

PROFESSUR FÜR MOLEKULARE ERNÄHRUNGSFORSCHUNG



**Präventive Mechanismen der Polyphenole Quercetin und Resveratrol
im Rahmen der β -Amyloid-induzierten Degeneration in einem
Alzheimer-Modell des Nematoden *Caenorhabditis elegans***

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

im Fachbereich
der Biologie und Chemie

an der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
M. Sc. Charlotte Regitz

Januar 2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Wenzel

Professur für Molekulare Ernährungsforschung

Institut für Ernährungswissenschaften

Justus-Liebig-Universität Gießen

IFZ, Heinrich-Buff-Ring 26-32

35392 Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Adriaan Dorresteijn

Professur für allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Stephanstraße 24

35390 Gießen

*“Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
dass die Dinge so sind, wie sie sind.”*

Aristoteles (384-322 v. Chr.)

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Morbus Alzheimer	1
1.1.1 β -Amyloid-Prozessierung	3
1.1.2 Tauprotein	6
1.1.3 Genetische Einflussfaktoren	7
1.1.4 Zelluläre Dysfunktionen	9
1.2 Steroid-Signalweg	11
1.3 Proteostase.....	13
1.3.1 Chaperon-vermittelte Proteinfaltung	14
1.3.2 Ungefaltete Proteinantwort in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum	15
1.3.3 Proteinabbau über das Ubiquitin-Proteasom-System	17
1.3.4 Autophagie.....	20
1.4 Polyphenole und degenerative Prozesse	23
1.5 <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus	25
1.5.1 Anatomie und Physiologie.....	26
1.5.2 <i>C. elegans</i> Alzheimer-Modell CL2006.....	29
1.5.3 Steroid-Signalweg in <i>C. elegans</i>	30
1.5.4 Insulin-Signalweg in <i>C. elegans</i>	32
1.5.5 Bedeutung der Sirtuine in <i>C. elegans</i>	33
1.5.6 Proteostase in <i>C. elegans</i>	34
1.5.6.1 Proteinfaltung und Chaperone in <i>C. elegans</i>	34

1.5.6.2	Ungefaltete Proteinantwort in <i>C. elegans</i>	34
1.5.6.3	Das Ubiquitin-Proteasom-System in <i>C. elegans</i>	35
1.5.6.4	Autophagie in <i>C. elegans</i>	36
2	ZIELSETZUNG	37
3	MATERIAL UND METHODEN	38
3.1	Kultivierung von <i>C. elegans</i>	38
3.1.1	Herstellung von NGM-Agar-Platten	38
3.1.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> OP50	39
3.1.3	Synchronisation von <i>C. elegans</i> mittels <i>Egg-Preparation</i>	39
3.1.4	Kultivierung von <i>C. elegans</i> in NGM-Flüssigmedium	40
3.1.5	RNA-Interferenz	40
3.1.6	Inkubation von <i>C. elegans</i> mit Effektoren	42
3.2	Messung der Paralyserate	43
3.3	Quantifizierung von Lysosomen mit LysoTracker® Red	44
3.4	Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrien mit MitoTracker® Red CM-H₂XRos	45
3.5	Proteinextraktion mittels des Precellys Homogenisators	45
3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	46
3.7	Messung der Proteasomaktivität	46
3.8	Bestimmung der Menge an Proteinaggregaten in Lösung	48
3.9	Statistische Auswertung	48
4	ERGEBNISSE	49
4.1	β-Amyloid-induzierte Proteinaggregation im <i>C. elegans</i> Alzheimer-Modell CL2006	49

4.2 Einflüsse Alzheimer-relevanter Gene auf die β-Amyloid-induzierte Paralyse in CL2006.....	50
4.2.1 Apolipoprotein-homologe Gene aktivieren die Paralyse in CL2006.....	50
4.2.2 Der Insulin-Signalweg beeinflusst die Paralyse in CL2006	54
4.2.2.1 Die transkriptionelle Aktivität von DAF-16 ist an der Verminderung der Paralyse beteiligt.....	54
4.2.2.2 DAF-16 und DAF-12 beeinflussen über eine Interaktion die Paralyse ..	57
4.3 Bedeutung der Proteostase für die β-Amyloid-induzierte Paralyse in CL2006.....	58
4.3.1 Die ungefaltete Proteinantwort verhindert die Paralyse in CL2006.....	58
4.3.2 Ein aktives Ubiquitin-Proteasom-System vermindert die Paralyse in CL2006	61
4.3.3 Bedeutung der Autophagie für die Paralyse in CL2006	64
4.4 Bedeutung des Quercetins für die β-Amyloid-induzierte Paralyse in CL2006.....	66
4.4.1 Quercetin senkt die Paralyse in CL2006	66
4.4.2 Quercetin reduziert die Menge an aggregiertem Protein in CL2006.....	67
4.4.3 Quercetin reduziert die Paralyse in CL2006 nicht aufgrund seiner antioxidativen Kapazität	69
4.4.4 Quercetin reduziert die Paralyse unabhängig von dessen Sirtuinaktivierung	72
4.4.5 Einfluss von Quercetin auf die Protease in CL2006	73
4.4.5.1 Quercetin senkt die Paralyse in UPR-defizienten Nematoden	73
4.4.5.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System erweist sich als Zielstruktur des Quercetins	76
4.4.5.3 Die Makroautophagie ist von zentraler Bedeutung für die Quercetin-vermittelte Reduktion der Paralyse.....	78
4.5 Bedeutung des Resveratrols für die β-Amyloid-induzierte Paralyse in CL2006.....	82
4.5.1 Resveratrol senkt die Paralyse in CL2006	83
4.5.2 Resveratrol reduziert die Menge an aggregiertem Protein in CL2006	84
4.5.3 Resveratrol senkt mitochondriale ROS in CL2006	85

4.5.4	Einfluss von Resveratrol auf die Proteosatz in CL2006	86
4.5.4.1	Resveratrol aktiviert Zielproteine der UPR	86
4.5.4.2	Einfluss von Resveratrol auf das Ubiquitin-Proteasom-System.....	89
4.5.4.3	Die Autophagie ist von zentraler Bedeutung für die Resveratrol- vermittelte Reduktion der Paralyse	90
5	DISKUSSION	94
5.1	Der Steroid-Signalweg beeinflusst über die Interaktion mit DAF-16 die Paralyse in CL2006.....	95
5.2	Die Proteostase bestimmt die β-Amyloid-induzierte Toxizität in CL2006	99
5.3	Quercetin und Resveratrol senken die β-Amyloid-induzierte Toxizität über die Aktivierung der zellulären Proteindegradation in CL2006.....	105
6	ZUSAMMENFASSUNG	114
7	SUMMARY	116
8	LITERATURVERZEICHNIS	118
9	ANHANG: MATERIAL UND METHODEN	144
	DANKSAGUNG	154
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	155

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1	Schematische Darstellung der β -Amyloid-Prozessierung.....	4
Abbildung 1-2	Zelluläre Dysfunktionen im Rahmen der AD	10
Abbildung 1-3	Zelluläre Proteostase	13
Abbildung 1-4	Ubiquitin-Proteasom-System	17
Abbildung 1-5	Schematische Darstellung der Autophagie.....	21
Abbildung 1-6	Chemische Struktur von Quercetin und Resveratrol	24
Abbildung 1-7	Anatomie eines Hermaphroditen <i>Caenorhabditis elegans</i>	26
Abbildung 1-8	Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> bei 22°C	28
Abbildung 1-9	Schematische Darstellung des Steroid-Signalweges in <i>C. elegans</i>	30
Abbildung 1-10	Schematische Darstellung des Insulin-Signalweges in <i>C. elegans</i>	32
Abbildung 3-1	Prinzip der RNAi	41
Abbildung 4-1	Proteinaggregation in CL2006 im Vergleich zum Wildtyp N2.....	49
Abbildung 4-2	Paralyse in Steroid-Signalweg-defizienten CL2006	51
Abbildung 4-3	Paralyserate von CL2006 mit Doppel-RNAi von <i>vit-6</i> und <i>daf-9</i> bzw. <i>daf-12</i>	52
Abbildung 4-4	Paralyserate von CL2006 mit RNAi zentraler Gene des Steroid- Signalweges bei normaler und reduzierter Cholesterolversorgung....	53
Abbildung 4-5	Paralyserate von CL2006 mit <i>daf-16</i> RNAi	54
Abbildung 4-6	Paralyserate von CL2006 mit <i>par-5</i> , <i>ftt-2</i> und <i>sir-2.1</i> RNAi	56
Abbildung 4-7	Paralyserate von CL2006 mit Doppel-RNAi von <i>daf-16</i> und <i>daf-12</i>	57
Abbildung 4-8	Paralyserate in UPR ^{mt} -defizienten Nematoden	59
Abbildung 4-9	Paralyserate in UPR ^{ER} -defizienten Nematoden.....	60
Abbildung 4-10	Paralyserate mit <i>ubq-1</i> bzw. <i>uba-1</i> RNAi	61
Abbildung 4-11	Proteasomaktivität mit <i>ubq-1</i> und <i>uba-1</i> RNAi.....	62
Abbildung 4-12	Proteinaggregation mit <i>ubq-1</i> bzw. <i>uba-1</i> RNAi	63
Abbildung 4-13	Paralyserate mit <i>bec-1</i> RNAi.....	64
Abbildung 4-14	Lysosomenbildung mit <i>bec-1</i> RNAi.....	65
Abbildung 4-15	Paralyserate mit <i>lmp-2</i> bzw. <i>unc-46</i> RNAi.....	66
Abbildung 4-16	Paralyserate nach 48 h Inkubation mit 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M Quercetin	67

Abbildung 4-17	Proteinaggregation nach 48 h Inkubation mit Quercetin.....	68
Abbildung 4-18	CM-H ₂ XRos von CL2006 im Vergleich zum <i>C. elegans</i> Wildtyp	69
Abbildung 4-19	CM-H ₂ XRos nach 48 h Inkubation mit 1 µM, 10 µM und 100 µM Quercetin	70
Abbildung 4-20	CM-H ₂ XRos nach 48 h Inkubation mit Ascorbinsäure.....	71
Abbildung 4-21	Paralyserate nach 48 h Inkubation mit Ascorbinsäure	71
Abbildung 4-22	Paralyserate mit <i>sir-2.1</i> RNAi und nach 48 h Inkubation mit Quercetin	72
Abbildung 4-23	Paralyserate in UPR ^{mt} -defizienten Nematoden und nach 48 h Inkubation mit Quercetin.....	74
Abbildung 4-24	Paralyserate in UPR ^{ER} -defizienten Nematoden und nach 48 h Inkubation mit Quercetin.....	75
Abbildung 4-25	Paralyserate mit <i>ubq-1</i> bzw. <i>uba-1</i> RNAi und nach 48 h Inkubation mit Quercetin	76
Abbildung 4-26	Proteasomaktivität nach 48 h Inkubation mit Quercetin	77
Abbildung 4-27	Proteasomaktivität mit <i>uba-1</i> RNAi und nach 48 h Inkubation mit Quercetin	77
Abbildung 4-28	Paralyserate mit <i>bec-1</i> RNAi und nach 48 h Inkubation mit Quercetin	78
Abbildung 4-29	Paralyserate mit <i>imp-2</i> bzw. <i>unc-46</i> RNAi und nach 48 h Inkubation mit Quercetin.....	79
Abbildung 4-30	LysoTracker® Red Fluoreszenz nach 48 h Inkubation mit Quercetin	80
Abbildung 4-31	LysoTracker® Red Fluoreszenz nach 48 h Inkubation mit Chloroquin in Ab- und Anwesenheit von Quercetin.....	81
Abbildung 4-32	LysoTracker Red ® Fluoreszenz mit <i>imp-2</i> bzw. <i>unc-46</i> RNAi und nach 48 h Inkubation mit Quercetin	82
Abbildung 4-33	Paralyserate nach 48 h Inkubation mit 1 µM, 10 µM und 100 µM Resveratrol.....	83
Abbildung 4-34	Proteinaggregation nach 48 h Inkubation mit Resveratrol	84
Abbildung 4-35	CM-H ₂ XRos nach 48 h Inkubation mit Resveratrol.....	85
Abbildung 4-36	Paralyserate in UPR ^{mt} -defizienten Nematoden und nach 48 h Inkubation mit Resveratrol	87

Abbildung 4-37	Paralyserate in UPR ^{ER} -defizienten Nematoden und nach 48 h Inkubation mit Resveratrol	88
Abbildung 4-38	Paralyserate mit <i>ubq-1</i> bzw. <i>uba-1</i> RNAi und nach 48 h Inkubation mit Resveratrol	89
Abbildung 4-39	Proteasomaktivität nach 48 h Inkubation mit Resveratrol	90
Abbildung 4-40	Paralyserate mit <i>bec-1</i> RNAi und nach 48 h Inkubation mit Resveratrol.....	91
Abbildung 4-41	Paralyserate mit <i>imp-2</i> bzw. <i>unc-46</i> RNAi und nach 48 h Inkubation mit Resveratrol	91
Abbildung 4-42	LysoTracker® Red Fluoreszenz in CL2006 nach 48 h Inkubation mit Resveratrol	92
Abbildung 4-43	LysoTracker® Red Fluoreszenz nach 48 h Inkubation mit Chloroquin in Ab- und Anwesenheit von Resveratrol	93
Abbildung 4-44	LysoTracker® Red Fluoreszenz mit <i>imp-2</i> bzw. <i>unc-46</i> RNAi und nach 48 h Inkubation mit Resveratrol	93
Abbildung 5-1	Schematische Darstellung der Bedeutung der Proteostase für die Paralyse in CL2006	113

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 9-1	Verbrauchsmaterialien mit Hersteller.....	144
Tabelle 9-2	Verwendete Geräte mit Hersteller	145
Tabelle 9-3	Verwendete RNAi-Klone	146
Tabelle 9-4	Verwendete Software mit Hersteller	147
Tabelle 9-5	Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Bestellnummer und Hersteller	147
Tabelle 9-6	Verwendete <i>C. elegans</i> Stämme mit Genotyp und Referenz	148
Tabelle 9-7	Verwendete <i>E. coli</i> Stämme mit Genotyp und Referenz.....	149
Tabelle 9-8	NaCl-Pepton	149
Tabelle 9-9	M9-Puffer	149
Tabelle 9-10	M9:Tween®20 Puffer	150
Tabelle 9-11	Bleichlösung	150
Tabelle 9-12	Ethanol:TWEEEN® 20	150
Tabelle 9-13	Einfrierpuffer A	150
Tabelle 9-14	Einfrierpuffer B	150
Tabelle 9-15	Lysispuffer.....	151
Tabelle 9-16	Proteasomaktivitäts-Messpuffer	151
Tabelle 9-17	Stammlösungen	151
Tabelle 9-18	2xYT-Agar	152
Tabelle 9-19	2xYT-Medium.....	152
Tabelle 9-20	<i>Nematode Growth Medium</i> (NGM) Agar.....	153
Tabelle 9-21	Flüssig-NGM.....	153

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

8-OHdG	8-Hydroxydesoxyguanosin
A β	β -Amyloid
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
<i>abu</i>	<i>activated in blocked UPR</i>
AD	<i>Alzheimer's disease</i>
<i>adm-4</i>	<i>ADAM (disintegrin plus metalloprotease) family</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AGE-1	<i>ageing alterations</i>
AICD	<i>amyloid intracellular domain</i>
AKT-1	<i>AKT kinase family</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
<i>apl-1</i>	<i>amyloid-precursor like</i>
APO	Apolipoprotein
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
AS	Aminosäure
ATF6	<i>activating transcription factor</i>
ATG	Autophagie-assoziiertes Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	β -site <i>APP</i> -cleaving enzyme
BCL2	<i>B-cell lymphoma</i>
<i>bec-1</i>	Beclin
bidest	bidestilliert
BSA	bovines Serumalbumin
bZip	<i>basic leucine-zipper</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
CHOP	C/EBP homologes Protein
CLPP	<i>caseinolytic peptidase family</i>
CMA	chaperone mediated autophagy
CTF	C-terminales Fragment
DA	<i>dafachronic acid</i>

<i>daf</i>	<i>abnormal dauer formation</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>dve-1</i>	<i>defective proventriculus in Drosophila homologue</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitinligase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Egg-Prep	<i>Egg-Preparation</i>
Em	Emissionswellenlänge
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
Ex	<i>excitation wave length</i>
FAD	familiäre AD
FOXO	<i>forkhead box O</i>
<i>ftt-2</i>	<i>fourteen-three-three family</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HAF-1	<i>HAIF transporter (PGP-related)</i>
HDL	<i>high-density lipoprotein,</i>
HRE	Hormon-responsives Element
HSF	Hitzeschockfaktor
<i>hsp</i>	Hitzeschockprotein
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRE1	<i>inositol-required enzyme</i>
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
LC3	<i>light chain</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LGG	<i>LC3, GABARAP and GATE-16 family</i>
<i>lmp-2</i>	<i>LAMP (lysosome-associated membrane protein) homolog</i>
mt	Mitochondrium
mTOR	<i>mammalian TOR</i>
NEF	<i>nucleotid exchange factor</i>

NGM	<i>nematode growth medium</i>
NHR	nukleärer Hormonrezeptor
<i>par-5</i>	<i>abnormal embryonic PARTitioning of cytoplasm</i>
PEK-1	<i>PERK kinase homolog</i>
PERK	<i>protein kinase RNA-like ER kinase</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PS1 / PS2	Presenilin
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RME-2	<i>receptor mediated endocytosis</i>
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
sAPP	<i>soluble APP</i>
<i>sel-12</i>	<i>suppressor/enhancer of Lin-12</i>
sHSP	<i>small HSP</i>
<i>sir</i>	Sirtuinhomolog
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SORL	<i>sorlin-related receptor</i>
Suc-LLVY-AMC	N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin
<i>sup-17</i>	<i>supressor</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TOR	<i>target of rapamycin</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC	<i>tuberous sclerosis</i>
Ub	Ubiquitin
<i>uba</i>	<i>ubiquitin-activating enzyme</i>
<i>ubl-5</i>	<i>ubiquitin-like protein</i>
<i>ubq</i>	<i>ubiquitin homolog</i>
UCH-L1	Ubiquitin-C-terminale Hydroxylase L1
ULK	<i>unc-51 like kinase</i>
<i>unc-46</i>	<i>uncoordinated</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UPR ^{ER}	<i>unfolded protein response des ER</i>
UPR ^{mt}	<i>unfolded protein response der Mitochondrien</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System

<i>vit</i>	Vitellogenin
<i>xbp-1</i>	<i>X-box binding protein</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Morbus Alzheimer

Der Psychiater Alois Alzheimer beschrieb 1906 zum ersten Mal eine Erkrankung des Gehirns, nachdem er bei einer seiner Patientinnen, Auguste D., einen massiven Gedächtnisverlust sowie schwere kognitive Störungen, die mit einem veränderten Wesen einhergingen, feststellte. Nach ihrem Tod führte er eine Autopsie durch, die eine hochgradige Atrophie der Hirnrinde sowie histopathologische Veränderung der Hirnsubstanz zeigte [1]. Bei diesen Veränderungen handelte es sich um sogenannte senile Plaques bestehend aus β -Amyloid ($A\beta$) – Peptidaggregaten, sowie neurofibrillären Bündeln. Verbunden damit zeigten sich neuronale Dysfunktionen und ein starker Rückgang an Neuronen im zerebralen Kortex sowie im Hippokampus [2]. Dieses charakteristische Krankheitsbild wird heute als Morbus Alzheimer (*Alzheimer's disease*, AD) bezeichnet. $A\beta$ und neurofibrilläre Bündel aktivieren oxidative [3] sowie inflammatorische [4] Prozesse und bedingen eine starke Neurotoxizität, welche die Atrophie des Gehirns und die schweren kognitiven Beeinträchtigungen bedingen [5]. Voraussetzung für die Diagnose ist letztendlich die Kombination aus $A\beta$ -Plaques und Neurofibrillenbündeln [6]. Diese kann erst durch eine Biopsie des Gehirns *post mortem* gestellt werden.

Die klinisch-pathologischen Symptome äußern sich durch eine fortschreitende Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten. Dies umfasst Vergesslichkeit, Wortfindungsstörungen, Orientierungslosigkeit [7] sowie psychische Veränderungen wie z. B. Aggressivität, Depression und Wahnvorstellungen [8], welche zur vollständigen Abhängigkeit der Patienten führen. Die Erkrankung ist irreversibel und die Patienten versterben durchschnittlich innerhalb von ca. 10 Jahren nach Auftreten der ersten Symptome, auch wenn bei guter Pflege prinzipiell keine Beeinträchtigung der Lebensspanne besteht [9].

Weltweit leiden mehr als 36 Millionen Menschen an AD; in Deutschland sind ca. 700.000 AD-Patienten mit steigender Tendenz zu verzeichnen [10]. Es handelt sich bei AD um die häufigste Form einer neurodegenerativen Erkrankung und nach Herzinfarkt,

Krebs und Schlaganfall um die vierthäufigste Todesursache in den Industriestaaten [11]. Jede zweite Demenzerkrankung kann auf AD zurückgeführt werden [11]. Zunehmendes Alter stellt den größten Risikofaktor für Demenz des Alzheimerstyps dar [12, 13]. Die Inzidenz für AD verdoppelt sich ab einem Alter von 65 Jahren alle fünf Jahre. Pro 100.000 der über 65-jährigen werden jährlich ca. 1.300 neue Fälle diagnostiziert [14]. Aufgrund der Veränderung der Altersstruktur mit zunehmendem Anteil älterer im Verhältnis zu jungen Menschen wird bis zum Jahr 2050 eine Verdreifachung der AD-Prävalenz weltweit erwartet [10].

Neben dem Alter gibt es weitere Risikofaktoren, die eine AD-Entstehung begünstigen. Auch wenn die meisten AD-Formen sporadischer Art und durch das erste Auftreten von Symptomen ab einem Alter von 65-85 Jahren gekennzeichnet sind, kann ein geringer Teil der AD-Fälle (5-10%) auf genetische Ursachen zurückgeführt werden. In diesem Fall wird von der familiären AD (*familial Alzheimer's disease*, FAD) gesprochen [15, 16]. Des Weiteren spielen individuelle Lebensbedingungen eine Rolle für das Erkrankungsrisiko. So werden z. B. Schädel-Hirn-Traumata [17], endokrine Erkrankungen [18, 19] und Nikotinkonsum [20] mit einem erhöhten Risiko einer AD in Verbindung gebracht. Zudem wird dem Plasmacholesterole eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der AD-Entstehung zugesprochen. So sollen erhöhte Cholesterolspiegel mit einem erhöhten AD-Risiko einhergehen [21]. Auf der anderen Seite werden ein hohes Ausbildungsniveau, lebenslange geistige Beanspruchung [22], körperliche Betätigung [23] sowie gesunde Ernährung [24] in Zusammenhang mit einem erniedrigten Risiko genannt. Die Entstehung der AD ist demnach multifaktoriell und wird sowohl durch den Alterungsprozess als auch durch genetische und umweltbedingte Faktoren beeinflusst.

