J. Kapulkin, V. Kapulkin, B.G. Hiester, C.D. Link, Compensatory regulation among ER chaperones in *C. elegans*, *FEBS letters* 579 (2005) 3063–3068.
- [27] S. Kamhi-Nesher, M. Shenkman, S. Tolchinsky, S.V. Fromm, R. Ehrlich, G.Z. Lederkremer, A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum, *Mol Biol Cell* 12 (2001) 1711–1723.
- [28] M. Kondratyev, E. Avezov, M. Shenkman, B. Groisman, G.Z. Lederkremer, PERK-dependent compartmentalization of ERAD and unfolded protein response machineries during ER stress, *Exp Cell Res* 313 (2007) 3395–3407.

- [29] L. Lemus, V. Goder, Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by Ubiquitin, *Cells* 3 (2014) 824–847.
- [30] F. Urano, M. Calfon, T. Yoneda, C. Yun, M. Kiraly, S.G. Clark, D. Ron, A survival pathway for *Caenorhabditis elegans* with a blocked unfolded protein response, *J Cell Biol* 158 (2002) 639–646.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die auf ganz unterschiedliche Weise dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit entstanden ist.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Wenzel für die Ermöglichung meiner Promotion, für die Überlassung des spannenden Themas und die Bereitstellung der ausgezeichneten Forschungsmöglichkeiten. Seine andauernde Bereitschaft zu Gesprächen und Diskussion und seine konstruktive fachliche Unterstützung haben einen maßgeblichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

Bei Herrn Prof. Dr. Adriaan Dorresteijn möchte ich mich für die Betreuung meiner Promotion und die Begutachtung meiner Arbeit bedanken. Herrn PD Dr. habil. Ralf Pätzold danke ich für die Bereitschaft als Prüfer zu fungieren, ebenso wie Herrn Prof. Dr. Klaus Eder, bei dem ich mich außerdem für die wissenschaftliche Unterstützung bedanken möchte.

Dr. Elena Fitzenberger möchte ich danken für die Geduld bei der Beantwortung von Fragen jeglicher Art, das immer offene Ohr, die jederzeit bereitwillige fachliche und moralische Unterstützung und die Durchsicht der Manuskripte. Ein Dank geht natürlich auch an alle anderen Mitarbeiter des Lehrstuhls für molekulare Ernährungsforschung. Es war eine tolle und unvergessliche Zeit, die mich nicht nur fachlich, sondern auch menschlich geprägt hat. Eva Czynski hat in einem bedeutenden Ausmaß zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen, denn ohne sie wäre die Durchführung sämtlicher Experimente so nicht möglich gewesen und ihre Offenheit gegenüber allen Frage und Bitten haben viele Dinge im Laboralltag vereinfacht. Ihre ruhige und geduldige Art ist eine große menschliche Bereicherung für mich. Ganz besonders dankbar bin ich für die gemeinsame Zeit in der Arbeitsgruppe zusammen mit Dr. Charlotte Regitz und Dr. Stefanie Grünwald. Es ist toll, dass daraus viele schöne gemeinsame Abende und eine Freundschaft entstanden sind. Anne Leiteritz gebührt ebenfalls gleich ein mehrfacher Dank und zwar für die sorgfältige Durchsicht meiner Arbeit, aber ebenso für die schöne gemeinsame Zeit in der Arbeitsgruppe und die vielen Gespräche, die den Alltag im Labor und im Büro sowie auch ab und zu den Feierabend extrem aufgewertet haben. Weiterhin möchte ich an dieser Stelle meinen Studentinnen Mela, Caro, Anke und Alice für die schöne Zusammenarbeit danken.

Nicht zu vergessen ist ein großes Dankeschön an Frauke Frank vom Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie für die technische Unterstützung.

Nina und Denise möchte ich für all das danken, was beste Freunde ausmachen.

Der größte Dank geht an meine Eltern, die immer für mich da sind, mich in jeder Situation unterstützen und hinter mir stehen und ohne die ich heute nicht die wäre, die ich bin. Zuletzt möchte ich Dir, Basti, dafür danken, dass Du immer an meiner Seite stehst, bei mir bist, mich so nimmst wie ich bin und mir eine Art von Lebenswert gibst, von der ich nicht wusste, dass sie existiert, bis ich Dich getroffen habe. ♥

## Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 15.03.2016

Unterschrift \_\_\_\_\_