Auch wenn die Suche nach erfolgreichen Therapien Gegenstand der aktuellen Forschung ist, gibt es bisher keine Behandlungsmöglichkeit, welche die Krankheit aufhalten oder heilen kann. Humanstudien deuten darauf hin, dass die Langzeiteinnahme von antiinflammatorischen nicht-steroidalen Antiphlogistika die Inzidenz von AD reduzieren kann [25]. In Tiermodellstudien konnte zudem gezeigt werden, dass cholesterolsenkende Medikamente die Menge an A β -Plaques im Liquor verringern [26, 27]. Neuere Therapiestrategien zielen speziell auf die A β -Pathologie ab. Hier stehen vor allem eine Hemmung der für die Metabolisierung des A β

verantwortlichen Schlüsselenzyme (β - sowie γ -Sekretase) im Vordergrund. So konnte in einer klinischen Studie mit einem γ -Sekretasehemmer die $A\beta$ -Konzentration im Blutplasma gesenkt werden [28]. Des Weiteren konnte mit $A\beta$ -Antikörpern in transgenen Mäusen die Plaquebildung reduziert werden [29, 30]. Auch wird einer Reihe von Nahrungsinhaltsstoffen ein therapeutischer Nutzen im Rahmen der AD zugesprochen. Dazu zählen u. a. Polyphenole, deren antioxidative Kapazität hier im Fokus steht [31]. Eine hohe Aufnahme polyphenolhaltiger Nahrungsmittel geht mit einem verminderten Risiko für die Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen einher [32].

1.1.1 β -Amyloid-Prozessierung

Hauptbestandteil der senilen Plaques im Rahmen der AD sind $A\beta$ -Peptide [33, 34]. Darauf aufbauend stellt die β -Amyloid-Kaskade das $A\beta$ in den Fokus der AD-Pathogenese, wonach die $A\beta$ -Aggregation der initiale Schritt der Erkrankung ist [14, 35]. Als Ursache hierfür wird ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Degradation des $A\beta$ vermutet [36]. Bei $A\beta$ handelt es sich um ein Peptid aus 39 bis 43 Aminosäuren (AS). Es existieren verschiedene Monomere, die sich in ihrer AS-Anzahl und ihrer Pathogenität unterscheiden. Die häufigsten Formen sind $A\beta_{1-40}$ -Monomere gefolgt von $A\beta_{1-42}$ -Monomeren [37]. Beide bilden Aggregate und führen zu den klassischen pathologischen Veränderungen, wobei das $A\beta_{1-42}$ die toxischere Wirkung hat [37]. $A\beta$ entsteht durch die enzymatische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (*amyloid precursor protein*, APP). Bei APP handelt es sich um ein integrales Typ-1 Transmembranprotein, das auf Chromosom 21 lokalisiert ist [34, 38]. APP ist ein hoch konserviertes und ubiquitär exprimiertes Glykoprotein, welches durch alternatives Spleißen in drei Haupt-Isoformen (APP770, APP751, APP695) vorliegen kann. Dabei wird APP695 primär im Gehirn, insbesondere in den Neuronen exprimiert. Es besteht aus einer großen N-terminalen, einer Transmembran- sowie einer kurzen C-terminalen cytoplasmatischen Domäne [38]. APP scheint eine Rolle in transmembranen Signaltransduktionsprozessen zu spielen, da es mit Guanosintriphosphat (GTP) - bindenden Proteinen komplexieren kann [39]. APP wird zudem mit der Zelladhäsion [40] sowie mit Zellwachstumsprozessen im Rahmen der Synapsensynthese in

Verbindung gebracht [41]. Eine Beteiligung am Kalziummetabolismus wird ebenfalls diskutiert [42].

Die Prozessierung von APP erfolgt, wie in Abbildung 1-1 dargestellt, über drei verschiedene Sekretasen. Je nachdem, in welchem Zusammenspiel die Enzyme bei der Prozessierung agieren, läuft der amyloidogene bzw. der nicht-amyloidogene Abbauweg ab [14, 43]. Die Spaltung durch die β - und γ -Sekretase führt zur Bildung des toxischen A β , wohingegen die erste Spaltung durch die α -Sekretase zu einem nicht-amyloidogenen Peptid führt [44].

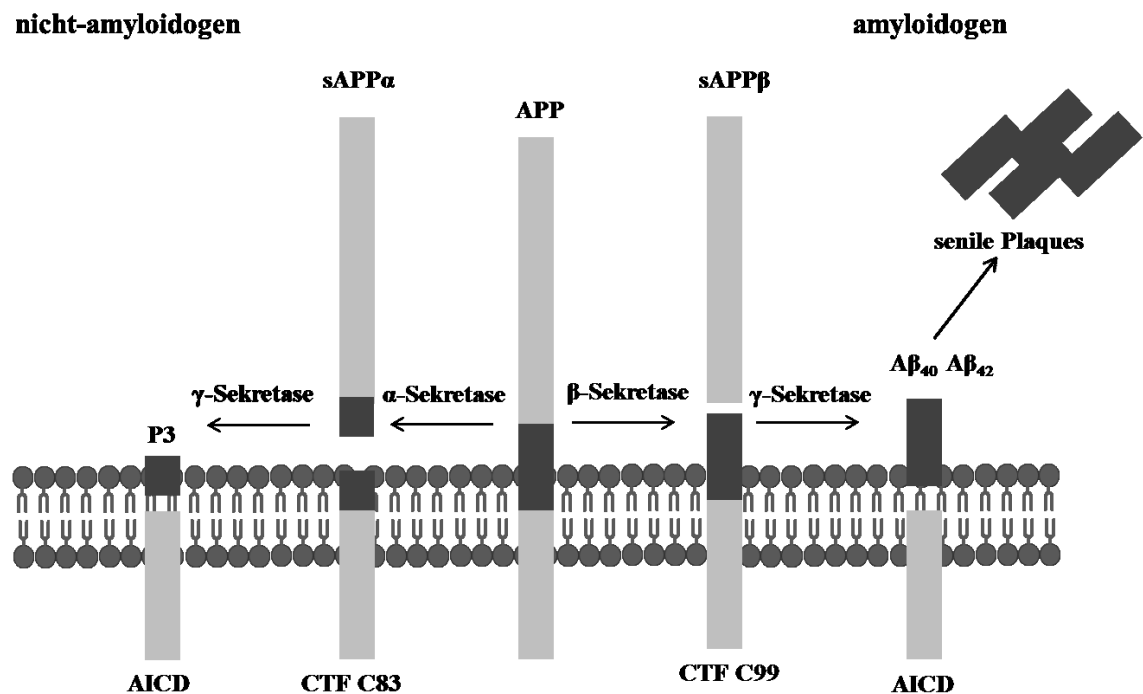


Abbildung 1-1 Schematische Darstellung der β -Amyloid-Prozessierung

APP: amyloid precursor protein, sAPP: soluble APP, CTF: C-terminales Fragment, A β : β -Amyloid, P3: lösliches Peptid, AICD: amyloid intracellular domain.

Der Hauptanteil von APP wird über den nicht-amyloidogenen Abbauweg prozessiert (Abbildung 1-1). In einem ersten Schritt wird APP in der Nähe der Zellmembran durch die α -Sekretase gespalten. Hierdurch entsteht zunächst ein lösliches APP-Bruchstück (*solubleAPPα*, sAPPa). Das ebenfalls gebildete C-terminale Fragment (CTF) C83 verbleibt vorerst in der Membran und wird anschließend durch die γ -Sekretase in zwei weitere Fragmente, ein lösliches Peptid (P3) sowie eine intrazelluläre Domäne (*amyloid intracellular domain*, AICD) gespalten [45]. Bei der γ -Sekretase handelt es sich um

einen Proteinkomplex, der aus den vier Proteinen Presenilin, Nicastrin, APH-1 und PEN besteht. Die γ -Sekretase ist nur funktionsfähig wenn alle vier Proteine vorhanden sind. Allerdings bildet das Presenilin, wovon zwei Homologe, das PS1 und das PS2, bekannt sind, das katalytische Zentrum [46]. Dem sAAP α werden neuroprotektive Eigenschaften zugesprochen [47], während AICD eine Rolle in Signaltransduktionsprozessen zu kommt [48].

Die zweite Möglichkeit der APP-Prozessierung, die letztendlich die Beschreitung des amyloidogenen Weges ebnet, ist die initiale Spaltung des APP durch die β -Sekretase (Abbildung 1-1). Bei der β -Sekretase handelt es um die Typ-1 membrangebundene Aspartyl-Protease (*β -site APP-cleaving enzyme*, BACE-1). Analog zur α -Sekretase bildet sie das lösliche Fragment sAPP β , das in den extrazellulären Raum freigesetzt wird, sowie das membrangebundene CFT C99. Letzteres setzt in einem zweiten Schritt während der Prozessierung durch die γ -Sekretase A β_{1-40} bzw. A β_{1-42} extrazellulär und die AICD intrazellulär frei [43, 44].

A β ist ein hydrophobes Peptid, das zur Aggregation neigt. Diese verläuft spontan und bildet Strukturen, die von Dimeren über Oligomere bis hin zu polymeren Fibrillen reichen. Die Oligomere stellen mit Aggregaten aus zwei bis sechs Peptiden die toxischsten Vertreter dar. Sie vergrößern sich und lagern sich zu den für AD typischen unlöslichen oligomeren A β -Fibrillen, den senilen Plaques, zusammen. In dieser Form weist A β eine besonders hohe Toxizität auf [14, 43]. A β_{1-40} bildet den mengenmäßig größeren Teil, während A β_{1-42} nur 5-10% des gebildeten A β ausmacht. Letzteres scheint bereits intrazellulär zu oligomerisieren [49]. Es wird davon ausgegangen, dass dies mit den frühen synaptischen Dysfunktionen im Rahmen der AD einhergeht [2]. Die aggregierten A β fördern inflammatorische und oxidative Prozesse in den Neuronen, die zur Dysfunktion der Synapsen, zur mitochondrialen Dysfunktion [14], zu Störungen der Zellproteostase und zu zellulärem Stress [50] führen.

1.1.2 Tauprotein

Neben der Akkumulation von A β -Plaques kommt es im Rahmen der AD zur Bildung neurofibrillärer Bündel, die aus paarig angeordneten helikalen Filamenten bestehen. Diese setzen sich aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen zusammen. In physiologischem Zustand sind Tau-Proteine gut löslich und maßgeblich an dem Aufbau und der Stabilität von Mikrotubuli beteiligt [51]. Des Weiteren spielen sie bei der Signaltransduktion [52] und beim Neuritenwachstum eine wichtige Rolle [53]. Im Cytosol liegt gelöstes Tau in einem Gleichgewicht mit dem an Mikrotubuli gebundenem Tau vor. Die Bindung an Mikrotubuli wird durch die Phosphorylierung spezifischer Serin- und Threoninreste im Bereich der Bindungsstelle reguliert [54]. Kommt es, wie im Rahmen der AD, zur Hyperphosphorylierung, verliert das Tau-Protein seine Bindungsfähigkeit an die Mikrotubuli und löst sich von diesen. Die Mikrotubuli verlieren ihre Stabilität und sterben ab [55]. Das hyperphosphorylierte Tau lagert sich zu den beschriebenen unlöslichen Filamentstrukturen, den Neurofibrillenbündeln, zusammen und akkumuliert intrazellulär. Ebenso wie A β sind auch Neurofibrillenbündel neurotoxisch und beeinflussen die kognitive Funktion. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass hyperphosphoryliertes Tau-Protein zu einer Stimulation proinflammatorischer und prooxidativer Prozesse führt [56, 57]. Der initiale Grund für die Bildung des hyperphosphorylierten Taus ist nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise, dass dies auf eine Störung in der Aktivität verschiedener Kinasen und Phosphatasen, wie z. B. auf verringerte Protein-Phosphatasen-Aktivitäten, zurückgeführt werden kann [58-60]. So zeigten Götz *et al.*, dass eine Injektion von fibrillärem A β in transgenen Mäusen zu einer erhöhten Aggregation von Tau führte [61]. Dementsprechend wird davon ausgegangen, dass erst A β gebildet wird, welches dann die Phosphorylierung und Aggregation von Tau fördert. Dies konnte in weiteren Tiermodellen bestätigt werden [62, 63].

1.1.3 Genetische Einflussfaktoren

Die Beobachtung familiärer Häufungen von AD, ließen vermuten, dass es genetische Faktoren geben muss, die auf die Entstehung von AD begünstigend wirken. Die FAD ist auf autosomal-dominant vererbte genetische Faktoren zurückzuführen und geht mit einem frühen Auftreten der Erkrankung (*early-onset*) in einem Alter von < 60-65 Jahren einher [64]. Insbesondere Mutationen in drei Alzheimer-assoziierten Genen werden mit FAD in Verbindung gebracht. Dazu gehören Mutationen im APP-Gen auf Chromosom 21 [65], im PS1-Gen auf Chromosom 14 [66, 67] und im PS2-Gen auf Chromosom 1 [68, 69]. Weitere bekannte genetische Einflussfaktoren für die Entstehung einer spät auftretenden Form (*late-onset*) der AD sind Polymorphismen des Apolipoprotein E (*ApoE*) - Gens auf Chromosom 19 [70, 71].

Als erste genetische Ursache für AD wurden Mutationen im APP-Gen auf Chromosom 21 identifiziert [65]. Da bei Patienten mit Down-Syndrom, die zusätzlich ein drittes Chromosom 21 besitzen, bereits in mittlerem Alter neuropathologische, Alzheimer-ähnliche Veränderungen beobachtet werden können, war das Chromosom 21 schon früh im Fokus der Alzheimerforschung. Ein kontinuierlicher lebenslanger mit der Geburt beginnender Anstieg von $A\beta_{1-40}$ sowie $A\beta_{1-42}$ ist auf die Überexpression des strukturell intakten APP zurückzuführen [72]. Bei den bisher identifizierten Mutationen von APP im Rahmen der AD-Pathogenese handelt es sich um Punktmutationen, die zu einem Fehlsinn des Proteins führen [65]. Die Mutationen liegen entweder direkt vor der Schnittstelle der β -Sekretase, kurz hinter der α -Sekretaseschnittstelle oder am C-terminalen Ende der Schnittstelle für die γ -Sekretase [73]. Daraus resultiert eine veränderte Prozessierung von APP, die entweder die Gesamtmenge an sekretiertem $A\beta$ oder den Anteil des toxischeren $A\beta_{1-42}$ erhöht [74].

Mutationen des auf Chromosom 1 liegenden PS1-Gens konnten als Ursache für eine der frühesten und aggressivsten Form der FAD identifiziert werden. Es sind ca. 75 verschiedene Mutationen bekannt, die zu einem besonders frühen AD-Erkrankungsalter von 40-50 Jahren führen [66]. PS1-Mutationen führen zu einer verstärkten Bildung von $A\beta$, hauptsächlich $A\beta_{1-42}$. AD-Patienten mit entsprechenden Mutationen weisen eine höhere Zahl an Amyloid-Plaques im Gehirn auf [75].

PS2-Mutationen sind deutlich seltener und obwohl sie das Auftreten einer *early-onset* AD begünstigen, sind sie im Gegensatz zu PS1-Mutationen nicht so aggressiv in ihrer Ausprägung. Das durch PS2-Mutationen bedingte Erkrankungsalter ist höher als bei Patienten mit PS1-Mutationen [76]. Bei AD-Patienten mit PS2-Mutationen werden erhöhte $A\beta_{1-42}$ Plasmaspiegel und vermehrt extrazellulär vorkommendes $A\beta_{1-42}$ beobachtet [74].

Anders als bei den autosomal-dominant vererbten Mutationen von APP, PS1 und PS2 erhöhen bestimmte Polymorphismen des ApoE das Risiko für das Auftreten einer *late-onset* AD [71]. Das *ApoE*-Gen ist auf Chromosom 19 lokalisiert und kommt in drei verschiedenen Allelen vor: APO ϵ 2, APO ϵ 3 und APO ϵ 4 [77]. Bei ApoE handelt es sich um einen Lipidtransporter im Serum. Darüber hinaus bildet ApoE das Haupt-Apolipoprotein im zentralen Nervensystem (ZNS) [78]. Im ZNS wird ApoE primär von Astrozyten produziert, mit Cholesterol und Phospholipiden beladen und anschließend den extrazellulären Raum abgeben [78, 79]. Das APO ϵ 2-Allel des *ApoE*-Gens ist mit niedrigen Plasmacholesterolsiegeln assoziiert, während das APO ϵ 4-Allel mit hohen Plasmacholesterolsiegeln in Verbindung gebracht wird [80, 81]. Unter *late-onset* AD-Patienten ist das APO ϵ 4-Allel überdurchschnittlich häufig zu finden [71]. Patienten, die hetero- oder homozygot für das APO ϵ 4-Allel sind, weisen eine deutlich höhere Plaquedichte im Gehirn auf als Patienten, die kein APO ϵ 4-Allelträger sind [82]. Das Erkrankungsrisiko ist bei homozygoten Allelträgern deutlich erhöht im Gegensatz zu heterozygoten [70]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass das Vorhandensein des APO ϵ 2-Allels das Risiko an AD zu erkranken senkt [83]. Der genaue Mechanismus, der dem erhöhten Erkrankungsrisiko bei APO ϵ 4-Trägern zugrunde liegt, ist noch nicht hinreichend geklärt. ApoE könnte über verschiedene Mechanismen die AD-Entstehung fördern. Denkbar wäre dies z. B. über eine verstärkte Bildung von $A\beta$ -Fibrillen [84, 85]. Zusätzlich scheint es zu einem verminderten Abbau, insbesondere des $A\beta_{1-40}$ [86], im Gehirn zu kommen. Dies ist eng assoziiert mit einem veränderten intrazellulären Cholesterolsiegel [85, 87]. Studien mit Mäusen zeigten, dass ApoE4 zusätzlich zu einem geringeren Neuritenwachstum und verschlechterten Reparaturen dieser beiträgt [88]. Ein weiteres Gen mit dem Lipistoffwechsel assoziiertes Gen, das mit AD in Verbindung gebracht wird ist *SORL1* (*sorlin-related receptor*). *SORL1* kodiert einen Sortolin-ähnlichen Rezeptor, welcher als neuronaler ApoE-Rezeptor fungiert und hauptsächlich im ZNS exprimiert wird. Mutationen des Rezeptors scheinen eine

wichtige Rolle bei der amyloidogenen Prozessierung des APP zu spielen [89, 90]. Die verminderte *SORL1* Expression wird mit einem erhöhten Risiko der AD-Entstehung assoziiert [91]. Da die Blut-Hirn-Schranke eigentlich den direkten Transport zwischen peripher zirkulierendem Cholesterol und dem Gehirn verhindert, könnte die Identifizierung des permeablen 27-Hydroxycholesterol, ein Oxysterol, das Gedächtnisfunktionen beeinträchtigt, die gesuchte Verbindung zwischen AD und Hypercholesterinämie darstellen [90, 92].

1.1.4 Zelluläre Dysfunktionen

Die Akkumulation von A β und Tau-Proteinen führt in AD-Patienten zu Veränderungen auf zellulärer Ebene, die letztendlich zu einer Beeinträchtigung der Zellfunktion beitragen. Es gibt Hinweise darauf, dass insbesondere die mitochondriale Dysfunktion (siehe Abbildung 1-2) eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AD spielt [93]. Auch wenn die klassische A β -Hypothese besagt, dass extrazelluläres A β Hauptauslöser für die AD-Pathogenese ist, gibt es neuere Theorien, die davon ausgehen, dass die neuronalen Dysfunktionen und Degenerationen durch intrazelluläre Akkumulation von A β entstehen. Dies wird dadurch gestützt, dass in Mitochondrien der Gehirne von AD-Patienten eine Akkumulation von A β beobachtet werden konnte [94]. Einen Hinweis auf die Beeinträchtigung der Mitochondrien gaben auch morphologische Untersuchungen die zeigten, dass Mitochondrien bei Vorhandensein von AD strukturelle Veränderungen aufweisen und in ihrer Anzahl vermindert sind [95]. Auch sind typischerweise die Aktivitäten von bestimmten Enzymen in Gehirnen von AD-Patienten vermindert. Dazu zählen die Cytochrom-c-Oxidase, die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase sowie die Pyruvat-Dehydrogenase. Zellkulturstudien weisen darauf hin, dass A β direkt toxisch auf Mitochondrien wirkt, da die Aktivität der genannten Enzyme durch die A β -Exposition inhibiert werden konnte [96]. Dieses Postulat wird darüber hinaus durch die Beobachtung gestützt, dass die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien der Gehirne von AD-Patienten stark beeinträchtigt ist [97]. Eine weitere schwerwiegende Veränderung, die in Zellkulturen beobachtet wurde, ist ein verringertes mitochondriales Membranpotential als Reaktion auf A β -Akkumulation [98]. Wahrscheinlich kommt es durch mitochondrial akkumulierendes A β zu einer direkten Hemmung der Komplexe der Atmungskette, gefolgt von einer exponentiell

ansteigenden Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), hauptsächlich H_2O_2 [99]. Gleichzeitig sinkt die Adenosintriphosphat (ATP) - Produktion deutlich [100]. Eine weitere Wirkweise über die Aß Mitochondrienfunktionen beeinflussen könnte, ist die verstärkte Freisetzung von Cytochrom c, welches proapoptotisch wirkt und so zum Absterben der Zelle beiträgt [99].

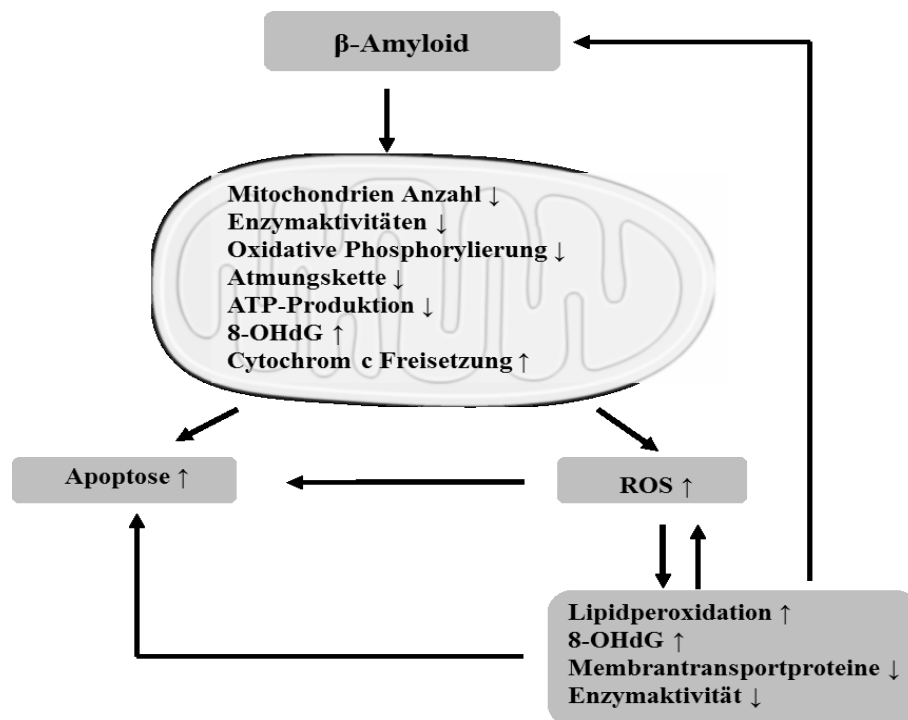


Abbildung 1-2 Zelluläre Dysfunktionen im Rahmen der AD

ROS: reaktive Sauerstoffspezies; 8-OHdG: 8-Hydroxydesoxyguanosin.

Der entstandene oxidative Stress führt darüber hinaus zu einer Reihe weiterer zellulärer Schäden in den betroffenen Neuronen. In den Gehirnen von AD-Patienten wurden verstärkt Marker für Lipidperoxidationen [101] sowie ein erhöhtes Vorkommen von mitochondrialem 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG) [102], ein Biomarker für oxidative DNA-Schäden, beobachtet. Lipidperoxidationen beeinträchtigen Membranfunktionen und somit auch die Aktivitäten vieler membranständiger Transporter wie z. B. des Glukose-Transporters [103], des Glutamat-Transporters [104] oder von ATPasen (Na^+/K^+ - sowie Ca^{2+} -ATPasen) [105]. Durch die genannten Beeinträchtigungen wird die Funktionalität von Membranen zerstört. Als Folge davon kommt es u. a. zu einem Anstieg der basalen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [106],

die letztendlich die Aktivität der Zelle beeinträchtigt und häufig mit der Apoptose der Zelle endet. Ebenso gibt es Hinweise darauf, dass der ROS-Stress zu oxidativen Schädigungen an zellulären Proteinen führt, die zusätzlich die Inaktivierung antioxidativer Enzyme verursachen [107], wodurch wiederum der oxidative Prozess gesteigert wird. Zusätzlich verstärken diese Prozesse die Proteinaggregation, u. a. auch von A β . Ein weiteres von der Oxidation häufig betroffenes Enzym ist die Ubiquitin-C-terminale Hydroxylase L1 (UCH-L1), die zu den deubiquitinierenden Enzymen zählt und somit eine wichtige Rolle im Rahmen der Proteindegradation über das Proteasom spielt [108]. *In vitro* Studien mit Antioxidantien zeigten, dass sowohl die prooxidative als auch die neurotoxische Wirkung von A β mit Antioxidantien wie z. B. Vitamin E oder Glutathion kompensiert werden konnte [109, 110].

1.2 Steroid-Signalweg

Dysregulationen der Cholesterolumöostase und der Plasmacholesterolspiegel werden mit neurodegenerativen Erkrankungen wie z. B. der AD in Verbindung gebracht. Zwar kann ein veränderter Cholesterometabolismus im Gehirn von AD-Patienten nachgewiesen werden, allerdings ist nicht bekannt, ob es sich hierbei um eine Ursache oder Folge der Erkrankung handelt [111]. Da ApoE das Haupt-Apolipoprotein des ZNS ist und für den Cholesteroltransport verantwortlich ist, werden Polymorphismen im *ApoE*-Gen mit AD assoziiert. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass Cholesterol eine wichtige Rolle im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen spielt [71].

Cholesterol wird in Säugetieren für die Synthese von Steroidhormonen und Gallensäure sowie für den Aufbau von Zellmembranen benötigt. Außerdem ist Cholesterol Hauptbestandteil von Mikrodomänen im Gehirn, die eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Wachstumssignalen, der Weiterleitung von Aktionspotentialen und der synaptischen Übertragen spielen [111]. Außerhalb des ZNS wird sowohl endogen synthetisiertes Cholesterol als auch exogen aufgenommenes Cholesterol verwertet. Da Plasmalipoproteine die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können, ist das im Gehirn vorhandene Cholesterol hauptsächlich aus endogener Synthese [112]. Trotzdem werden, wie bereits erwähnt, hohe Plasmacholesterolspiegel mit einem erhöhten Risiko für AD in Verbindung gebracht [21, 113].

Cholesterol wird im Plasma mit Hilfe von Lipoproteinen transportiert. Lipoproteine bestehen aus Apolipoproteinen, Phospholipiden und Cholesterol. Sie sind in der Lage Cholesteroler und Triglyceride aufzunehmen und zu den entsprechenden Zielgeweben zu transportieren. Cholesterol wird im Plasma primär durch *low-density lipoproteins* (LDL, Lipoprotein niederer Dichte), die hauptsächlich das ApoB100 als Apolipoprotein enthalten, von der Leber zu den Zielzellen transportiert. Dort binden sie an LDL-Rezeptoren und werden in die Zellen aufgenommen, wo das Cholesterol wieder aus dem LDL freigesetzt wird [114]. Der Cholesteroltransport im Gehirn verläuft unabhängig vom peripher zirkulierenden Cholesterol. Astrozyten produzieren ApoE, das mit Phospholipiden Lipoproteine bildet, die von der Größe dem HDL (*high-density lipoprotein*, Lipoprotein hoher Dichte) im Plasma entsprechen. ApoE nehmen Cholesterol über ABC (ATP-bindende Kasette, *ATP-binding cassette*) - Transporter auf. ApoE werden ebenfalls über Rezeptoren der LDL-Familie, z. B. den LDL-Rezeptor, in Neuronen aufgenommen [115, 116].

Alle Steroidhormone basieren auf der Struktur des Cholesterolgerüsts. Für Wachstum und Entwicklung sowie Aufrechterhaltung der Körperfunktionen sind Vertebraten auf Steroidhormone angewiesen [117]. Steroidhormone wirken über Steroidhormonrezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren für die Signaltransduktion der Hormone in den Zellen verantwortlich sind. Steroidhormonrezeptoren gehören zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren (NHRs). Auch wenn NHRs noch in weitere Untergruppen eingeteilt werden, sind sie alle ähnlich aufgebaut und wirken nach dem gleichen Mechanismus. Nach Bindung des Liganden werden die Rezeptoren aktiviert und translozieren in den Zellkern wo sie die entsprechenden Hormon-responsiven Elemente (HREs) auf der DNA erkennen und binden. Dies ermöglicht die Bindung von Co-Aktivatoren, so dass letztendlich die Transkription der entsprechenden Zielgene stattfinden kann [117].

1.3 Proteostase

Um der Akkumulation aggregierter A β -Peptide sowie der dadurch verursachten molekularen Schäden entgegenzuwirken, ist eine effektive Proteinhomöostase, die Proteostase, für das Überleben der Zelle essentiell. Erschwerend kommt hinzu, dass die Akkumulation von Proteinaggregaten zu einer Beeinflussung der Proteostase beiträgt, was wiederum die Akkumulation und Aggregation fehlerhafter Proteine begünstigt. Die Zelle verfügt über ein komplexes System (Abbildung 1-3), das die Faltung, den Transport und den Abbau von Proteinen streng kontrolliert. Zu diesem System zählen u. a. Chaperone, Hitzeschockproteine (HSPs) und die ungefaltete Proteinantwort in den Mitochondrien (*unfolded protein response* der Mitochondrien, UPR^{mt}) und im endoplasmatischen Retikulum (UPR^{ER}) sowie das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), das für die Degradation fehlerhafter Proteine verantwortlich ist. Ebenfalls besteht die Möglichkeit der Autophagie um Proteine abzubauen.

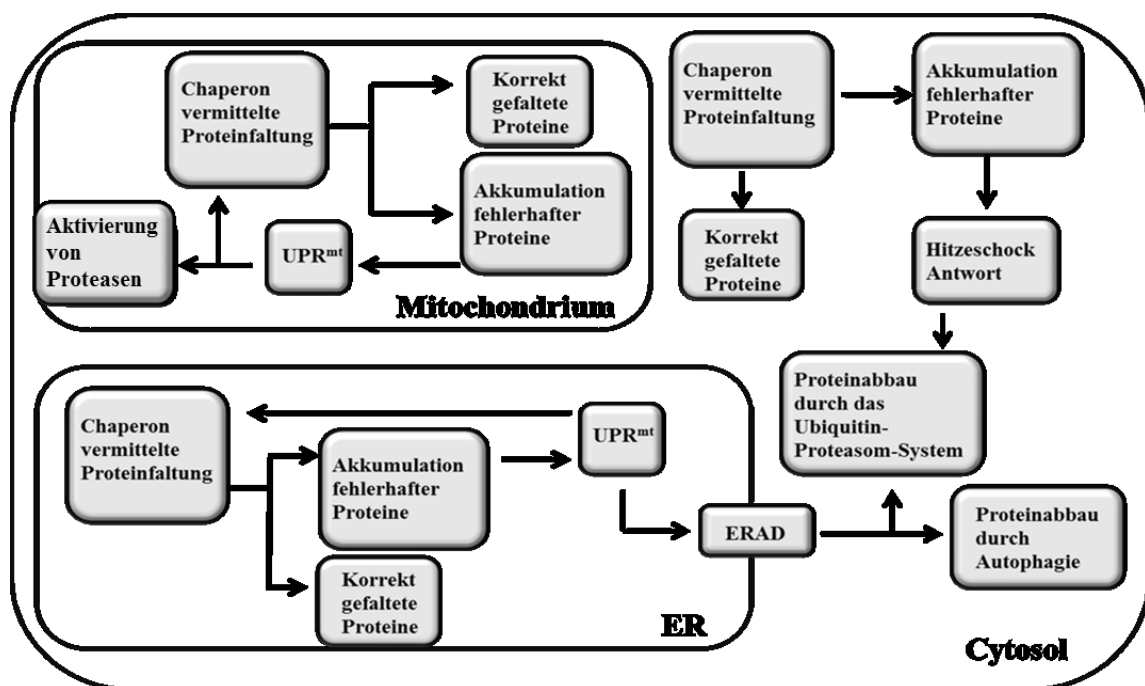


Abbildung 1-3 Zelluläre Proteostase

UPR: *unfolded protein response*, ER: endoplasmatisches Retikulum, ERAD: *ER-associated degradation*, mt: Mitochondrium.

1.3.1 Chaperon-vermittelte Proteinfaltung

Die zelluläre Proteostase hängt maßgeblich von effektiven Chaperonen ab, die bereits die *de novo* Faltung aber auch die Entfaltung und Neufaltung fehlerhafter Proteine unterstützen [118]. Chaperone sind in allen Zellorganellen präsent, in denen Proteine gefaltet werden (siehe Abbildung 1-3). Dazu zählt das Cytoplasma, das ER, die Mitochondrien, die Peroxisomen und der Zellkern [119]. Sie sind neben der Faltung an einer Vielzahl von Aufgaben im Rahmen der Proteinbiogenese beteiligt, wie z. B. der Bildung von Proteinkomplexen, dem Transport von Proteinen, der Membranintegration von Proteinen sowie dem Proteinabbau. Da Chaperone durch Stress, z. B. Hitzestress verstärkt exprimiert werden, wird eine Hauptgruppe der Chaperone als HSPs bezeichnet [118]. Bei HSPs handelt es sich um eine in Eukaryoten hoch konserviert vorkommende Proteingruppe, die wiederum nach ihrem Molekulargewicht aufgeteilt und benannt wird. Hier bildet die Familie der HSP70 den größten Teil [120]. Chaperone besitzen eine ATP- sowie eine C-terminale Peptidbindungsdomäne. Die Faltung erfolgt in Zyklen, die mit der Freisetzung der Proteine unter ATP-Verbrauch enden. Ihre Aktivität wird durch Co-Chaperone, z. B. der HSP40-Familie, beschleunigt und erfordert weitere Co-Faktoren wie z. B. die Nukleotidaustauschfaktoren (*nucleotid exchange factors*, NEFs) [121]. In den Mitochondrien sind sie für die initiale Faltung von neu eingeschleusten Polypeptiden verantwortlich. Neben der HSP70-Familie zählen in Eukaryoten die Chaperone der HSP60-Familie, auch Chaperonine genannt, zu den häufigsten mitochondrialen Chaperonen, die bei zellulärem Stress aktiviert werden. Sie sind Doppelring-artig aufgebaut und weisen eine zentrale Einstülpung auf, die gefaltete und für Aggregationen anfällige Proteine vor der Umgebung schützen [122]. Ähnlich wie die Gruppe der HSP70, falten HSP60-Chaperone Proteine unter ATP-Verbrauch und benötigen Co-Faktoren, wie z. B. Chaperone der HSP10-Familie [123]. Weitere Chaperon-Klassen sind z. B. HSP90 sowie HSP100, eine Klasse, die gefaltete Proteine wieder entfaltet und kleinere Proteinaggregate trennen kann. Als letzte Gruppe sind die kleinen Hitzeschockproteine (*small heat shock proteins*, sHSPs) zu erwähnen, die unspezifisch Proteine vor irreversiblen Aggregationen schützen [122]. Auch im Cytosol prozessierte und gefaltete Proteine werden durch eine Proteinqualitätskontrolle, die sogenannte Hitzeschockantwort geschützt. Diese wird über den Transkriptionsfaktor Hitzeschockfaktor 1 (*heat shock factor 1*, HSF1) reguliert und induziert die Expression von cytosolischen Chaperonen (z. B. HSP70 und HSP90) [124].

1.3.2 Ungefaltete Proteinantwort in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum

Sowohl die Mitochondrien als auch das ER beherbergen Proteinfaltungsmöglichkeiten. Sie werden durch organelleigene Kontrollsysteme überwacht, welche aktiviert werden, wenn die Menge an ungefalteten oder fehlerhaft gefalteten Proteinen stark zunimmt. Diese speziellen Signalwege werden als UPR bezeichnet (siehe Abbildung 1-3) [125].

Auch wenn nur ein Bruchteil der Proteine in den Mitochondrien selbst synthetisiert wird, verfügen Mitochondrien, wie bereits beschrieben (vgl. Kapitel 1.3.1), über die Möglichkeit aufgenommene Proteine zu falten oder bei Bedarf zu entfalten und neu zu falten. Kommt es zu einer Akkumulation ungefalteter oder fehlerhaft gefalteter Proteine in den Mitochondrien, wird eine Signalkaskade aktiviert, die letztendlich bis zum Nukleus geleitet wird und dort die Expression mitochondrialer Chaperone und spezifischer Proteasen induziert. Die mitochondriale Proteostase kann so wieder hergestellt werden. Dieser in den Mitochondrien stattfindende Prozess wird als UPR^{mt} bezeichnet. In humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass durch die Akkumulation fehlerhafter Proteine die Expression Proteostase-spezifischer Proteine, wie z. B. mtHSP60 oder mtHSP10, gesteigert wurde. Zusätzlich kommt es durch mitochondrialen Stress zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der C-Jun-N-terminalen Kinase (JNK), die den Transkriptionsfaktor CHOP (C/EBP homologes Protein) aktiviert. Dass es in der Promotorregion von mtHSPs CHOP-Bindungsstellen gibt, macht die Bedeutung des Transkriptionsfaktors im Rahmen der UPR^{mt} deutlich [124, 126].

Im ER findet die Translation, Faltung und posttranslationale Modifikation von Proteinen statt. Die Überprüfung der Proteinfaltung erfolgt, wie in den Mitochondrien auch, über ein eigenes Proteinqualitätskontrollsystem, die UPR^{ER} [125]. Es gibt eine Vielzahl an Faktoren, welche die ER-Proteostase beeinflussen und letztendlich zu einer Akkumulation fehlerhafter oder ungefalteter Proteine im ER-Lumen führen können. Beispielsweise löst die übermäßige Ansammlung von Proteinen Stress aus, welcher u. a. zu einer verminderten Ca²⁺-Konzentration oder einer veränderten Chaperonaktivität führen kann [127]. Um den ER-Stress zu verringern, kontrolliert das UPR^{ER} die Expression verschiedener Gene, die an der Proteostase, dem Aufbau des ER oder an Proteinabbausystemen beteiligt sind. Dafür interagiert das ER über eine Reihe

spezifischer Transkriptionsfaktoren mit dem Nukleus [128]. Bei ER-Stress werden drei parallel verlaufende Signalkaskaden stimuliert, die mit der Aktivierung der Stresssensoren *inositol-required enzyme 1* (IRE1), *protein kinase RNA-like ER kinase* (PERK) und *activating transcription factor 6* (ATF6) beginnen. Der über IRE1 aktivierte Signalweg ist der am stärksten konservierte innerhalb der UPR. Bei IRE1 handelt es sich um eine Kinase und Endoribonuklease, die nach ihrer Aktivierung die mRNA des *X-box binding protein 1* (XBP1), einen ER-spezifischen Transkriptionsfaktor, so schneidet, dass die *xbp1* mRNA aktiviert und translatiert wird [128]. XBP1 induziert die Transkription verschiedener Proteine des UPR^{ER}, wie z. B. die von Chaperonen, Transportproteinen und Bestandteilen des *ER-associated degradation* (ERAD) - Systems. Das ERAD-System erkennt Proteine, welche die Proteinqualitätskontrolle des ER nicht passieren können und transportiert diese in das Cytosol, wo sie ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut werden [124]. Die UPR^{ER} ist für die Zelle die effektivste Möglichkeit akuten Zellstress zu überwinden und so die eigene Überlebensfähigkeit zu garantieren. Andererseits ist die UPR^{ER} bei chronischem oder nicht-kompensierbarem Stress in der Lage Prozesse wie Autophagie oder Apoptose zu initiieren, die die Beseitigung geschädigter Zellen übernehmen [128].

1.3.3 Proteinabbau über das Ubiquitin-Proteasom-System

Proteine, welche die UPR^{ER} nicht passieren können, werden über das ERAD aus dem ER in das Cytosol transportiert, wo sie vom UPS abgebaut werden können (vgl. Abbildung 1-3). Das UPS ist ein hoch konserviertes System, das den Großteil cytosolischer Proteine abbaut. Dazu zählen regulatorische Proteine, deren Lebensdauer zeitlich begrenzt ist, aber auch fehlerhaft gefaltete oder aggregierte Proteine [129]. Die Degradation der Proteine erfolgt in zwei Schritten (siehe Abbildung 1-4). In einem ersten wird das Substratprotein mittels Ubiquitinierung markiert und in einem zweiten Schritt im 26S-Proteasom abgebaut [130].

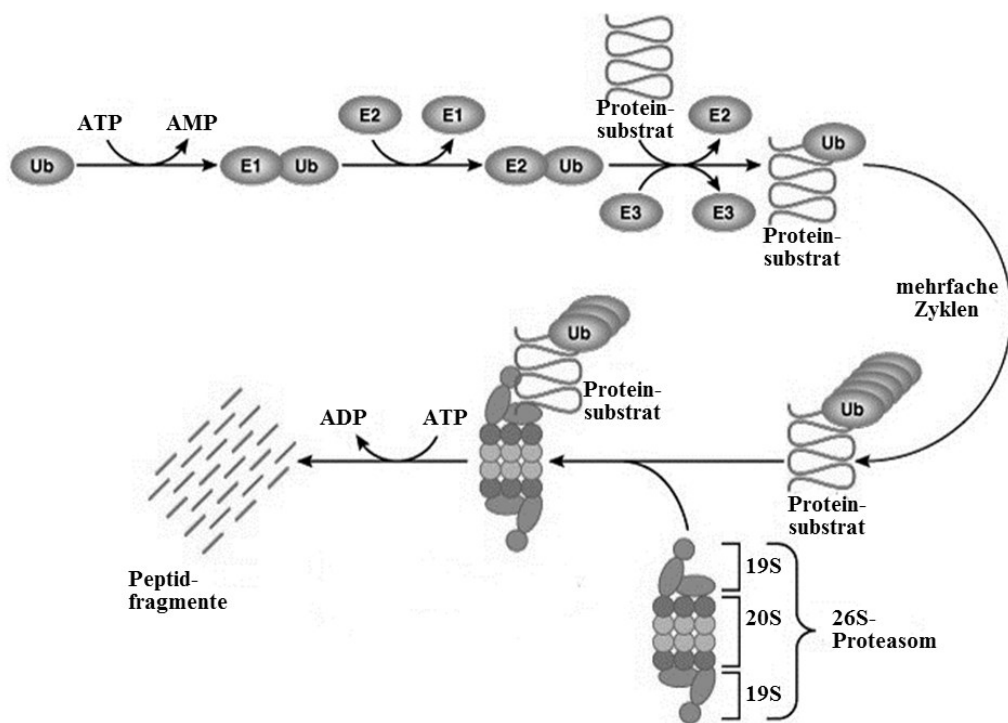


Abbildung 1-4 Ubiquitin-Proteasom-System

Ub: Ubiquitin; E1: Ubiquitin-aktivierende Enzyme; E2: Ubiquitin-konjugierenden Enzymen; E3: Ubiquitinligase; ATP: Adenosintri-phosphat; AMP: Adenosinmonophosphat, ADP: Adenosindiphosphat. (modifiziert nach Cell Signaling Technology®) [131].

Ubiquitin ist ein 76 AS großes Polypeptid, das über sein C-terminales Glycin an die ϵ -Amino-Gruppe von Lysinresten innerhalb der Zielproteine gebunden werden kann. Darüber hinaus kann Ubiquitin auch an Lysinreste bereits gebundener Ubiquitinmoleküle binden. Die so entstehenden Isopeptide bilden eine Polyubiquitinkette, die als Erkennungsmerkmal für das 26S-Proteasom dient [132]. Der

Ubiquitinierungsprozess ist ATP-abhängig und wird von drei Enzymklassen (Ubiquitin-aktivierende Enzyme, Ubiquitin-konjugierende Enzyme und Ubiquitin-Ligasen) vermittelt. Wie in Abbildung 1-4 dargestellt, bindet das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) unter ATP-Verbrauch in einem ersten Schritt Ubiquitin über eine Thioesterbindung. Das so aktivierte Ubiquitin wird in einem zweiten Schritt auf eines von zahlreichen Ubiquitin-konjugierenden Enzymen (E2) übertragen. Im Anschluss daran erfolgt die Isopeptidbindung wie beschrieben an den Lysinrest des Substratproteins. Dieser Schritt erfordert die Aktivität einer Ubiquitinligase (E3). Es sind viele verschiedene E3-Ligasen bekannt, die jeweils nur einige wenige Peptide erkennen und so eine hohe Spezifität gewährleisten [133, 134]. Die markierten Substratproteine können anschließend vom 26S-Proteasom erkannt und abgebaut werden. Das 26S-Proteasom ist ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Proteasekomplex. Das eukaryotische Proteasom besteht aus einer 20S- und zwei 19S-Untereinheiten. Die 20S-Untereinheit bildet das multikatalytische Zentrum. Sie besteht aus zwei äußeren α - und zwei inneren β -Ringen, die wiederum aus jeweils sieben Untereinheiten aufgebaut sind. Die äußeren α -Ringe sind für die Substraterkennung verantwortlich. Die Innenwand der β -Ringe enthält die katalytische Aktivität. Drei ihrer sieben Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$) weisen proteolytische Aktivität auf. Jede dieser Untereinheiten besitzt eine spezifische Aktivität. So spaltet beispielsweise $\beta 5$ nach hydrophoben AS, weshalb hier von Chymotrypsin-ähnlicher Aktivität gesprochen wird [135, 136]. Die 19S-Untereinheiten sitzen wie Deckel auf den Öffnungen der 20S-Untereinheit und regulieren den Einstrom von Substrat in die 20S-Untereinheit. Bisher konnten zwei Ubiquitin-bindende Untereinheiten des 19S-Komplexes identifiziert werden. Sie erkennen ubiquitinierte Proteine, binden diese, entfalten sie und transportieren sie anschließend in den proteolytischen Teil des Proteasoms [136, 137]. Nach dem irreversiblen Abbau des Substrates werden kurze Peptidfragmente, die von cytosolischen Peptidasen weiter abgebaut werden können, sowie Ubiquitin, das der Zelle erneut zur Verfügung steht, freigesetzt [132].

Das Proteasom ist sensibel gegenüber degenerativen Prozessen. So kann eine Abnahme der Proteasomaktivität mit dem Alter beobachtet werden [138]. Aber auch eine Reihe neurodegenerativer Erkrankungen, die mit der Akkumulation und Aggregation fehlerhafter Proteine einhergehen, scheinen das Proteasom zu beeinflussen. Es gibt Hinweise, dass Proteinaggregate, wie z. B. A β -Aggregate im Rahmen der AD, das

Proteasom direkt hemmen. Proteinaggregate begünstigen die intrazelluläre Akkumulation von Ubiquitinaggregaten und führen zum Zellzyklus-Arrest [139]. Weitere Studien konnten zeigen, dass in Neuronen von AD-Patienten die E1- und E2-Aktivitäten deutlich vermindert sind [140]. Auch konnten verminderte UCH-L1-Aktivitäten in Zusammenhang mit AD gebracht werden [108]. Im Gehirn von AD-Patienten wurden vermehrt oxidierte UCH-L1 Moleküle beobachtet, die in ihrer Aktivität stark gemindert waren und so zu einer Beeinträchtigung des proteasomalen Proteinabbaus beitrugen [108]. Die Aufrechterhaltung der zellulären Proteostase wird somit zusätzlich erschwert. Ob die Proteinaggregation Ursache oder Folge einer veränderten Proteasomaktivität darstellt, ist nicht hinreichend geklärt. Bekannt ist jedoch, dass eine verminderte Aktivität des Proteasoms, unabhängig von der initialen Ursache, die Produktion von Proteinaggregaten fördert. Eine gesteigerte Proteinaggregation wiederum würde zusätzlich zu einer weiteren Einschränkung der Proteasomaktivität beitragen [139].

1.3.4 Autophagie

Die Autophagie bezeichnet einen katabolen Prozess, bei dem es zum Abbau zellulärer Bestandteile durch zelleigene Mechanismen kommt. Von einer Doppelmembran begrenzte Autophagosomen nehmen Proteine, cytosolische Bestandteile oder ganze Zellorganellen auf und verschmelzen mit Lysosomen oder Vakuolen in denen Proteasen vorhanden sind, die letztendlich den Proteinabbau verantworten [141]. Autophagie spielt in den unterschiedlichsten zellulären Prozessen eine Rolle, z. B. während des Wachstums und der Entwicklung, aber auch in Stresssituationen wie z. B. unter Nahrungsmangel, bei Mangel an Wachstumsfaktoren, Infektionen oder ER-Stress (vgl. Kapitel 1.3.2) [142]. Die Autophagie spielt eine wichtige Rolle in dem Erhalt der Zellhomöostase, indem sie für die Balance zwischen Proteinsynthese und –degradation sowie für die Wiederverwertung zellulärer Bestandteile verantwortlich ist [143]. In Zellen, die hohem Stress ausgesetzt sind und in denen es zu einer Aktivierung der UPR kommt, hilft die Autophagie diesen Stress zu reduzieren. Damit ist sie neben dem UPS für den Proteinabbau im Rahmen der Proteostase von großer Bedeutung (vgl. Abbildung 1-3) [144]. Eine gestörte Autophagie wird in engen Zusammenhang mit Zelltod gebracht und scheint bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen [141]. Im Rahmen der AD wurde die Akkumulation unreifer autophagischer Vakuolen beobachtet, die wahrscheinlich auf eine verstärkte Aktivierung der Autophagie und ein Defizit in der Reifung dieser zu Lysosomen zurückzuführen ist [145].

Je nachdem, wie die intrazellulären abzubauenen Bestandteile zu den Lysosomen transportiert werden, können drei Wege der Autophagie unterschieden werden (Abbildung 1-5) In Säugetierzellen sind das die Makroautophagie, die Mikroautophagie sowie die Chaperon-vermittelte Autophagie (*chaperone mediated autophagy*, CMA) [144]. In den Lysosomen herrscht ein saures Milieu und die für den Proteinabbau endsprechenden Proteasen und Hydrolasen sind dort angesiedelt [146]. Die einzelnen Arten der Autophagie unterscheiden sich zudem in ihrer Substratwahl sowie ihrer Regulation und in den Auslösern ihrer Aktivierung [144].

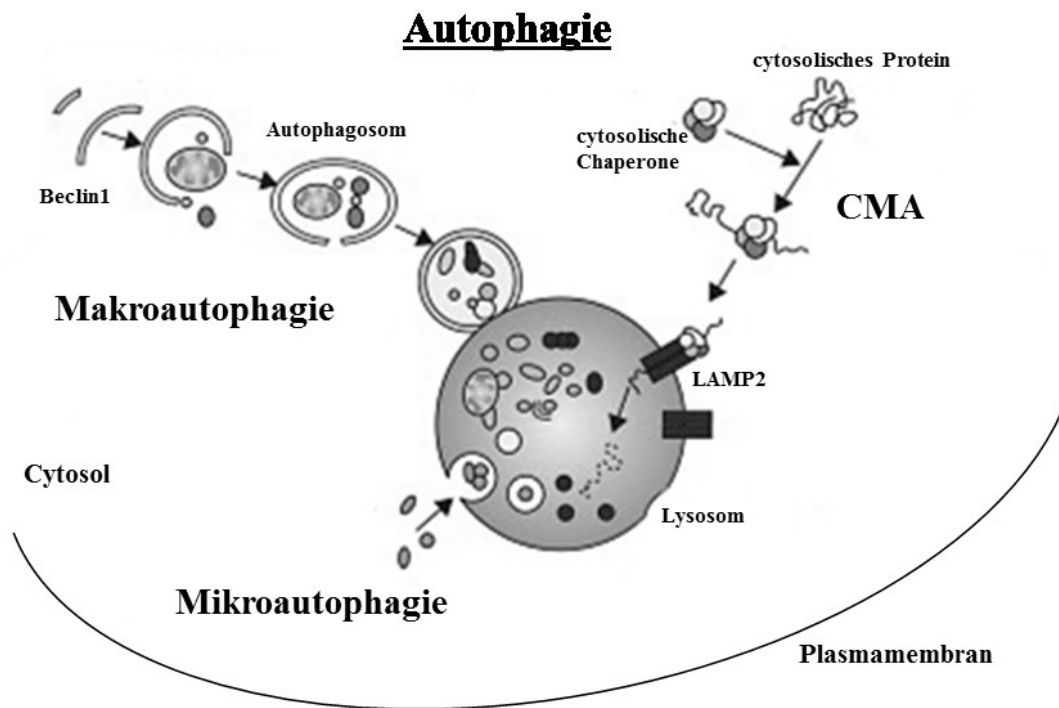


Abbildung 1-5 Schematische Darstellung der Autophagie

CMA: *chaperon mediated autophagy* (modifiziert nach Martinez-Vicente und Cuervo, 2007) [144].

Die Makroautophagie wird typischerweise unter Stressbedingungen aktiviert und dient der Energiegewinnung oder als Möglichkeit fehlerhafte Zellbestandteile abzubauen. Dazu zählen Zellproteine, Kohlenhydrate, Lipide, RNA oder ganze Zellorganellen. Die Makroautophagie umfasst die Bildung von Autophagosomen, welche die abzubauenden Bestandteile umschließen, mit Lysosomen verschmelzen und so einen Abbau durch lysosomale Peptidasen ermöglichen [143]. Die basal ablaufende Makroautophagie unter physiologischen Bedingungen ist sehr gering und bedarf einer Initiierung in Stresssituationen. Die Bildung von Autophagosomen ist von der Aktivierung eines Klasse III Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Komplexes abhängig, des Beclin-1 (BEC1) [141] und der Autophagie-assoziierten Proteine (ATG) 5, 12 und 16, welche der Familie der LC3-Lipasen (*light chain lipase*) angehören. Diese Proteine bilden gemeinsam das Phagophor [147]. Die Initiierung der Autophagosomenbildung wird streng reguliert. Die Funktion von BEC1 wird über das antiapoptotische Protein BCL2 (*B-cell lymphoma*) inhibiert, indem BCL2 unter physiologischen Bedingungen BEC1 bindet und nur bei Bedarf freisetzt [148]. Darüber hinaus wird Autophagie hauptsächlich über die Serin/Threonin Proteinkinase TOR (*target of rapamycin*)

reguliert. Humanes TOR (*mammalian TOR*, mTOR) wirkt hemmend auf den Autophagieprozess, indem es ULK (*unc-51 like kinase*) phosphoryliert. Dephosphoryliertes ULK ist für die Formierung des Phagophorkomplexes nötig und somit verhindert mTOR den initiale Schritt der Autophagosomenbildung. MTOR wird in Gegenwart von Nahrung über den Insulinsignalweg durch Aktivierung des Insulin/IGF (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor, *insulin-like growth factor*) - Rezeptors und einen Signalweg über Klasse I PI3K aktiviert und hemmt so die Autophagie. Bei Energiemangel wird in Abhängigkeit von AMP-aktivierten Proteinkinasen (AMPK) die TSC1 / TSC2 (*tuberous sclerosis*) - Komplexierung aktiviert und so mTOR gehemmt. Dies führt zur Aktivierung der Autophagie [123].

Als erste Reaktion auf Nahrungsknappheit wird die Makroautophagie aktiviert. Hält diese jedoch über längere Zeit an oder ist die Zelle Stress über einen längeren Zeitraum ausgesetzt, wird die CMA aktiviert [149]. Im Rahmen der CMA erkennen cytosolische Chaperone Proteine, die eine spezielle Erkennungssequenz enthalten, binden diese und transportieren sie zu der Oberfläche der Lysosomen. Zu den beschriebenen Chaperonen zählen einige HSP-Familien (HSC70, HSP40, HSP90) sowie das BAG1 (BCL2-assoziierte Protein 1) [150]. Der Komplex aus Chaperon und Substrat bindet an die Lysosomenmembran wo das Substrat mit dem dort sitzenden Lysosomen-assoziierten Membranprotein Typ 2a (LAMP2a) interagiert. Bevor das Protein in das Lysosom importiert werden kann muss es entfaltet werden [151]. Dies geschieht wahrscheinlich durch den Chaperonkomplex selber. Die Aufnahme in die Lysosomen erfolgt mit Hilfe des lysosomalen HSC70 (lyHSC70) [152].

Ein weiterer beschriebener Weg der Autophagie ist die Mikroautophagie. Sie spielt in dem permanent stattfindenden Umbau und Umsatz zellulärer Bestandteile unter physiologischen Bedingungen eine Rolle [144]. Bei dieser Art der Autophagie werden Teile des Cytosols, die die abzubauenen Substrate enthalten, direkt in die Lysosomen aufgenommen, indem sich ein Teil der lysosomalen Membran ins Lysosomenlumen stülpt, sich abschnürt und so die Proteine direkt abgebaut werden können. Allerdings sind keine Zusammenhänge zwischen Mikroautophagie und humanen Erkrankungen bekannt [144].

1.4 Polyphenole und degenerative Prozesse

Wie bereits beschrieben kann das Risiko an AD zu erkranken über Plasmacholesterolspiegel beeinflusst werden [21, 113]. Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass die Entstehung von AD nutritiv beeinflussbar ist. Epidemiologische Studien zeigen, dass eine mediterrane Ernährungsweise protektive Bestandteile enthält, die das Risiko an AD zu erkranken senken [153, 154]. Eine der Hypothesen besagt, dass der Konsum von Olivenöl für die beschriebenen Assoziationen verantwortlich sein könnte. Tatsächlich konnten zwei Hauptbestandteile des Olivenöls, Tyrosol und Hydroxytyrosol, in einer Zellkulturstudie Neuroblastomzellen vor A β -induzierter Toxizität schützen [155]. Darüber hinaus verbesserte das Aglykon des Oleuropeins, welches das Hauptpolyphenol in nativem Olivenöl darstellt, die Gedächtnisfunktion in einem A β -akkumulierendem Mausmodell [156]. Da die mediterrane Ernährung prinzipiell jedoch viele Früchte und viel Gemüse beinhaltet könnten andere Polyphenole ebenfalls bedeutende Inhaltsstoffe sein [157].

Polyphenole gehören zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen mit etwa 10.000 verschiedenen identifizierten Substanzen [158]. In der Natur dienen sie Pflanzen als Farbstoffe zur Anlockung oder Abschreckung, als Bitterstoffe gegen Insektenfraß und als Geruchs- und Geschmacksstoffe. Für die Pflanzen spielen sie aber auch eine wichtige Rolle im Rahmen der Stressabwehr als Antioxidans oder dienen der UV-Absorption [159, 160]. In der menschlichen Ernährung sind Polyphenole weit verbreitet und kommen primär in Obst, Gemüse, Hülsenfrüchten, Schokolade aber auch Tee, Kaffee und Wein vor [161]. Je nach Ernährungsweise beträgt die tägliche Aufnahme von Polyphenolen bis zu 1 g/Tag [162].

Grundsätzlich bestehen die Polyphenole aus einem Phenolring, der mit einem O-heterozyklischen Ring fusioniert ist. Dieser wiederum ist über eine C-C-Bindung mit einem Aromat assoziiert. Die unterschiedliche Anzahl und Position von Hydroxylgruppen und Glykosylierungen an den Ringen ermöglicht eine Einteilung der Polyphenole in verschiedenen Klassen. Die Flavonoide bilden hier die größte und am weitesten verbreitete Gruppe [163]. Dazu zählen die Flavonole wie z. B. das Quercetin (Abbildung 1-6, A), das in Äpfeln und Zwiebeln vorkommt, die Flavanole wie z. B. das Catechin, das vor allem in Tee zu finden ist, die Flavone wie z. B. das Apigenin, das den gelben Farbstoff in Blüten bildet, die Flavanone wie z. B. das Naringenin aus

Zitrusfrüchten, die Isoflavone wie z. B. das Genistein aus Soja und Hülsenfrüchten sowie die Anthocyanidine wie z. B. das Cyanidin, das in Beeren weit verbreitet vorkommt. Des Weiteren gibt es auch Lignane, Tannine und Phenolsäuren [163], ebenso wie Stilbene z. B. das Resveratrol (Abbildung 1-6, B), welches aus zwei Phenolringen, die über eine Methylen-Brücke miteinander verbunden sind, besteht. Resveratrol ist hauptsächlich in der Schale von roten Trauben und somit auch in Rotwein zu finden [164].

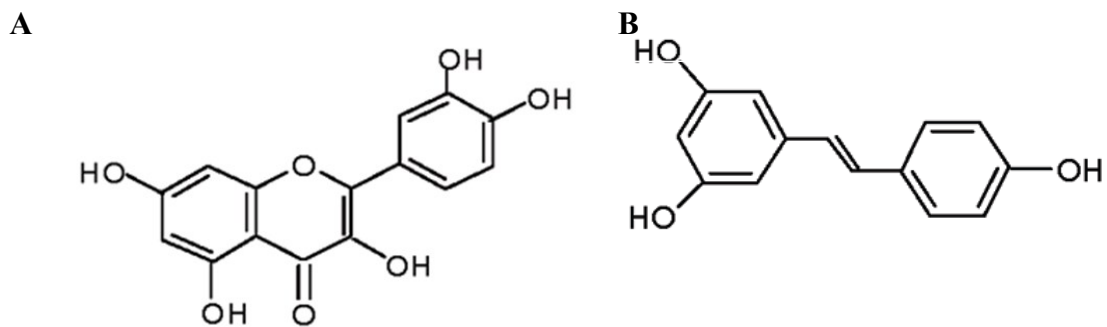


Abbildung 1-6 Chemische Struktur von Quercetin und Resveratrol

Chemische Struktur von Quercetin (A) und Resveratrol (B) [44].

Unterschiedlichste Studien weisen auf eine Rolle von Polyphenolen in der Prävention von neurodegenerativen Erkrankungen hin [161]. So senkte Resveratrol in einer Zellkulturstudie die absolute Menge an dem für AD typischen A β [165] und auch Quercetin konnte in einer Untersuchung an Primärzellen des Hippokampus die A β -induzierte Toxizität senken [166]. Verschiedene Mechanismen werden diskutiert, über die Polyphenole präventiv auf die A β -induzierte Toxizität wirken könnten. Die meisten beschäftigen sich mit ihrer antioxidativen Kapazität, z. B. ihrer Wirkung als Radikalfänger, ihrer Möglichkeit antioxidative Enzyme zu induzieren oder ihrer Möglichkeit mit Übergangsmetallen Chelate zu bilden [167]. Darüber hinaus wurde in neueren Untersuchungen gezeigt, dass Polyphenole weitere wichtige Mechanismen aktivieren. Sie weisen z. B. anti-amyloidogene Wirkungen auf, spielen eine Rolle in zellulären Signaltransduktionsprozessen, zeigen Effekte auf die Telomerlänge und beeinflussen die Expression und Aktivität von Sirtuinen [168]. Da eine verstärkte Aggregation und Fehlfaltung von Proteinen Schlüsselereignisse in der Pathogenese der AD sind, ist es ebenfalls interessant festzuhalten, dass neuere Studien Polyphenolen eine Inhibierung der Bildung toxischer amyloidogener Proteinaggregate zuschreiben [169].

1.5 *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

Mitte der 60er Jahre entdeckte Sydney Brenner in Cambridge/England die im Erdboden frei lebenden Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) [170]. Nematoden stellen die arten- und individuenreichste Gruppe der Metazoen dar [171]. Auch wenn der Großteil der Nematoden frei lebend zu finden ist, zeigen einige Arten parasitäre Lebensweisen. So sind 10% der Nematoden Pflanzenparasiten und weitere 15% Parasiten, die Menschen und Tiere befallen [172]. *C. elegans* ist ein Vertreter der Klasse der *Secernentea* und der Familie der *Rhabditidae* [173]. Die Hauptnahrungsquelle bilden Bakterien, hauptsächlich *Escherichia coli* (*E. coli*).

Brenner etablierte *C. elegans* als Modellorganismus [170] in der biologischen Forschung. Speziell in den Bereichen Genomik, Zellbiologie, Neurowissenschaft und Alterungsforschung wird *C. elegans* eingesetzt. Seit 1998 ist das *C. elegans*-Genom vollständig sequenziert [174]. Es zeigt sich eine große Homologie (ca. 65%) in Bezug auf krankheitsrelevante Gene des Menschen [175]. Neben dem entschlüsselten Genom besitzt *C. elegans* eine Reihe weiterer Vorteile als Modellorganismus. Dazu gehören der einfache Aufbau, ein kurzer Lebenszyklus, eine kurze Generationszeit mit einer hohen Anzahl an Nachkommen, die geringe Größe (ca. 1 mm) und die einfache Kultivierung unter Laborbedingungen [175, 176]. Es gibt zwei Geschlechter, selbstfertilisierende Hermaphroditen (XX) und männliche Tiere (XO). Durch die Selbstfertilisation besteht die Möglichkeit eine homogene Population zu kultivieren [176]. Darüber hinaus ermöglicht die Transparenz der Tiere die Untersuchung zellulärer Ereignisse in Echtzeit. Hier stehen sowohl die Beurteilung phänotypischer Veränderungen, als auch der Einsatz fluoreszenzoptischer Methoden zur *in vivo* Anfärbung zellulärer Kompartimente oder Bestandteile im Fokus [175]. Hinzu kommt eine einfache physische Manipulierbarkeit, welche den Einsatz von Mutanten und transgenen Stämmen oder den Einsatz der RNA-Interferenz (RNAi) als molekulargenetische Methode ermöglicht [177]. Von praktischer Bedeutung ist die Möglichkeit *C. elegans* einzufrieren und wieder aufzutauen, wodurch eine Langzeitlagerung ermöglicht wird [175]. Unter Laborbedingungen kann *C. elegans* mit *E. coli* als Nahrungsquelle sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigmedium kultiviert werden [178].

1.5.1 Anatomie und Physiologie

C. elegans weist einen für Nematoden typischen Aufbau auf (siehe Abbildung 1-7). Der Körper ist zylindrisch, nicht segmentiert aufgebaut und verjüngt sich distal. Er besteht aus einer inneren und einer äußeren Röhre, die durch das Pseudocoelom, die Flüssigkeit der inneren Leibeshöhle, getrennt sind. Die äußere Röhre stellt eine robuste Körperwand dar, welche aus der Kutikula und der Hypodermis besteht. Daran schließen sich das Exkretionssystem, die Neuronen und die Körperwandmuskulatur an. Die innere Röhre beinhaltet den Pharynx, den Intestinaltrakt und in adulten Nematoden die Gonaden. Durch den Aufbau eines Turgordrucks gegen die Außenhülle fungiert das Pseudocoelom als Hydroskelett [176].

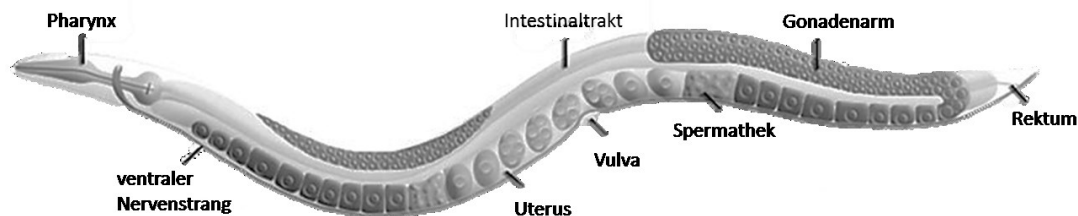


Abbildung 1-7 Anatomie eines Hermaphroditen *Caenorhabditis elegans*

Anatomie eines *C. elegans* Hermaphroditen (modifiziert nach WormAtlas) [176].

Die quergestreifte Körperwandmuskulatur verläuft in vier Quadranten, die sich über die gesamte Länge des Nematoden ziehen. Typischerweise bewegt sich der Wurm in einem sinusoidalen Bewegungsmuster fort. Neben der quergestreiften Muskulatur gibt es längsgestreifte Muskulatur an Pharynx, Darm, Anus, Uterus, Gonadenscheide und Vulva. Die Muskulatur ist mit dem Nervensystem verbunden. Dies ermöglicht die koordinierte Bewegung der Muskeln in dorsale und ventrale Richtung. Das Nervensystem lässt sich in das pharyngeale und das somatische einteilen. Das somatische Nervensystem besteht aus 282 Neuronen und befindet sich zwischen Hypodermis und der Körperwandmuskulatur. Insgesamt besitzt der Hermaphrodit 302 Neuronen, die in der Kopf- und Schwanzregion Ganglien formen. Hinzu kommen 56 Gliazellen, welche die Neuronen umgeben und schützen. Die Hauptaufgabe des Nervensystems besteht in der Innervation der quergestreiften Muskulatur der Körperwand [176]. Darüber hinaus ermöglichen diese neuronalen Strukturen die Entwicklung von Sinneseindrücken, die zu einer Reihe von Verhaltensmustern

beitragen wie z. B. die Reaktion auf Berührung, die Bewegung in die Richtung einer Nahrungsquelle und das Aversionsverhalten [175].

C. elegans nimmt Nahrung über den in zwei Bulbi geteilten Pharynx auf. Die aufgenommene Nahrung wird im hinteren Teil des Pharynx konzentriert, dort durch den *Grinder*, ein Mahlwerkzeug, zerkleinert und über das pharyngeale Ventil in das Intestinum transportiert. Über ein Rektalventil erfolgt die Exkretion des Darminhaltes nach der Intestinumpassage. Das Intestinum besteht aus 20 Epithelzellen, die einen großen Zellkern, ein ausgedehntes raues ER mit vielen Ribosomen sowie eine Vielzahl an Mitochondrien aufweisen. Apikal bilden sie eine Bürstensaummembran mit vielen Mikrovilli aus. Die Hauptfunktion der Intestinalzellen ist die Sezernierung von Verdauungsenzymen und die Absorption von Nährstoffen aus dem Darmlumen. Ähnlich wie die Muskelzellen spielen die Darmzellen auch eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel der Nematoden. Im Gegensatz zu höheren Organismen, bei denen verschiedene Funktionen von verschiedenen Organen ausgeführt werden, zeigt die Vielzahl an Funktionen, die vom Intestinum in *C. elegans* ausgeübt werden, dessen zentrale Bedeutung [176].

Das reproduktive System eines Hermaphroditen setzt sich aus den somatischen Gonaden, der Keimbahn und dem Eiablageapparat zusammen. Die beiden symmetrischen U-förmigen Gonadenarme sind über die Spermathek mit dem zentralen Uterus verbunden. Die Oozyten werden in der Spermathek befruchtet, reifen im Uterus und werden über die Vulva abgelegt [176].

Der Lebenszyklus von *C. elegans* verläuft, wie in Abbildung 1-8 dargestellt, über die Embryogenese und vier Larvenstadien (L1 – L4) bis zum adulten Stadium. Am Ende eines jeden Larvenstadiums erfolgt eine Häutung, bei der die Kutikula durch eine neue, stadiumsspezifische ersetzt wird. Die Embryogenese kann in Proliferation und Morphogenese unterteilt werden. Der erste Teil der Embryogenese, die Proliferation, besteht aus der allerersten Zellteilung bis hin zu etwa 550 undifferenzierten Zellen. Erreicht der Embryo das 30-Zell-Stadium erfolgt die Eiablage. Anschließend setzt sich die Proliferation und Morphogenese *ex utero* weiter fort. 13 h nach der ersten Zellteilung schlüpft der Embryo [176].

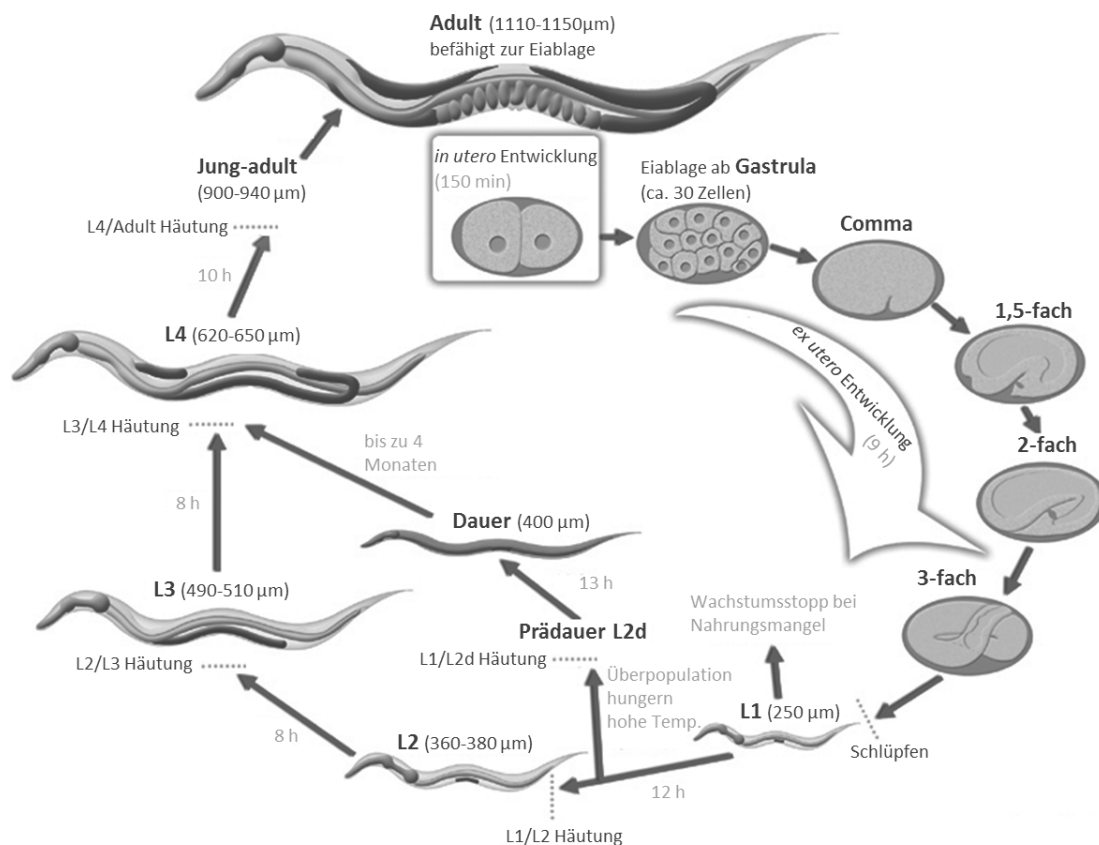


Abbildung 1-8 Lebenszyklus von *C. elegans* bei 22°C

Der Lebenszyklus von *C. elegans* setzt sich aus der Embryogenese (*in utero* und *ex utero* Entwicklung), den Larvenstadien (L1-L4) sowie dem adulten Stadium zusammen. Bei Nahrungsmangel im L1-Stadium stellt *C. elegans* seine Entwicklung ein und setzt diese erst bei Nahrungsangebot wieder fort. Bei ungünstigen Umweltbedingungen ist *C. elegans* in der Lage einen alternativen Entwicklungsweg über das Dauerstadium zu beschreiten. Die jeweiligen Stadien sind mit Name und Größe der Nematoden angegeben. Die zeitliche Dauer der einzelnen Entwicklungsschritte ist neben den Pfeilen kenntlich gemacht (modifiziert nach WormAtlas) [176].

In Gegenwart von ausreichend Nahrung beginnt 3 h nach dem Schlüpfen die postembryonale Entwicklung [176]. Das Zellteilungsmuster ist zwischen den Individuen identisch [179]. Bei mangelndem Nahrungsangebot stellt die geschlüpfte L1-Larve die Entwicklung vollkommen ein. Dieses Stadium kann bis zu 10 Tage andauern. Verbessert sich das Nahrungsangebot, tritt die Larve wieder in die postembryonale Entwicklung ein [180]. Ungünstige Umweltfaktoren, wie die Gegenwart von Pheromonen, Nahrungs- oder Platzknappheit sowie hohe Temperaturen vor Eintritt in das L2-Stadium, führen dazu, dass Larven in das sogenannte Dauerstadium übergehen [181]. Dabei stellen sie ihre Nahrungsaufnahme und Bewegung vollständig ein. Verbessern sich die Bedingungen, nimmt die Dauerlarve ihre Entwicklung wieder auf und häutet sich innerhalb von 10 h direkt zu einer L4-Larve. Die Länge des Dauer-

stadiums beeinflusst die Lebensspanne nicht und wird daher als Nicht-Alterungsstadium bezeichnet [176]. Ohne Durchschreiten des Dauerstadiums beendet der Nematode etwa 45 – 50 h nach dem Schlüpfen und bei einer Temperatur von 22 – 25°C den dreitägigen Reproduktionszyklus und erreicht das jung-adulte Stadium. Ein jung-adulter Hermaphrodit besteht aus exakt 959 somatischen Zellen, ein Männchen aus 1.031 [182]. Der fertile Hermaphrodit legt vier Tage lang Eier. Über Selbstfertilisation produziert er auf diesem Wege ca. 300 genetisch identische Nachkommen. Die Anzahl der Spermien ist hierfür der limitierende Faktor. Durch Paarung mit Männchen kann die Anzahl der Nachkommen auf 1.200 – 1.400 gesteigert werden. Nach Abschluss der reproduktiven Phase leben die adulten Hermaphroditen unter standardisierten Laborbedingungen noch bis zu 15 Tage [176].

1.5.2 *C. elegans* Alzheimer-Modell CL2006

Der Wildtyp des Nematoden *C. elegans* weist natürlicherweise Homologien zu bedeutenden Alzheimer-assoziierten Genen auf. Dazu zählt das Ortholog des humanen APPs, *apl-1* (*amyloid-precursor like*), welches in den meisten Geweben exprimiert wird und für das Überleben der Nematoden essentiell ist [183, 184]. Ebenso besitzt *C. elegans* zwei homologe α -Sekretase-Gene, das *sup-17* (*supressor*) und das *adm-4* (*ADAM (disintegrin plus metalloprotease) family*) [185]. Auch sind in *C. elegans* Homologe für alle γ -Sekretase-Komplexe, wie z. B. die Präsenilinhomologe *hop-1* (*homolog of presenilin*) und *sel-12* (*suppressor/enhancer of lin-12*), zu finden [186]. Für die Bildung des Alzheimer-typischen A β fehlt dem Nematoden jedoch die β -Sekretase [187]. In Rahmen der Alzheimerforschung wurden verschiedene *C. elegans* Mutanten hergestellt, die Mutationen in den entsprechenden AD-relevanten Genen enthalten. Allerdings kann in diesen Modellen die Bedeutung des für die AD-Diagnose unabdingbaren A β nicht ermittelt werden. Daher wurden transgene *C. elegans* Stämme, die humanes A β exprimieren, hergestellt. In dieser Arbeit wurde der transgene *C. elegans* Stamm CL2006 verwendet. CL2006 enthält ein Minigen für das humane A β_{1-42} , welches im adulten Stadium unter der Kontrolle eines Muskelpromotors *unc-54* (*uncoordinated*) exprimiert wird [188]. Zusätzlich ist wichtig festzuhalten, dass es sich bei dem letztendlich entstehenden A β um ein 3-42 Bruchstück handelt. *In vitro* Analysen haben gezeigt, dass A β_{3-42} schneller aggregiert als A β_{1-42} , sich zu fibrillären Strukturen

formiert und zusätzlich die A β ₁₋₄₂ Aggregation fördert [189]. Das exprimierte A β akkumuliert intrazellulär im Cytosol und den Organellen der Muskelzellen [188], wodurch die neuromuskuläre Transmission gehemmt wird [190], was zu einer Paralyse der Nematoden führt. Paralyisierte Nematoden reagieren auf eine Berührung lediglich mit einer Bewegung des Kopfes und nicht mehr mit dem ganzen Körper [188].

1.5.3 Steroid-Signalweg in *C. elegans*

C. elegans ist auxotroph für Steroide, d. h. Cholesterol muss exogen durch die Nahrung aufgenommen werden und kann nicht endogen synthetisiert werden. Für die Entwicklung von *C. elegans* ist Cholesterol essentiell und spielt sowohl für den Übertritt in das Dauerlarvenstadium als auch bei der Häutung eine wichtige Rolle [191].

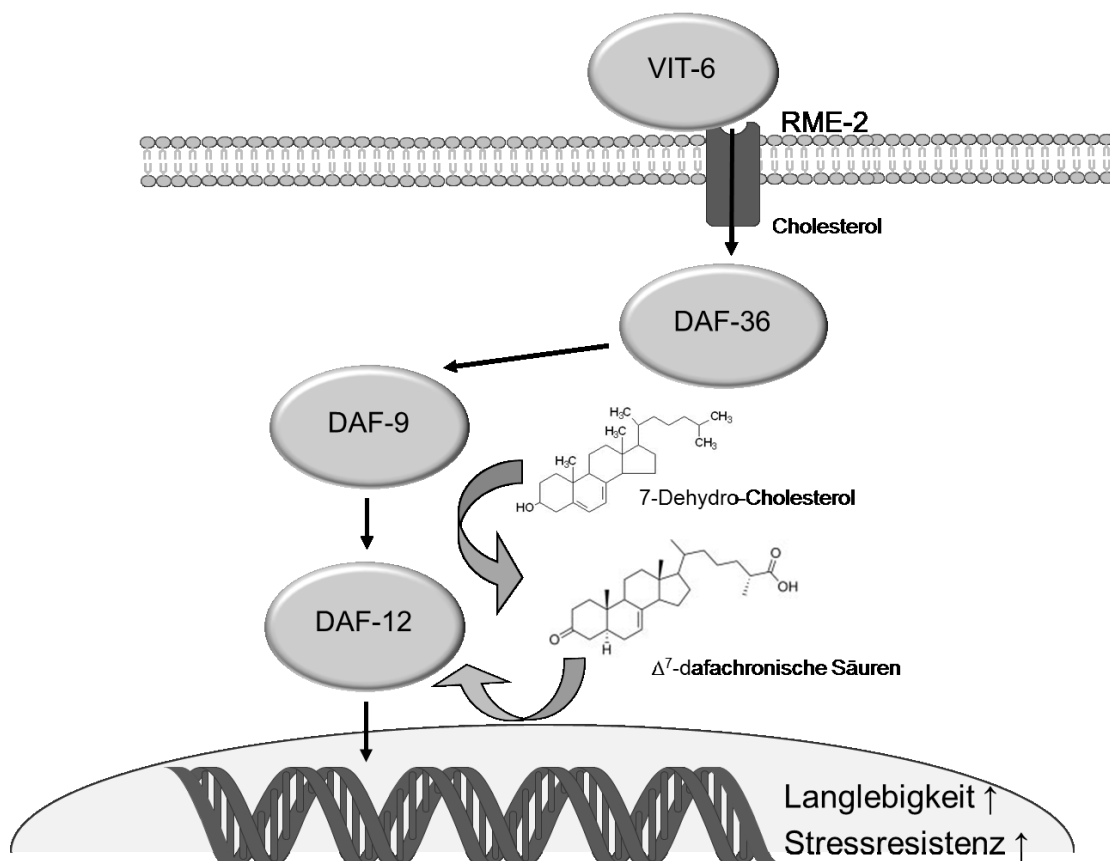


Abbildung 1-9 Schematische Darstellung des Steroid-Signalweges in *C. elegans*

VIT-6: Vitellogenin 6; RME-2: receptor-mediated endocytosis; DAF: abnormal dauer formation.

Der Transport von Cholesterol erfolgt in *C. elegans* Vitellogenin-vermittelt (Abbildung 1-9). Vitellogenine sind Hauptbestandteil der Eidotterproteine und werden ubiquitär in allen eierlegenden Tieren gebildet. Sie dienen wachsenden Embryonen als Nährstoffquelle [192] und weisen eine enge evolutionäre Verwandtschaft zum humanen ApoB100 auf, sowohl strukturell als auch funktionell. Andere Apolipoproteine, z. B. das ApoE, sind für *C. elegans* nicht beschrieben [193]. In *C. elegans* sind sechs für Vitellogenine kodierende Gene bekannt; *vit-1* bis *vit-6* [194]. Die cholesteroltransportierenden Vitellogenine werden über den membranständigen Rezeptor RME-2 (*receptor-mediated endocytosis*), ein dem humanen LDL-Rezeptor homologes Protein, in die Zellen aufgenommen [195]. Hier wird das Cholesterol freigesetzt und aktiviert einen steroidalen Signalweg. In einem ersten Schritt wird Cholesterol durch DAF-36 (*abnormal dauer formation*, DAF), eine Rieske-ähnliche Oxygenase, zu 7-Dehydrocholesterol oxidiert. Anschließend wird dieses durch das Cytochrom P450-abhängige Enzym DAF-9 zu dafachronischen Säuren (*dafachronic acid*, DA) umgewandelt, indem es am C26-Terminus oxidiert wird. DAF-9 ist das strukturelle und funktionelle Ortholog zum humanen CYP27, welches in die Gallensäuresynthese involviert ist [196]. DAs sind C27-Steroide, die als Liganden des nukleären Hormonrezeptors DAF-12 fungieren. DAF-12 weist Homologien zum humanen Vitamin-D-Rezeptor auf und agiert als Transkriptionsfaktor. Das durch die Liganden aktivierte DAF-12 wandert in den Zellkern und aktiviert Gene der Stressresistenz und des Wachstums [197, 198]. Darüber hinaus aktiviert der DAF-9/DAF-12 steroidale Signalweg die Reproduktion, den Übergang in das Dauerstadium und, bei Ausbleiben von Signalen aus der Keimbahn nach deren Entfernung, über eine Interaktion mit dem Insulin/IGF-1 Signalweg, die Langlebigkeit [199].

1.5.4 Insulin-Signalweg in *C. elegans*

C. elegans exprimiert einen einzigen dem humanen Insulin-/IGF-1-Rezeptor homologen Rezeptor, DAF-2 [200]. Nachdem Insulin-ähnliche Liganden den DAF-2-Rezeptor binden, wird intrazellulär eine Phosphorylierungskaskade aktiviert (Abbildung 1-10). In einem ersten Schritt wird das PI3K-Homolog, AGE-1 (*ageing alterations*), aktiviert [201], welches wiederum verschiedene Kinasen, wie z. B. die AKT-1 (*AKT kinase family*), induziert [202]. Letztendlich phosphoryliert diese Kinase DAF-16 und inaktiviert es somit. DAF-16 ist das *C. elegans* Homolog zur Familie der humanen FOXO (*forkhead box O*) Transkriptionsfaktoren. In phosphoryliertem Zustand ist DAF-16 inaktiv und verbleibt im Cytosol. Ist der Insulin-Signalweg gehemmt, was z. B. bei der Kalorienrestriktion der Fall ist, liegt DAF-16 dephosphoryliert vor und wandert in den Zellkern, wo die Transkription von Genen, die Stressresistenz und Langlebigkeit bewirken, induziert wird [203, 204].

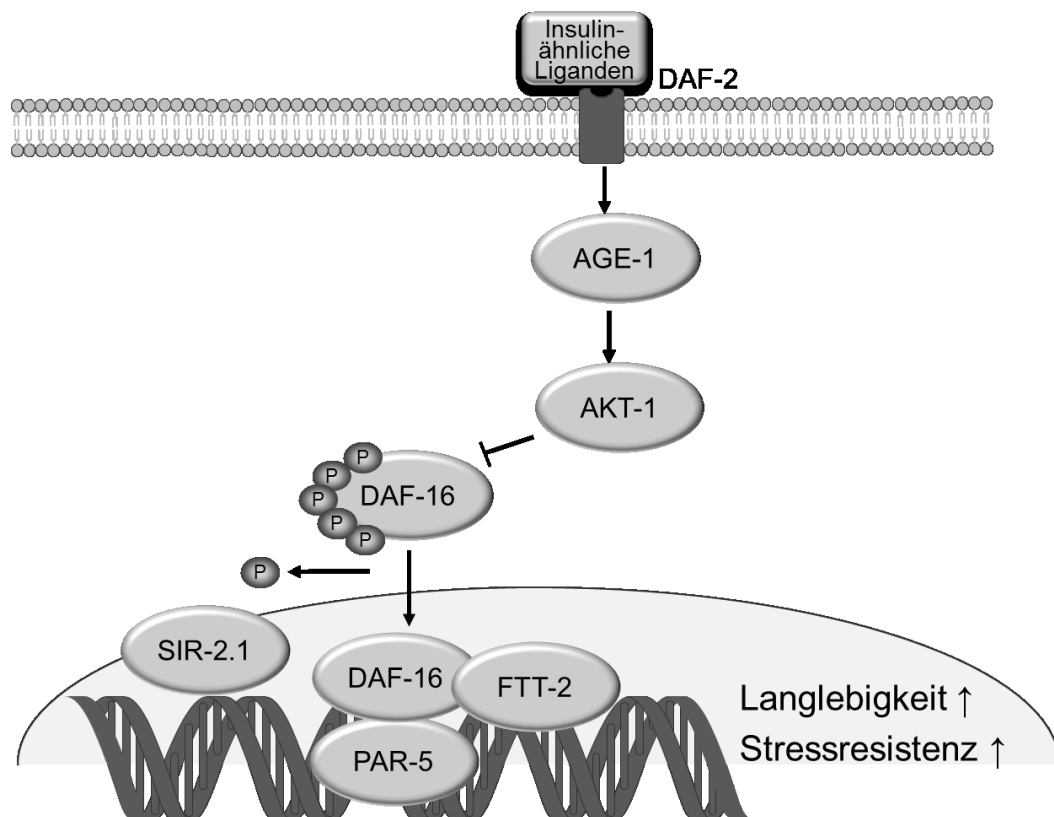


Abbildung 1-10 Schematische Darstellung des Insulin-Signalweges in *C. elegans*

DAF: *abnormal DAuer Formation*; AGE: *AGEing alterations*; AKT: *AKT kinase family*; PAR: *abnormal embryonic PARTitioning of cytoplasm*; FTT: *Forteen-Three-Three family*; SIR: Sirtuin.

Um transkriptionell aktiv zu sein interagiert DAF-16 mit verschiedenen Co-Faktoren. Dazu gehören die 14-3-3 Protein-Homologe FTT-2 (*fourteen-three-three family*) und PAR-5 (*abnormal embryonic partitioning of cytoplasm*) [203, 204]. Neben den 14-3-3 Proteinen interagiert DAF-16 mit einem weiteren Co-Faktor, dem Sirtuinhomolog SIR-2.1. Gemeinsam scheinen sie einen Komplex zu bilden, der zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität von DAF-16 führt [205]. Darüber hinaus interagiert DAF-16 mit dem stromabwärts des Steroid-Signalwegs liegenden Transkriptionsfaktor DAF-12. Es wird postuliert, dass unbeladenes DAF-12 zur Dephosphorylierung von DAF-16 und somit zu dessen Aktivierung führt. Die Folge ist eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität von DAF-16 [197].

1.5.5 Bedeutung der Sirtuine in *C. elegans*

Sirtuine spielen in *C. elegans* vor allem in der Verlängerung der Lebensspanne eine wichtige Rolle. So wird z. B. davon ausgegangen, dass die Verlängerung der Lebensspanne durch Kalorienrestriktion über die Aktivierung des *C. elegans* Sirtuins SIR-2.1 abläuft [206]. Auch konnte gezeigt werden, dass der über Polyphenole, z. B. über das Resveratrol, vermittelte lebensverlängernde Effekt auf eine SIR-2.1-Aktivierung zurück zu führen ist [207]. In *C. elegans* sind vier Sirtuine, SIR-2.1 bis SIR-2.4, bekannt, wobei SIR-2.1 die größte Homologie zum humanen SIRT1 aufweist. Für die lebensverlängernde Wirkung von SIR-2.1 wird der FOXO Transkriptionsfaktor DAF-16 benötigt [208]. Auch wird angenommen, dass die 14-3-3 Proteine FTT-2 und PAR-5 hierbei involviert sind. SIR-2.1 scheint gemeinsam mit DAF-16, FTT-2 und PAR-5 einen Komplex zu bilden, der letztendlich zur Transkription von Stressresistenzgenen führt, die die Lebensspanne beeinflussen [205]. Allerdings wird ebenfalls vermutet, dass SIR-2.1 unabhängig von DAF-16 Einfluss auf die Proteostase des ER hat und diese mit reguliert. Eine Theorie besagt, dass SIR-2.1 Proteine der ABU (*activated in blocked UPR*) - Familie hemmt und dass dieses durch Resveratrol wieder aufgehoben werden kann [207].

1.5.6 Proteostase in *C. elegans*

C. elegans ist in der Lage sich den unterschiedlichsten Stresssituationen anzupassen. Dazu zählt auch zellulärer Stress ausgelöst durch die Akkumulation fehlerhafter Proteine in den Mitochondrien und dem ER, wie er im Rahmen von neurodegenerativen Prozessen auftritt. Ähnlich wie der Mensch besitzt der Nematode eine zelluläre Proteinqualitätskontrolle, die es ihm ermöglicht die Proteostase aufrecht zu erhalten. Für die korrekte Faltung und Stabilisierung von Proteinen sind Chaperone verantwortlich. Die Kontrolle und Regulation dieser wird von HSPs, der UPR^{mt} und der UPR^{ER} vermittelt. Zuletzt wird das UPS und die Autophagie als Möglichkeit Proteine abzubauen aktiviert [209].

1.5.6.1 Proteinfaltung und Chaperone in *C. elegans*

Zentrale Proteine, die in *C. elegans* an der Proteinfaltung in den Mitochondrien beteiligt sind, sind die mitochondrialen Chaperone HSP-6 und HSP-60. Sie sind homolog zu humanen HSP70- und HSP60-Chaperonen. Die Aktivität und Transkription von *hsp-6* und *hsp-60* wird durch Stresssituationen, die eine korrekte Faltung von Proteinen hemmen oder erschweren, sowie bei Akkumulation fehlerhafter Proteine initiiert. Dies ist ein Hinweis für das Vorhandensein einer UPR^{mt} in *C. elegans* [210, 211]. *Hsp-6* und *hsp-60* sind für die mitochondriale Funktion in *C. elegans* essentiell und führen bei verminderter Expression zu Alterungs-ähnlichen degenerativen Prozessen [212].

1.5.6.2 Ungefaltete Proteinantwort in *C. elegans*

Ein postulierter Mechanismus der UPR^{mt} in *C. elegans* besagt, dass ungefaltete oder fehlerhaft gefaltete mitochondriale Proteine durch die mitochondriale Matrix AAA+ Protease CLPP-1 (*caseinolytic peptidase family*) zu Peptiden abgebaut werden und anschließend mittels des ABC-Transporters HAF-1 (*HAIF transporter (PGP-related)*) in das Cytosol geschleust werden [213, 214]. Als Folge kommt es zu einer verstärkten Expression der Transkriptionsfaktoren *ubl-5* (*ubiquitin-like protein*) und *dve-1* (*defective proventriculus in Drosophila homologue*). Diese bilden wahrscheinlich einen Komplex, translozieren in den Zellkern und aktivieren dort die Transkription der

mitochondrialen Chaperone *hsp-6* und *hsp-60* [213, 215]. Die Folge der aktiven UPR^{mt} ist eine wieder hergestellte Proteostase in den Mitochondrien.

Neben der UPR^{mt} gibt es, analog zum Menschen, auch in *C. elegans* eine spezifische UPR als Antwort auf ER-Stress. Die UPR^{ER} wird über IRE-1, das PERK Kinasehomolg PEK-1 sowie ATF-6 vermittelt. Eine zentrale Rolle nimmt hierbei der IRE-1-Signalweg ein. Aufgrund des Spleißens der mRNA von *xbp-1* durch IRE-1 entsteht der funktionelle bZip (*basic leucine-zipper*) Transkriptionsfaktor XBP-1. Dieser bindet an Zielgene der DNA, die für Chaperone, Proteine der Proteinbiosynthese und Komponenten des ERAD-Systems kodieren und somit die Proteostase wieder herstellen [213, 216]. Kommt es zu einer Blockade des IRE-1/XBP-1-Signalweges, wird eine weitere Gruppe von UPR^{ER}-assoziierten Genen aktiviert. Dazu zählt die Familie der *abu*-Gene. Sie bestehen aus neun miteinander eng verwandten Transmembranproteinen, z. B. ABU-1 und ABU-11, und sie scheinen eine Rolle bei blockierter UPR^{ER} zu spielen. Es gibt allerdings Hinweise, dass sie auch unter physiologischen Bedingungen aktiv sind [217].

1.5.6.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System in *C. elegans*

Analog zu dem für Menschen beschriebenen Proteinabbau über das UPS findet auch ein Proteinabbau in *C. elegans* statt. *C. elegans* besitzt zwei Ubiquitinhomologe, das *ubq-1* und das *ubq-2* [218]. *Ubq-1* kodiert für ein 838 AS umfassendes, aus 11 Tandem-Ubiquitinsequenzen bestehendes Peptid, das posttranslational in einzelne, 76 AS große Ubiquitinmoleküle gespalten wird [219, 220]. *Ubq-1* und *ubq-2* sind essentiell für Wachstum und Entwicklung. So führt eine, z. B. durch RNAi erreichte, verminderte Expression dieser zu einem tödlichen Entwicklungsstopp der Larve. Bei adulten Würmern bedingt der Funktionsverlust lediglich einen Zellarrest während der Meiose [221, 222]. Die genaue Bedeutung der einzelnen *ubq*-Gene ist nicht bekannt, da aufgrund ihrer Homologie davon auszugehen ist, dass die RNAi jeweils zu einer verminderten Expression beider Gene führt [223]. In *C. elegans* ist ein einziges Ubiquitin-aktivierendes Enzym, UBA-1, beschrieben. UBA-1 ist für die Aktivierung des Ubiquitins verantwortlich und somit für den initialen Schritt des Proteinabbaus durch das Proteasom. Es wäre zu vermuten, dass eine fehlende UBA-1-Aktivität den gesamten Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau inaktiviert. Jedoch führte die RNAi von

uba-1 zwar auch zu einem Wachstumsstop während der Larvenentwicklung, allerdings ist dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt wie mit *ubq-1* RNAi [224]. Die mit Ubiquitin markierten Proteine werden über das 26S-Proteasom abgebaut. Es besteht aus 14 Untereinheiten, die den 20S-Komplex bilden sowie aus weiteren 18 Untereinheiten, die sich zum 19S-Komplex zusammensetzen [225].

1.5.6.4 Autophagie in *C. elegans*

Es wird angenommen, dass Autophagie ähnlich wie im Menschen in *C. elegans* eine wichtige Rolle in der Anpassung an Stress und degenerative Prozesse, der Beseitigung toxischer Proteinaggregate, im Rahmen des Zelltods, aber auch im Zellwachstum und der Reproduktivität spielt. Die Autophagie scheint in einem geringen Umfang permanent abzulaufen, kann jedoch unter Stressbedingungen, z. B. bei ER-Stress, verstärkt induziert werden. Da es in *C. elegans* Orthologe zu Autophagie-relevanten Genen in Hefen und Menschen gibt, wird angenommen, dass der Autophagieprozess hier ähnlich verläuft [226].

Das für die Makroautophagie essentielle Beclin1 ist ebenfalls in *C. elegans* zu finden. Dessen Homolog BEC-1 ist zusammen mit dem PI3K-homologen Protein LET-512 für die initiale Bildung der Autophagosomen verantwortlich [227, 228]. Für die Elongation und die Fertigstellung der Autophagosomen sind die ATG-Homologe LGG-1 (*LC3, GABARAP and GATE-16 family*) und LGG-2 verantwortlich [229]. Der Prozess der CMA ist für *C. elegans* funktionell nicht beschrieben. Jedoch sind zwei Strukturhomologe, *Imp-2 (LAMP (lysosome-associated membrane protein) homolog)* und *unc-46*, des humanen Transmembranproteins LAMP2, das in Säugerzellen für die Aufnahme von Proteinen im Rahmen der CMA in die Lysosomen verantwortlich ist, beschrieben. Eine funktionelle Homologie konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden [230].

2 ZIELSETZUNG

Morbus Alzheimer (AD) zählt zu den neurodegenerativen Erkrankungen und ist die am weitesten verbreitete Form der Demenz. AD ist gekennzeichnet durch das Auftreten seniler Plaques im Gehirn, die sich aus β -Amyloid ($A\beta$) - Aggregaten zusammensetzen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein transgener Stamm CL2006 des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) als Alzheimer-Modell herangezogen. CL2006 exprimiert das humane $A\beta_{1-42}$ und zeigt mit der Paralyse einen spezifischen Phänotypen. Zunächst sollten die molekularen Grundlagen aufgeklärt werden, über welche die $A\beta$ -induzierte Paralyse vermittelt wird. Anschließend sollten Möglichkeiten aufgezeigt werden wie diese Prozesse durch Polyphenole beeinflussbar sind und welche molekularen Mechanismen dem zugrunde liegen.

In einem ersten Teil wurde zunächst grundlegend geklärt, ob das Transgen-induzierte $A\beta$ tatsächlich die Ursache für die Paralyse in CL2006 darstellt. Da Polymorphismen des Apolipoprotein E (ApoE) mit AD assoziiert werden, lagen bei den Untersuchungen AD-assoziierter Gene mit Einfluss auf die Paralyse, Gene mit Einfluss auf den Cholesteroltransport und die Cholesterolverversorgung der Zelle sowie dessen Wirkweise im Fokus. Entsprechend wurde mittels RNA-Interferenz (RNAi) die Expression der in den Steroid-Signalweg involvierten Gene vermindert und deren Bedeutung für die Paralyse ermittelt. Darüber hinaus wurde die nutritive Beeinflussbarkeit durch eine verminderte Cholesterolgabe eruiert. Die Bedeutung des Insulin-Signalweges und dessen Interaktion mit DAF-16 wurden nachfolgend betrachtet.

Da AD eine durch toxische Proteinaggregate gekennzeichnete Erkrankung ist, ging der zweite Teil der vorliegenden Arbeit der Frage nach, welche Bedeutung Gene der Proteostase für die Paralyse in CL2006 haben. Dazu wurden zentrale Gene der ungefalteten Proteinantwort in den Mitochondrien (UPR^{mt}) und im endoplasmatischen Retikulum (UPR^{ER}), des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) sowie der Autophagie mittels RNAi vermindert exprimiert und im Anschluss daran die Paralyse ermittelt.

Abschließend wurde basierend auf diesen Grundlagen untersucht, ob die Polyphenole Quercetin, aus Zwiebeln und Äpfeln, und Resveratrol, aus Rotwein, Einfluss auf die $A\beta$ -induzierte Toxizität in CL2006 haben. Dazu wurde die Beeinflussbarkeit der zentraler Mechanismen der Proteostase durch Polyphenole betrachtet.

3 MATERIAL UND METHODEN

Die in dieser Arbeit verwendeten *C. elegans*- und Bakterienstämme sowie die eingesetzten Materialien, Chemikalien und Geräte sind unter Angabe des Herstellers sowie der Artikelnummer in Kapitel 9 (Anhang) aufgeführt. Auch die Zusammensetzungen der für die Arbeit selbst hergestellten Puffer und Lösungen sind dort tabellarisch dargestellt.

3.1 Kultivierung von *C. elegans*

Alle *C. elegans* Stämme wurden auf mit konzentrierter *E. coli* OP50 Tagkultur beschichteten NGM (*nematode growth medium*) - Agar-Platten kultiviert. Um ein Verhungern der Würmer zu verhindern, wurden diese regelmäßig auf frische Platten überführt. Mit einem sterilen Skalpell wurde dazu ein Stück Agar herausgeschnitten und kopfüber auf eine neue Platte gesetzt. Die Kultivierung der Würmer erfolgte bei 20°C.

Um die Würmer dauerhaft zu lagern wurden Platten mit angehungerten Larven (L1- und L2-Stadium) mit Einfrierpuffer A (Tabelle 9-13) gewaschen. Anschließend wurde die gleiche Menge Einfrierpuffer B (Tabelle 9-14), welcher 30% Glycerol enthielt, dazu gegeben. Die Würmer konnten so langfristig bei -80°C gelagert werden. Um ein gleichmäßiges Absinken der Temperatur zu gewährleisten, wurden die Würmer aliquotiert und in einem mit Isopropanol gefülltem Einfrierbehälter eingefroren.

3.1.1 Herstellung von NGM-Agar-Platten

Der NGM-Agar wurde wie in Tabelle 9-20 beschrieben hergestellt und nach dem Autoklavieren in einem Wasserbad auf 60°C abgekühlt. Unter sterilen Bedingungen wurden ca. 9 ml der NGM-Agar-Lösung in Petrischalen (9,2 cm) gegossen. Nachdem die Platten ausgehärtet waren wurden sie mit 600 µl aufkonzentrierter *E. coli* OP50 Tagkultur beschichtet. So hergestellte Platten konnten mehrere Tage bei Raumtemperatur (RT) für die Kultivierung von *C. elegans* gelagert werden.

3.1.2 Kultivierung von *E. coli* OP50

Bei dem *E. coli* OP50 Stamm handelt es sich um einen Uracil-auxotrophen Stamm, dessen Wachstum auf NGM-Agar limitiert ist [170]. Die verwendeten Bakterien wurden vom *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) bezogen und nach dem Drei-Ausstrich-Prinzip auf 2xYT-Agar-Platten (Tabelle 9-18) vereinzelt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden am nächsten Tag 3 ml 2xYT-Medium (Tabelle 9-19) mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttelinkubator bei 300 rpm inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 500 µl verwendet um 200 ml 2xYT-Medium zu beimpfen und anschließend bei 37°C für 6 h und 300 rpm schüttelnd zu inkubieren. Nach der Inkubationszeit wurde die Tagkultur 5 min bei 5000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets mit 4,5 ml 2xYT-Medium resuspendiert. Die so aufkonzentrierte Tagkultur konnte bei 4°C gelagert werden. Für die Langzeitlagerung der Bakterien wurden 800 µl Übernachtskultur mit 200 µl Glycerol vermischt und bei -80°C eingefroren.

3.1.3 Synchronisation von *C. elegans* mittels *Egg-Preparation*

Für alle Versuche wurde eine homogene Population gleichaltriger Nematoden verwendet. Um diese zu erhalten wurden Würmer mittels einer Bleichmethode, der sogenannten *Egg-Preparation* (Egg-Prep), synchronisiert. Die Synchronisation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Hierfür wurden vollbewachsene Agar-Platten mit M9-Puffer (Tabelle 9-9) überschichtet, mittels Glaspasteurpipette in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 2x mit M9-Puffer gewaschen. Auf ein Volumen von 3,5 ml M9-Puffer wurden 1,5 ml Bleichlösung (Tabelle 9-11) gegeben und so lange geschüttelt bis sich die adulten Würmer vollständig aufgelöst hatten. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen mit M9-Puffer aufgefüllt und 2 min bei 2800x g abzentrifugiert um ein Pellet aus den freigesetzten Wurmeiern zu erhalten. Dieses Pellet wurde zwei Mal mit M9-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde auf 10 ml aufgefüllt und 10 µl Cholesterol-Stammlösung (Tabelle 9-17) hinzugegeben. Das Zentrifugenröhrchen wurde in einem Überkopfschüttler über Nacht bei 25 rpm und RT inkubiert, um ein Schlüpfen der Larven zu ermöglichen. Am nächsten Morgen wurden

die synchronen Larven bei 1200x g abzentrifugiert und das Larvenpellet nach Abnahme des Überstandes in frischem M9-Puffer resuspendiert.

3.1.4 Kultivierung von *C. elegans* in NGM-Flüssigmedium

Für alle Versuche wurden L1-Larven in NGM-Flüssigmedium (Tabelle 9-21) mit Bakterien in 96- oder 24-Well-Platten kultiviert. Für den Versuchsansatz in 96-Well-Platten wurden ca. 10 synchronisierte L1-Larven in 10 µl M9-Puffer in jede Plattenvertiefung überführt. 1 ml der *E. coli* HT115 Tagkultur (siehe Abschnitt 3.1.5) wurde bei 2500x g zentrifugiert und das Pellet wurde in ca. 1 ml NGM resuspendiert. Die OD₆₀₀ dieser Suspension wurde photometrisch auf 1,0 eingestellt. In jede Plattenvertiefung wurden 46 µl dieser Lösung pipettiert. Pro Behandlungsgruppe wurde eine Reihe angesetzt und die Larven bis zum Erreichen des jung-adulten Stadiums nach ca. 4 Tagen lichtgeschützt bei 20°C schüttelnd (150 rpm) inkubiert.

Versuche, die Proteinextraktionen voraussetzten, wurden in 24-Well-Platten angesetzt und es wurde jeweils das 10-fache Volumen verwendet. Für jede Behandlungsgruppe waren vier 24-Well-Platten nötig.

3.1.5 RNA-Interferenz

Die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) eignet sich für die gezielte Verminderung der Expression spezifischer Gene. Wie in Abbildung 3-1 dargestellt kommt es durch das Einbringen von doppelsträngiger RNA (dsRNA) zu einem starken und langandauernden Abbau komplementärer mRNA. In einem ersten Schritt wird die eingebrachte dsRNA durch eine dsRNA-spezifische Endonuklease (Dicer) in 21 bis 25 Basenpaar große Fragmente, die sogenannten *short interfering* RNA (siRNA), gespalten. Die Einzelstränge der siRNA werden durch einen Proteinkomplex, dem *RNA-induced silencing complex* (RISC), gebunden. Die zur siRNA komplementäre mRNA wird von diesem Komplex angelagert und durch die im RISC enthaltene Nuklease gespalten und abgebaut.

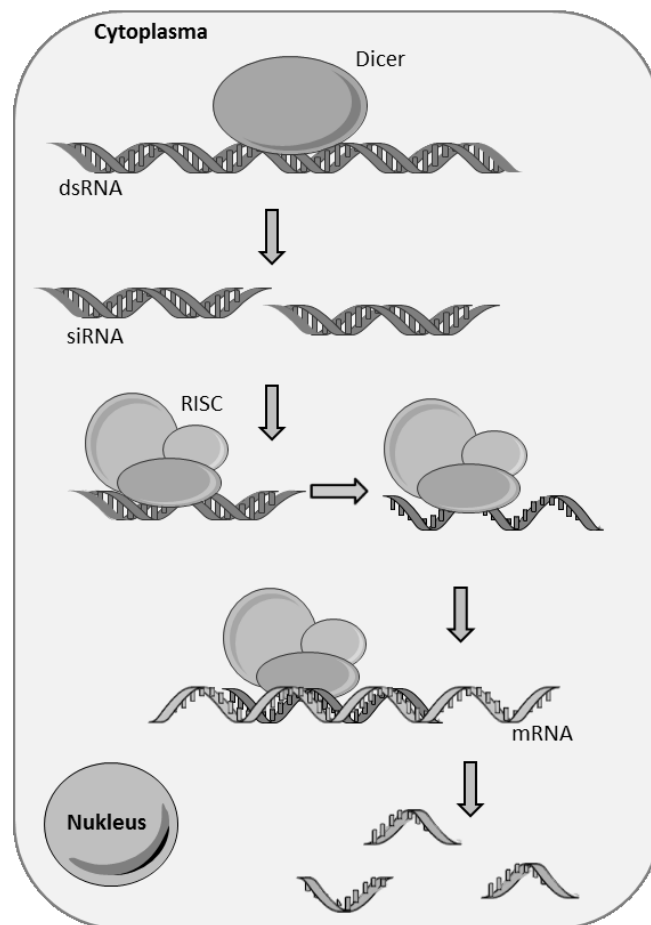


Abbildung 3-1 Prinzip der RNAi

Doppelsträngige RNAi (dsRNA) wird von einer spezifischen Endonuklease, dem DICER, in *short interfering* RNA (siRNA) gespalten. Diese werden vom RNA *induced silencing complex* (RISC) erkannt, gebunden und in Einzelstränge gespalten. Der so gebundene siRNA-Strang bindet komplementär die entsprechende mRNA. Diese wird anschließend vom RISC abgebaut. Die Translation in das jeweilige Protein wird somit verhindert.

In *C. elegans* stellt die Fütterungsmethode eine einfache und effiziente Methode dar dsRNA in den Organismus einzubringen. Hierfür wird anstelle des OP50 Stammes der *E. coli* HT115 Stamm verfüttert, welcher die spezifische dsRNA exprimiert. HT115 Bakterien sind RNaseIII defizient, wodurch ein Abbau der dsRNA verhindert wird. Sie enthalten den L4440-Vektor, ein Plasmid, das die spezifische Gensequenz beidseitig flankiert von T7-Promotoren, enthält. Die Expression der in das Bakteriengenom eingebrachten Sequenz der T7-Polymerase wird durch Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und führt zur Bildung der entsprechenden dsRNA [231].

Für die Durchführung der RNAi-Versuche wurden RNAi-Klone aus Glycerolkulturen auf 2xYT-Agar-Platten, welche 100 μ g/ml Ampicillin und 25 mg/ml Tetracyclin

(Tabelle 9-18) enthielten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten konnten bei 4°C gelagert werden. 3 ml des 2xYT-Medium, welches mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt war, wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 300 rpm inkubiert. 200 µl dieser Übernachtskultur wurden für das Ansetzen einer Tagkultur, bestehend aus 2 ml 2xYT-Medium, welches 100 µg/ml Ampicillin enthielt, verwendet. Die Transkription der dsRNA wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG, wie oben beschrieben, induziert. Die Tagkultur wurde 4 h bei 37°C schüttelnd bei 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Bakteriensuspension abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 1 ml NGM, welches 25 µg/ml Kanamycin enthielt, resuspendiert. Die OD₆₀₀ wurde auf 1,0 eingestellt. Die Zugabe des Kanamycins diente der Inaktivierung der Bakterien und verhinderte so eine Verstoffwechselung der zugegebenen Effektoren. Die weitere Durchführung der Versuche wurde wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben vorgenommen. Für alle RNAi-Versuche wurden *E. coli* HT115, die den leeren L4440-Vektor enthielten, als Kontrolle verwendet. Bei Doppel-RNAi-Versuchen wurden die in NGM resuspendierten Klone in den entsprechenden Verhältnissen vor Versuchsansatz gemischt. Als Einzel-RNAi-Vergleich wurde der jeweilige RNAi-Klon in entsprechender Konzentration mit der RNAi-Kontrolle verdünnt, um so die Stärke der verminderten Expression des entsprechenden Gens zu erreichen.

3.1.6 Inkubation von *C. elegans* mit Effektoren

Jung-adulte Nematoden wurden für 48 h mit den verschiedenen Polyphenolen behandelt. Für die verschiedenen Polyphenol-Behandlungsgruppen wurden Kontrollen, die nur das jeweilige Lösungsmittel enthielten, mitgeführt. Die Stammlösungen für die einzelnen Effektoren (Tabelle 9-17) wurden auf RT gebracht und daraus wurden Arbeitslösungen hergestellt, welche 10-fach konzentrierter waren als die gewünschte Endkonzentration und maximal 10% Ethanol enthielten. Nach der 48 stündigen Inkubationszeit wurden die Nematoden in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mehrmals mit M9:Tween®20 (Tabelle 9-10) gewaschen, um Bakterien und Effektoren zu entfernen.

Für die Behandlung der Nematoden mit einer verminderten Cholesterolkonzentration, wurde dem NGM an der Stelle von 5 µg/ml Cholesterol lediglich 2,5 µg/ml zugesetzt.

Die Nematoden wurden ab dem L1-Larvenstadium der verminderten Cholesterolkonzentration ausgesetzt. Um die Vergleichbarkeit gegenüber den Inkubationsversuchen zu gewährleisten, wurden die Würmer 48 h nach Erreichen des jung-adulten Stadiums, wie beschrieben, von den Bakterien und dem Medium gereinigt.

3.2 Messung der Paralyserate

Der *C. elegans* Stamm CL2006 exprimiert das humane A β ₁₋₄₂-Peptid unter der Kontrolle eines muskelspezifischen Promotors. Dies führt zur Akkumulation intrazellulärem A β und einer detektierbaren Paralyse des Wurms [188], welche hier als Alzheimer-Phänotyp bezeichnet wird. Für die Messung der Paralyse wurde nach der 48 h Inkubation mit Effektoren eine Hitzeschockbehandlung bei 35°C für 1 h durchgeführt. Dies führte in der Kontrolle zu einer Paralyserate von ca. 50% und ermöglichte so die Detektion von Veränderungen in beide Richtungen. Die Würmer wurden anschließend in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit M9-Puffer mehrmals gewaschen. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte verblindet, um eine subjektive Beeinflussung der Ergebnisse zu verhindern. Die Würmer wurden an einem Stereomikroskop vereinzelt und mit je 1 μ l Lösung auf eine in 25 Abschnitte aufgeteilte NGM-Agar-Platte überführt. Bei geöffnetem Deckel konnte die Flüssigkeit verdunsten und die Würmer antrocknen. Anschließend wurden die Nematoden unter dem Mikroskop mit einem abgerundeten Platindraht vorsichtig berührt. Würmer die daraufhin keine adäquate Reaktion im Sinne einer vollständigen Vorwärtsbewegung, sondern lediglich eine Bewegung des Kopfes zeigten, wurden als paralytisch gezählt. Pro Behandlungsgruppe wurden 25 Würmer herangezogen. Die Paralyserate wurde als % der Kontrolle angegeben.

3.3 Quantifizierung von Lysosomen mit LysoTracker® Red

Zur Detektierung von Lysosomen wurde der Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker® Red DND-99 verwendet. Dieser wird in azidischen Zellorganellen protoniert und akkumuliert in Folge dessen. Es wurden Würmer ab dem jung-adulten Stadium analog zur Inkubation mit Effektoren (Abschnitt 3.1.6) mit 2 μ M LysoTracker® Red für 48 h inkubiert. Die LysoTracker® Red Stammlösung (Tabelle 9-17) wurde hierfür mit M9-Puffer auf eine 20 μ M Arbeitslösung verdünnt. Nach 48 h wurden die Nematoden in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit M9:Tween®20 gewaschen. Um ein Ausscheiden des im Darmlumen befindlichen Farbstoffes zu ermöglichen, wurden die Würmer für 2 h im Dunkeln auf mit *E. coli* OP50 beschichteten NGM-Agar-Platten inkubiert. Anschließend wurden die Würmer mit M9-Puffer von der Platte gewaschen, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und erneut gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und die Würmer mit 2 mM Levamisol (Tabelle 9-17) betäubt, auf einen Objektträger überführt und mit einem Deckgläschen fixiert. Die Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes fand mit einem digitalen Fluoreszenzmikroskop (EVOS fl, AMG) statt. Hierfür wurde das EVOS LED Light Cube RFP mit einer Anregungswellenlänge (*excitation*, Ex) von 531 ± 40 nm und einer Emissionswellenlänge (Em) von 593 ± 40 nm verwendet. Bei einer 100-fachen Vergrößerung wurden pro Behandlungsgruppe mindestens 20 Würmer fotografiert.

Zur Bestimmung der Gesamtfluoreszenz eines Wurmes wurde die Software ImageJ herangezogen. Hierfür wurden die angefertigten Bilder in einem ersten Schritt in drei einzelne 8-Bit-Graustufenbilder getrennt, wovon der rote Farbkanal weiterverwendet wurde. Ein unterer Grenzwert wurde so gewählt, dass die Auswahl zwar den gesamten Wurm aber möglichst wenig Hintergrund einschloss. Für die so markierte Fläche wurde die integrierte Dichte, die Summe der Werte für die einzelnen Pixel, gemessen und als Maß für die Gesamtfluoreszenz herangezogen.

3.4 Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrien mit MitoTracker® Red CM-H₂XRos

Mittels des Fluoreszenzfarbstoffes MitoTracker® Red CM-H₂XRos wurden die ROS-Spiegel in den Mitochondrien bestimmt. Die reduzierte, nicht fluoreszierende Form des Farbstoffes akkumuliert in Mitochondrien aktiver Zellen und wird durch ROS oxidiert. Die oxidierte Form bildet fluoreszierende Konjugate mit Thiol-Gruppen mitochondrialer Proteine. Dieses kann mittels Epifluoreszenzmikroskopie erfasst werden. Das Anregungsmaximum von CM-H₂XRos liegt bei 579 nm, das Emissionsmaximum bei 599 nm. Für die Detektierung wurde der EVOS® Light Cube RFP mit den Detektionsbereichen 513 ± 40 nm (Ex) und 593 ± 40 nm (Em) verwendet.

Eine 300 µM Stammlösung des Farbstoffes in DMSO (Dimethylsulfoxid) (Tabelle 9-17) wurde hergestellt und anschließend mit M9-Puffer auf 5 µM verdünnt. Der Farbstoff wurde in einer Endkonzentration von 0,5 µM zusammen mit den Effektoren im jung-adulten Stadium zu den Nematoden hinzugegeben. Nach einer 48 h Inkubation wurden die Würmer gewaschen und wie bereits beschrieben (vgl. Kapitel 3.3) wurden mittels des Fluoreszenzmikroskopes je Behandlungsgruppe ca. 20 Bilder angefertigt. Diese konnten anschließend mit ImageJ und GraphPad wie oben beschrieben weiter bearbeitet und ausgewertet werden.

3.5 Proteinextraktion mittels des Precellys Homogenisators

Für die Proteinextraktion wurden vier 24-Well-Platten mit ca. 10.000 Würmern je Behandlungsgruppe benötigt. Die Würmer wurden mit M9:Tween®20 gewaschen und der Überstand wurde vollständig entfernt. Anschließend wurde das Wurmpellet in ca. 300 µl Lysis-Puffer (Tabelle 9-15) resuspendiert, in ein 2,0 ml Precellys Schraubdeckelgefäß überführt und bei -80°C eingefroren. Für die Proteinextraktion wurden die Würmer auf Eis aufgetaut und in jedes Schraubdeckelgefäß wurden ca. 0,6 g Precellys Keramik-Kügelchen (1,4 mm) gegeben. Die Extraktion fand anschließend für 2x 20 sec bei 6500 rpm mit 30 sec Pause im Precellys 24-Dual Homogenisator von Peqlab statt. Das Homogenat wurde im Anschluss daran für 20 min bei 6000x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der das extrahierte Protein enthielt, wurde in 2 ml

Reaktionsgefäße überführt. Die Proteine konnten zum weiteren Gebrauch auf Eis gelagert oder bei -20°C eingefroren werden.

3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Methode nach Bradford [232]. Hierfür wurde ein BioRad Protein Assay eingesetzt, welcher auf dem Prinzip basiert, dass der Farbstoff Coomassie® Brilliant Blau in saurer Lösung an Proteine bindet wodurch sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Diese Verschiebung kann photometrisch gemessen werden und korreliert mit dem Gehalt an Proteinen.

Für die Bestimmung wurde eine Standardreihe mit in Lysis-Puffer gelöstem bovinem Serumalbumin (BSA) als Referenzprotein erstellt. Die Standardreihe umfasste die BSA-Konzentrationen 0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml. Zu 25 µl Standard wurden je 975 µl H₂O und 250 µl Bradford-Reagenz gegeben und gut gemischt. Nach genau 15 min Inkubationszeit wurde die Absorption bei 595 nm in einem Eppendorf Biophotometer plus gemessen und eine Standardkurve automatisch durch das Photometer berechnet.

Für die Konzentrationsbestimmung der Proben wurden diese analog zur Standardreihe mit H₂O und Bradford-Reagenz gemischt und die Absorption bestimmt. Für jede Probe wurde eine Doppel-Bestimmung durchgeführt. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte automatisch durch das Photometer anhand der zuvor kalkulierten Standardkurve. Überstieg der Proteingehalt der Proben den messbaren Bereich, wurden diese vorab im Verhältnis 1:10 mit Lysis-Puffer verdünnt.

3.7 Messung der Proteasomaktivität

Die Messung der Proteasomaktivität basiert auf der Grundlage, dass das Proteasom Peptide spaltet und dies durch spezifische Proteasominhibitoren inhibiert werden kann [233]. Ein mit einem Fluorogen markiertes Peptid, N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin (Suc-LLVY-AMC), wurde eingesetzt um die Chymotrypsin-

ähnliche Proteasomaktivität fluorometrisch zu bestimmen. Als Proteasom-spezifischer Inhibitor wurde MG-132 verwendet. Durch die Spaltung des Peptides wird das Fluorogen freigesetzt und fluoresziert so, dass der Anstieg der Fluoreszenz proportional zur gesamten Peptidasenaktivität ist. Durch die Zugabe des Proteasom-spezifischen Inhibitors kann die spezifische Proteasomaktivität bestimmt werden.

Die Messung fand in schwarzen 96-Well-Halbmikrotiterplatte statt. Zur Vorbereitung der Platten auf die Messung wurden diese blockiert um eine Interaktion zwischen den Proteinen in der Probe und der Platte zu verhindern. Hierfür wurde eine 3%ige BSA-Lösung in TBS (*tris-buffered saline*) angesetzt und je das 1,5-fache des Versuchsvolumen in jede zu messende Plattenvertiefung pipettiert. Die Platte wurde bei 37°C für 1 h inkubiert und anschließend wurde die BSA-Lösung vollständig abgesaugt.

Die zuvor extrahierten Proteine wurden auf RT gebracht. Je Plattenvertiefung wurden 25 µl Proteinlösung (entspricht ca. 25 µg Protein) pipettiert und anschließend 25 µl Proteasomaktivitäts-Messpuffer (Tabelle 9-16) zugegeben. Danach erfolgte die Zugabe von 0,5 µl der MG-132 Stammlösung (Tabelle 9-17) oder des entsprechenden Lösungsmittels als Kontrolle. Jede Probe wurde in Gegenwart und Abwesenheit des Inhibitors gemessen. Die Platte wurde 15 min schüttelnd bei 300 rpm im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 0,5 µl der Suc-LLVY-AMC Stammlösung (Tabelle 9-17) in jede Plattenvertiefung gegeben und der Anstieg der Fluoreszenz wurde im Abstand von 10 min über einen Zeitraum von 3 h bei 37°C in einem Fluoreszenz-Plattenlesegerät (Fluoroskan Ascent FL) gemessen. Dafür wurde ein Filterpaar von 355 nm (Ex) und 460 nm (Em) ausgewählt. Die Messung der Probe erfolgte in Triplikaten.

Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden auf mg Protein normalisiert und in GraphPad Prism wurde mittels linearer Regression der Anstieg der Fluoreszenz pro Zeiteinheit ermittelt. Dieser ist mit der Enzymaktivität gleichzusetzen. Die Differenz der ermittelten Aktivität in Abwesenheit bzw. Anwesenheit des Inhibitors MG-132 ergab die Proteasom-spezifische Aktivität.

3.8 Bestimmung der Menge an Proteinaggregaten in Lösung

Die Bestimmung der Menge aggregierter Proteine in Lösung erfolgte mittels des ProteoStat® Protein Aggregation Assay (Tabelle 9-5). Das verwendete Kit enthielt einen Fluoreszenzfarbstoff, der bei 550 nm sein Anregungsmaximum und bei 600 nm sein Emissionsmaximum hat. Das Kit ist hoch sensitiv und ermöglicht die Detektion von weniger als 1% Proteinaggregate im Ansatz.

Die Proteine der zu untersuchenden Gruppen wurden wie in Kapitel 3.5 beschrieben extrahiert. Anschließend wurde die ProteoStat® Detection Reagent Loading Solution laut Herstellerprotokoll angesetzt und 2 µl der Lösung mit 98 µl der jeweiligen Probe vermischt. Die Konzentration der Probe sollte zwischen 1 µg/ml bis 10 mg/ml liegen. Die Messung erfolgte in einer schwarzen 96-Well-Halbmikrotiterplatte in jeweils drei Replikaten pro Gruppe. Als Leerwert diente bidestilliertes (bideist) H₂O. Die Platte wurde für 15 min im Dunkeln inkubiert und anschließend wurde die Fluoreszenz bei 646 nm nach Anregung bei 544 nm in einem Fluoroskan Ascent FL gemessen.

3.9 Statistische Auswertung

Für jeden Versuch wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt, für Paralysemessungen mindestens vier. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 5.0. Für die Analysen wurden folgende Signifikanzniveaus festgelegt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Die Ergebnisse wurden auf die Kontrolle (100%) normalisiert und als Balkendiagramme mit Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt. Die Überprüfung der Mittelwerte der unterschiedlichen Behandlungsgruppen auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels t-Test oder einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni Anschlussstest.

4 ERGEBNISSE

4.1 β -Amyloid-induzierte Proteinaggregation im *C. elegans* Alzheimer-Modell CL2006

Senile Plaques, bestehend aus aggregierten A β -Peptiden, sind charakteristisch für die Pathogenese der humanen AD. Im Gegensatz zum Wildtyp exprimiert der transgene *C. elegans* Stamm CL2006 A β und prägt den Alzheimer-Phänotypen, die Paralyse, aus. Es sollte zunächst untersucht werden, ob A β im Wurm ähnlich wie beim Menschen akkumuliert und aggregiert. Hierzu wurde die Menge an aggregiertem Protein in Lösung mittels des ProteoStat® Protein Aggregation Assay bestimmt. Im Vergleich zum Wildtyp wies CL2006 eine 8,4-fach höhere Menge ($936 \pm 37\%$ der Kontrolle; Kontrolle entspricht immer $100 \pm 5\%$) an Proteinaggregaten auf ($p < 0,01$, Abbildung 4-1). Daraus wurde abgeleitet, dass die Aggregation des A β der Auslöser für die Ausprägung des Alzheimer-Phänotyps in CL2006 ist.

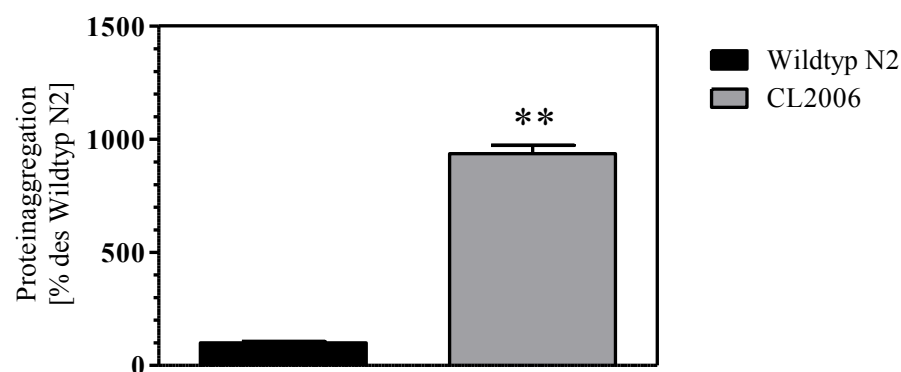


Abbildung 4-1 Proteinaggregation in CL2006 im Vergleich zum Wildtyp N2
Proteinaggregation in CL2006 im Vergleich zum Wildtyp N2; ** $p < 0,01$ vs. N2.

4.2 Einflüsse Alzheimer-relevanter Gene auf die β -Amyloid-induzierte Paralyse in CL2006

4.2.1 Apolipoprotein-homologe Gene aktivieren die Paralyse in CL2006

Im Rahmen der Entstehung der AD werden veränderte Plasmacholesterolspiegel und Polymorphismen der ApoE-Allele diskutiert. ApoE als cholesteroltransportierendes Apolipoprotein im menschlichen Gehirn ist für *C. elegans* nicht beschrieben. Es sind jedoch Vitellogenine, z. B. das VIT-6, als cholesteroltransportierende Proteine und Homologe zu humanen ApoB-Proteinen beschrieben. Intrazellulär bildet Cholesterol, nach der DAF-9-vermittelten Oxidation zu dafachronischen Säuren, Liganden des nukleären Hormonrezeptors DAF-12. Dieser agiert als Transkriptionsfaktor und reguliert die Transkription von Genen für Langlebigkeit und Stressresistenz.

Um den genetischen Einfluss des Steroid-Signalweges in Bezug auf eine mögliche Bedeutung bei der Entstehung des Alzheimer-Phänotyps in CL2006 zu untersuchen, wurden die entsprechenden Gene mittels RNAi in ihrer Expression vermindert. Es zeigte sich, dass eine Unterbindung des Steroid-Signalwegs auf jeder Ebene zu einem signifikanten Rückgang der Paralyserate in CL2006 führte (Abbildung 4-2). Eine RNAi-vermittelte verminderte *vit-6* Expression senkte die Paralyserate um 46% ($54 \pm 4\%$, $p < 0,001$) gegenüber der Kontrolle. Die RNAi von *daf-9* führte zu einer Reduktion um 20% ($80 \pm 12\%$, $p < 0,01$) und die von *daf-12* um 40% ($60 \pm 13\%$, $p < 0,001$) gegenüber der Kontrolle. Dies lässt vermuten, dass ein effektiver Transport und eine verstärkte Aktivierung des Steroid-Signalweges die Entstehung des Alzheimer-Phänotyps beschleunigen.

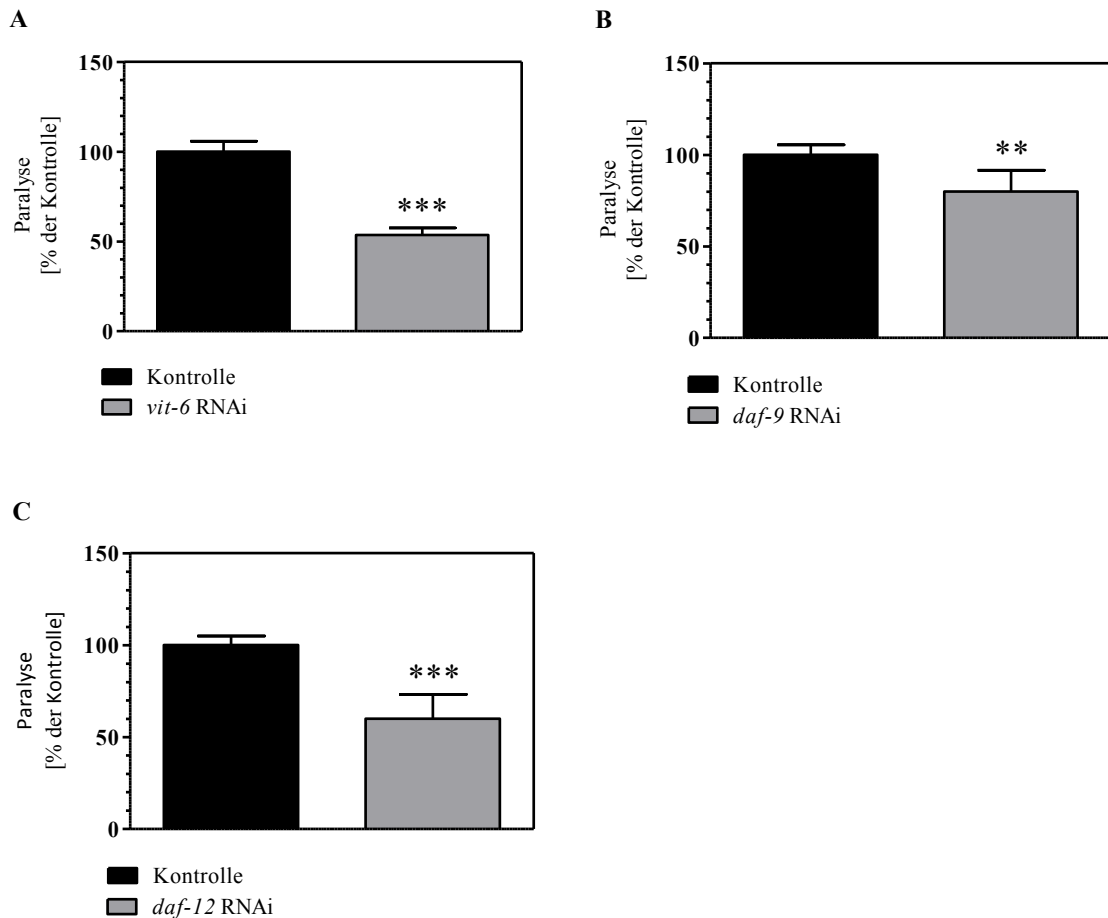


Abbildung 4-2 Paralyse in Steroid-Signalweg-defizienten CL2006

Paralyserate mit *vit-6* (A), *daf-9* (B) bzw. *daf-12* RNAi (C) sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); ** $p < 0,01$ bzw. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Im Folgenden galt es zu klären, ob der durch die RNAi der einzelnen Komponenten des Steroid-Signalweges verursachte Rückgang der Paralyse von einem einzelnen Gen dominiert wird. Dazu wurden in einem nächsten Schritt Doppel-RNAis durchgeführt. Hierzu wurde jeweils das für den Transport des Cholesterols zu der Zelle verantwortliche *vit-6* durch RNAi in seiner Expression vermindert und mit der RNAi von *daf-9* bzw. *daf-12* kombiniert (Abbildung 4-3).

Unter keiner der Doppel-RNAis konnte ein additiver Effekt der reduzierten Paralyserate beobachtet werden. Eine Doppel-RNAi von Kontrolle + *vit-6* führte zu einer Paralyserate von $36 \pm 17\%$ im Vergleich zur Kontrolle. Mit *daf-9* + *vit-6* RNAi war dies mit einer Paralyse von $39 \pm 6\%$ verglichen mit der Kontrolle ($p < 0,001$) zu beobachten, mit *daf-12* + *vit-6* RNAi lag die Paralyserate bei $34 \pm 19\%$ ($p < 0,001$). Der *vit-6*-Effekt

war hier dominant. Dies bestätigt, dass ein Rückgang der Paralyserate durch die verminderte Cholesterolversorgung der Zelle und somit eine verminderte Aktivierung des Steroid-Signalweges vermittelt wird.

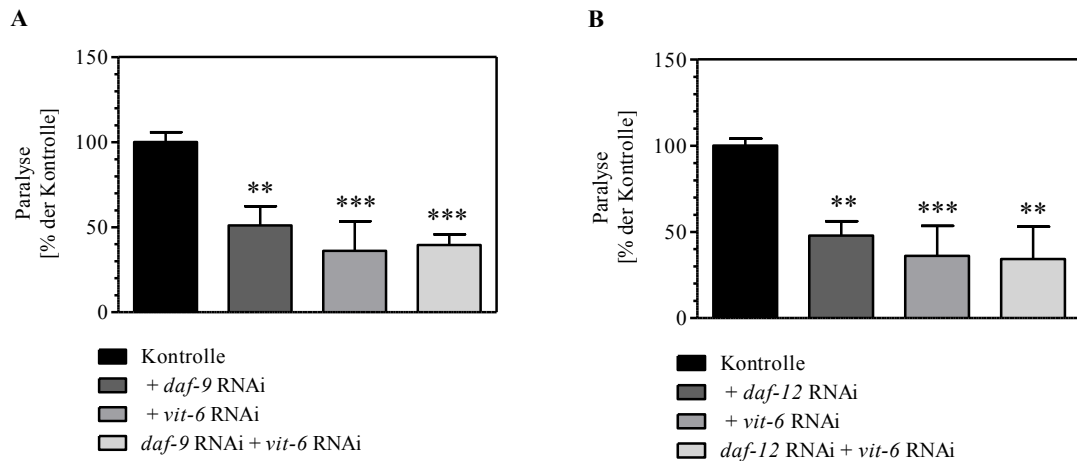


Abbildung 4-3 Paralyserate von CL2006 mit Doppel-RNAi von *vit-6* und *daf-9* bzw. *daf-12*

Paralyserate von CL2006 mit Doppel-RNAi des cholesteroltransportierenden *vit-6* und den am intrazellulären Signalweg beteiligten Genen *daf-9* (A) bzw. *daf-12* (B) sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); ** $p < 0,01$ bzw. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Aufgrund der Bedeutung des Steroid-Signalweges im Rahmen der Entstehung des Alzheimer-Phänotyps und der cholesteroltransportierenden Eigenschaft des VIT-6 wurde nachfolgend untersucht, ob ein Cholesteroldefizit in der Nahrung direkten Einfluss auf die Paralyserate hatte und ob dies von einem aktiven Steroid-Signalweg abgängig war (vgl. Abbildung 4-4). Im Gegensatz zu Vertebraten können Nematoden Sterole nicht selbständig synthetisieren und sind somit für die Aufrechterhaltung zellulärer und hormoneller Regulationen auf die Cholesterolzufuhr mit der Nahrung angewiesen.

Dementsprechend wurden die Nematoden einem Cholesteroldefizit (2,5 µg/ml NGM) ausgesetzt. Als Kontrolle dienten Nematoden, die 5 µg/ml Cholesterol zur Verfügung hatten. Ein Cholesteroldefizit führte in CL2006 zu einem signifikanten Rückgang der Paralyserate um 27% ($73 \pm 1\%$, $p < 0,001$). Die zusätzliche Hemmung des Steroid-Signalwegs mittels RNAi der zentralen Gene *vit-6*, *daf-9* sowie *daf-12* zeigte keinen additiven Effekt der Paralysereduktion durch eine verminderte Cholesterolgabe. Das Cholesteroldefizit in der Nahrung scheint eine RNAi der zentralen Gene des Steroid-

Signalweges zu imitieren. Durch die Ergebnisse wurde gezeigt, dass eine reduzierte Cholesterolversorgung der Zelle letztendlich verantwortlich für die verminderte Paralyse im *C. elegans* Alzheimer-Modell war.

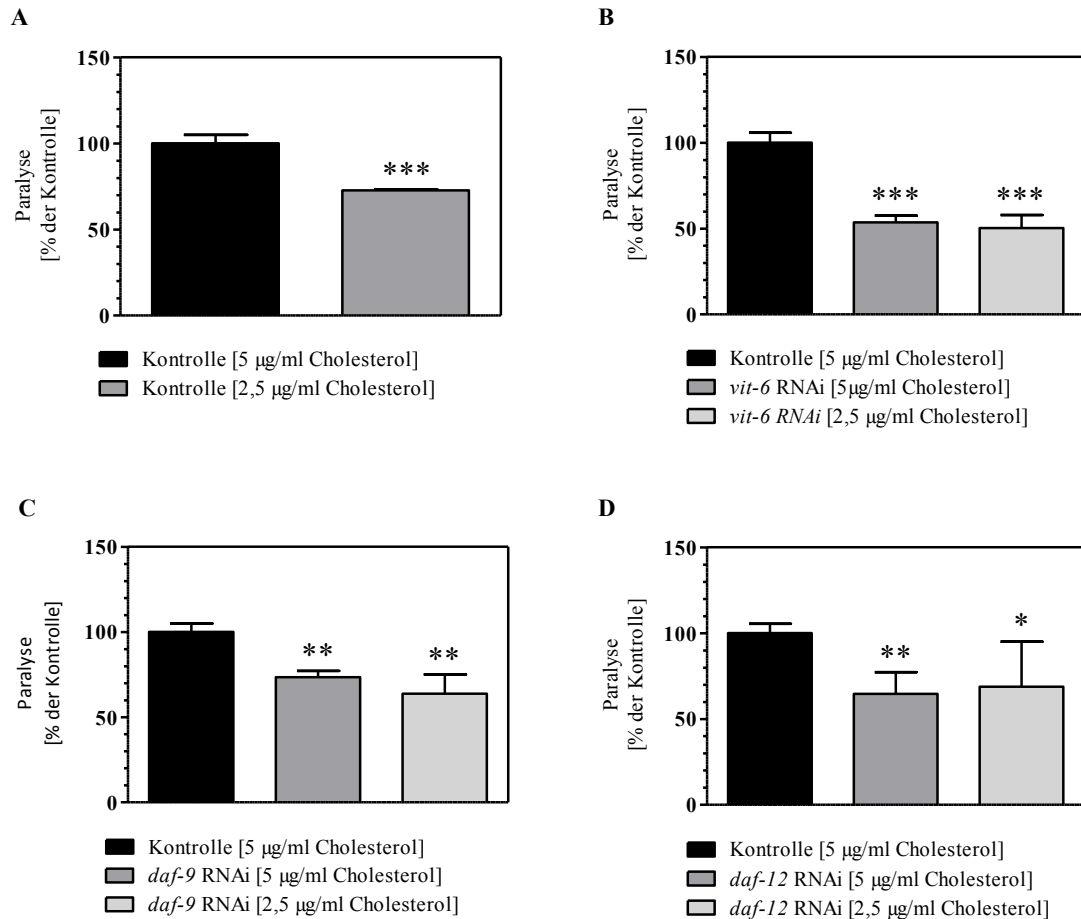


Abbildung 4-4 Paralyserate von CL2006 mit RNAi zentraler Gene des Steroid-Signalweges bei normaler und reduzierter Cholesterolversorgung

Paralyserate von CL2006 mit normaler [5 µg/ml] und reduzierter [2,5 µg/ml] Cholesterolversorgung ohne RNAi (A) sowie mit RNAi der zentralen Gene des Steroid-Signalweges *vit-6* (B), *daf-9* (C), *daf-12* (D) sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); * p < 0,05, ** p < 0,01 bzw. *** p < 0,001 vs. Kontrolle.

4.2.2 Der Insulin-Signalweg beeinflusst die Paralyse in CL2006

4.2.2.1 Die transkriptionelle Aktivität von DAF-16 ist an der Verminderung der Paralyse beteiligt

Der Transkriptionsfaktor DAF-16 agiert in *C. elegans* als Zielprotein des Insulin/IGF-1-Signalweges. Der Insulin-Signalweg wird über den DAF-2-Rezeptor aktiviert und hemmt DAF-16 so, dass es im Cytosol verbleibt und nicht transkriptionell aktiv ist. Bei Ausbleiben der Aktivierung, wie dies z. B. im Rahmen der Kalorienrestriktion der Fall ist, wird DAF-16 dephosphoryliert und transloziert in den Zellkern, wo es die Transkription Stress-responsiver Gene, z. B. solche, die für Katalasen oder die Superoxiddismutase kodieren, initiiert. Da im Rahmen der AD-Entstehung Kalorienrestriktion als protektiver Mechanismus diskutiert wird, sollte im Folgenden geklärt werden welche Bedeutung der zentrale Transkriptionsfaktor DAF-16 für die A β -induzierte Paralyse in CL2006 hat (siehe Abbildung 4-5).

Die RNAi von *daf-16*, welche eine verstärkte Aktivierung des Insulin/IGF-1-Signalweges imitiert, führte zu einem Anstieg der Paralyse um 40% verglichen mit der Kontrolle ($140 \pm 14\%$, $p < 0,001$).

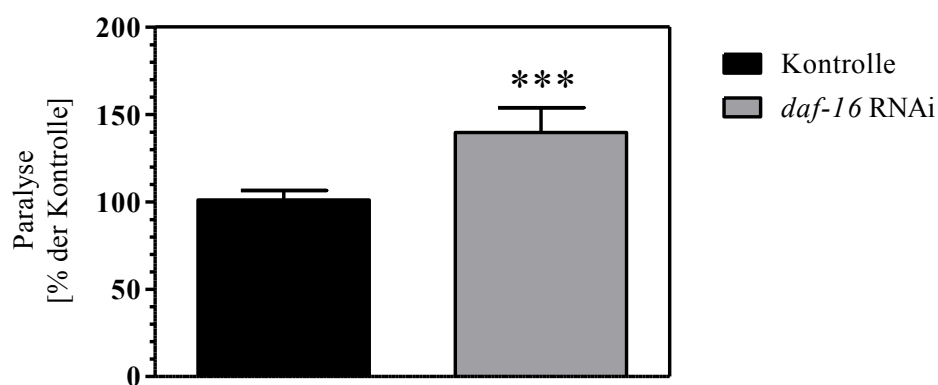


Abbildung 4-5 Paralyserate von CL2006 mit *daf-16* RNAi

Paralyserate von CL2006 mit RNAi des Transkriptionsfaktors *daf-16* sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Um abschließend zu klären, ob die transkriptionelle Aktivität von DAF-16 die entscheidende Rolle für die Verhinderung der Paralyse spielte, wurden potentielle Co-Faktoren mittels RNAi in ihrer Expression vermindert. Zu den Co-Faktoren von DAF-16 zählen die 14-3-3-Proteine PAR-5 und FTT-2, sowie das SIR-2.1, welches ebenfalls ein durch Kalorienrestriktion aktiviertes Protein ist. In *C. elegans* sind vier Sirtuin-homologe Gene (*sir-2.1* bis *sir-2.4*) beschrieben. Da SIR-2.1 das funktionell am besten charakterisierte *C. elegans* Homolog ist, wurde in dieser Arbeit stellvertretend für Sirtuine das SIR-2.1 untersucht.

Analog zur *daf-16* RNAi führte die RNAi der beiden 14-3-3 Proteine zu einem signifikanten Anstieg der Paralyse (Abbildung 4-6). In PAR-5-defizienten Nematoden kam es zu einem Anstieg der Paralyserate um 39% ($139 \pm 25\%$, $p < 0,05$), in FTT-2-defizienten zu einem 2,6-fachen Anstieg gegenüber der Kontrolle ($261 \pm 16\%$, $p < 0,001$). Die RNAi von *sir-2.1* hingegen senkte die Paralyse um 39% ($61 \pm 6\%$, $p < 0,001$). SIR-2.1 wird dementsprechend nicht für die Verhinderung der Paralyse in CL2006 benötigt. Da für SIR-2.1 auch DAF-16 unabhängige Prozesse beschrieben wurden, und die beiden 14-3-3 Proteine gleiche Effekte auf die Paralyse zeigten, ist davon auszugehen, dass die transkriptionelle Aktivität von DAF-16 ausschlaggebend für die Verminderung der Paralyse ist.

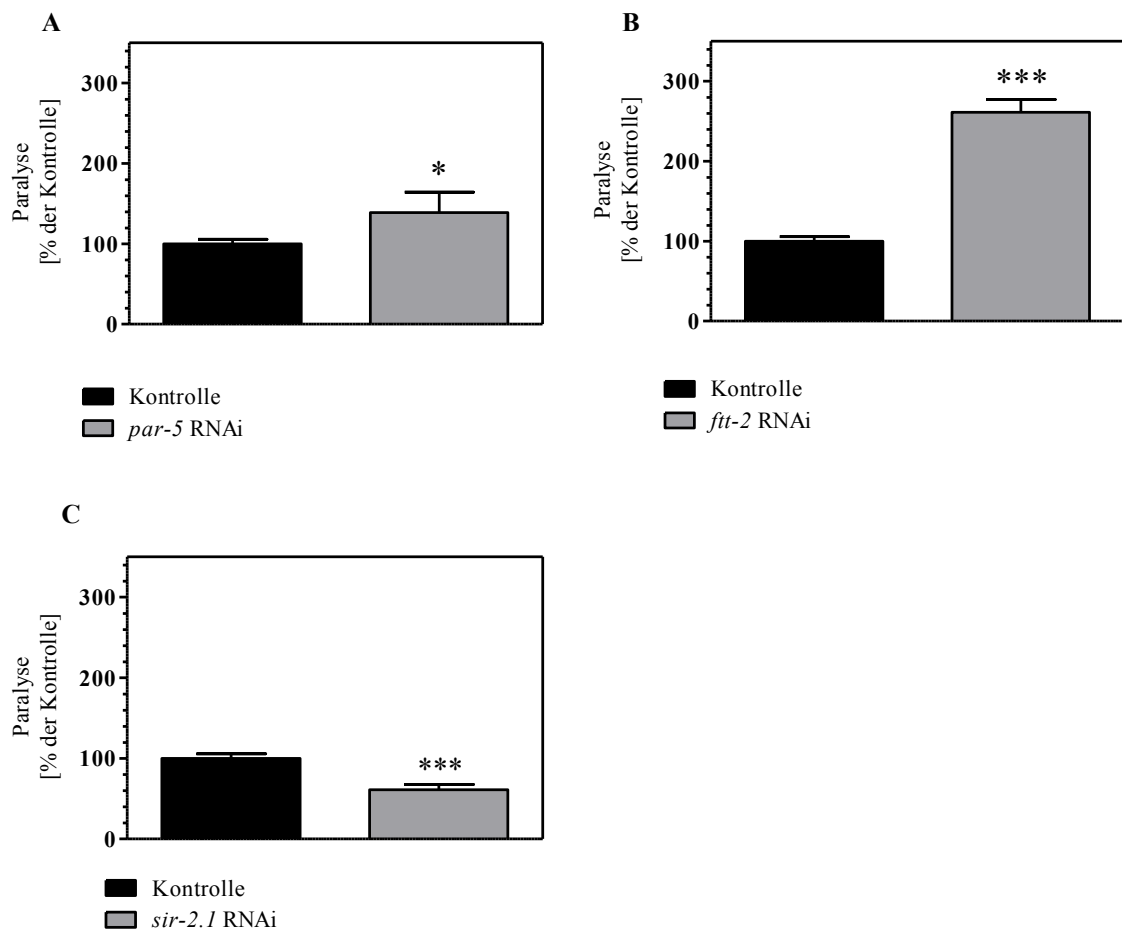


Abbildung 4-6 Paralyserate von CL2006 mit *par-5*, *ftt-2* und *sir-2.1* RNAi

Paralyserate von CL2006 mit RNAi der 14-3-3 Proteine PAR-5 (A) und FTT-2 (B) bzw. SIR-2.1 (C) sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); * $p < 0,05$ bzw. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

4.2.2.2 DAF-16 und DAF-12 beeinflussen über eine Interaktion die Paralyse

Eine Hypothese besagt, dass der nukleäre Hormonrezeptor des Steroid-Signalweges DAF-12 mit dem stromabwärts des Insulin/IGF-1-Signalweges liegenden Transkriptionsfaktor DAF-16 interagiert. Daher wurde im Folgenden die Bedeutung der Interaktion von DAF-16 mit DAF-12 untersucht. Hierzu wurde eine Doppel-RNAi von *daf-12* und *daf-16* durchgeführt (Abbildung 4-7). Wie bereits gezeigt führte die RNAi von *daf-16* zu einer Verstärkung der Paralyse um 94% ($194 \pm 9\%$, $p < 0,001$), wohingegen die *daf-12* RNAi die Paralyse um 22% senkte ($78 \pm 13\%$, $p < 0,05$). Die *daf-9* + *daf-16* Doppel-RNAi steigerte die Paralyserate signifikant gegenüber der Kontrolle um das 2,5-fache ($247 \pm 13\%$, $p < 0,001$). Mit *daf-16* RNAi führte die *daf-9* RNAi nicht mehr zu einer Senkung der Paralyserate. Der *daf-16* RNAi-Effekt ist demnach dominant gegenüber dem *daf-12* RNAi-Effekt. Es kann davon ausgegangen werden, dass DAF-16 in dem Signalweg, der die Paralyse beeinflusst, unterhalb von DAF-12 agiert.

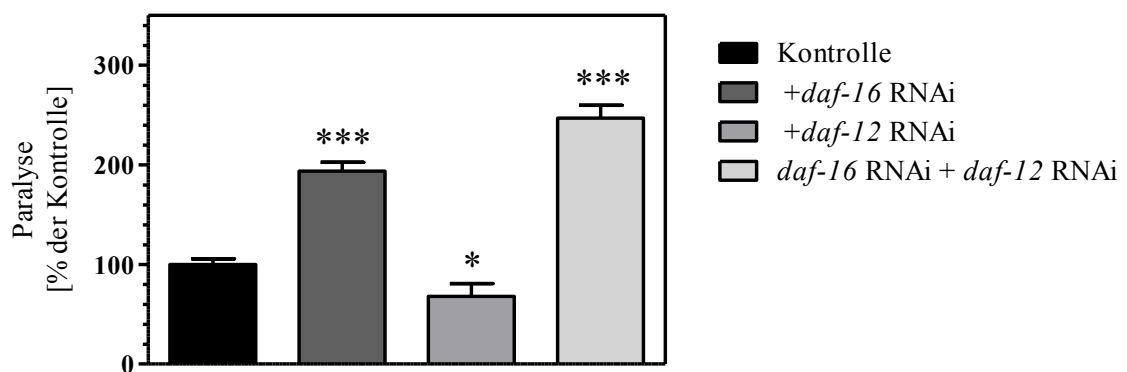


Abbildung 4-7 Paralyserate von CL2006 mit Doppel-RNAi von *daf-16* und *daf-12*

Paralyserate von CL2006 mit Doppel-RNAi des Transkriptionsfaktors *daf-16* und dem nukleären Hormonrezeptor *daf-12* sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); * $p < 0,05$ bzw. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

4.3 Bedeutung der Proteostase für die β -Amyloid-induzierte Paralyse in CL2006

Wie zuvor gezeigt, ist die Entstehung der Paralyse über AD-relevante Gene beeinflussbar. Jedoch galt es zu klären, welcher Mechanismus der Paralyseentstehung bzw. Paralyseminderung letztendlich zugrunde liegt. Das *C. elegans* Alzheimer-Modell CL2006 unterscheidet sich vom Wildtyp im wesentlichen in der Expression des A β . Dieses führt wie bereits gezeigt (Kapitel 4.1) zu vermehrter Proteinaggregation und prägt den Alzheimer-Phänotyp, die Paralyse, aus. Dieser Prozess kann durch Hitzeschock (1 h 35°C) beschleunigt werden. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass im Alzheimer-Modell CL2006 die Proteostase gestört ist und dies zur Aggregation von A β und in dessen Folge zur Paralyse führt. Für die Überlebensfähigkeit von Zellen ist die Kontrolle über ihre Proteine, die Proteostase, essentiell. Diese in Zellen vorkommende Proteostase umfasst Chaperone, die UPR in Mitochondrien (UPR^{mt}) und im endoplasmatischen Retikulum (UPR^{ER}), cytosolische Hitzeschockproteine sowie die Proteindegradationssysteme UPS und Autophagie. Die Proteostase gewährleistet eine korrekte Faltung bzw. den Abbau von fehlerhaft gefalteten, geschädigten oder aggregierten Proteinen. So führt z. B. eine Akkumulation von Proteinaggregaten in Mitochondrien, wie sie bei neurodegenerativen Erkrankungen vorkommt, zu akutem mitochondrialem Stress, welcher die UPR^{mt} aktiviert.

Im folgenden Kapitel wird beschrieben, inwiefern eine fehlerhafte und gestörte Proteostase im Zusammenhang mit der Entwicklung des Alzheimer-Phänotyps im Alzheimer-Modell CL2006 steht. Hierfür wurden zentrale Gene der Proteostase mittels RNAi in ihrer Expression vermindert und anschließend die Paralyse nach Hitzeschock bestimmt.

4.3.1 Die ungefaltete Proteinantwort verhindert die Paralyse in CL2006

Mitochondriale Chaperone verhindern Proteinaggregationen indem sie ungefaltete oder fehlerhaft gefaltete Proteine binden, diese entfalten und neu falten. In *C. elegans* kodieren *hsp-6* und *hsp-60* für mitochondriale Chaperone der HSP70- und HSP40-Superfamilie. UBL-5 und DVE-1 agieren als Transkriptionsfaktoren, welche durch

mitochondrialen, durch die Akkumulation fehlerhafter Proteine verursachten, Stress induziert werden und an *hsp-6* und *hsp-60* Promotorregionen binden.

Die verminderte Expression von *hsp-6*, *hsp-60* sowie *dve-1* führte in CL2006 zu einer signifikanten Steigerung der Paralyserate (Abbildung 4-8). *Hsp-6* RNAi steigerte die Paralyse um 42% ($142 \pm 14\%$, $p < 0,01$), *hsp-60* RNAi um 55% ($155\% \pm 1$, $p < 0,001$) und *dve-1* RNAi um 66% ($166\% \pm 28$, $p < 0,01$) im Vergleich zur Kontrolle. Unter *ubl-5* RNAi kam es zu keiner Veränderung der Paralyse im Vergleich zur Kontrolle ($98 \pm 3\%$). Da DVE-1 auch unabhängig von UBL-5 agieren kann, zeigen die Ergebnisse, dass eine funktionierende UPR^{mt} für die Verhinderung des Alzheimer-Phänotyps in CL2006 eine essentielle Rolle spielt.

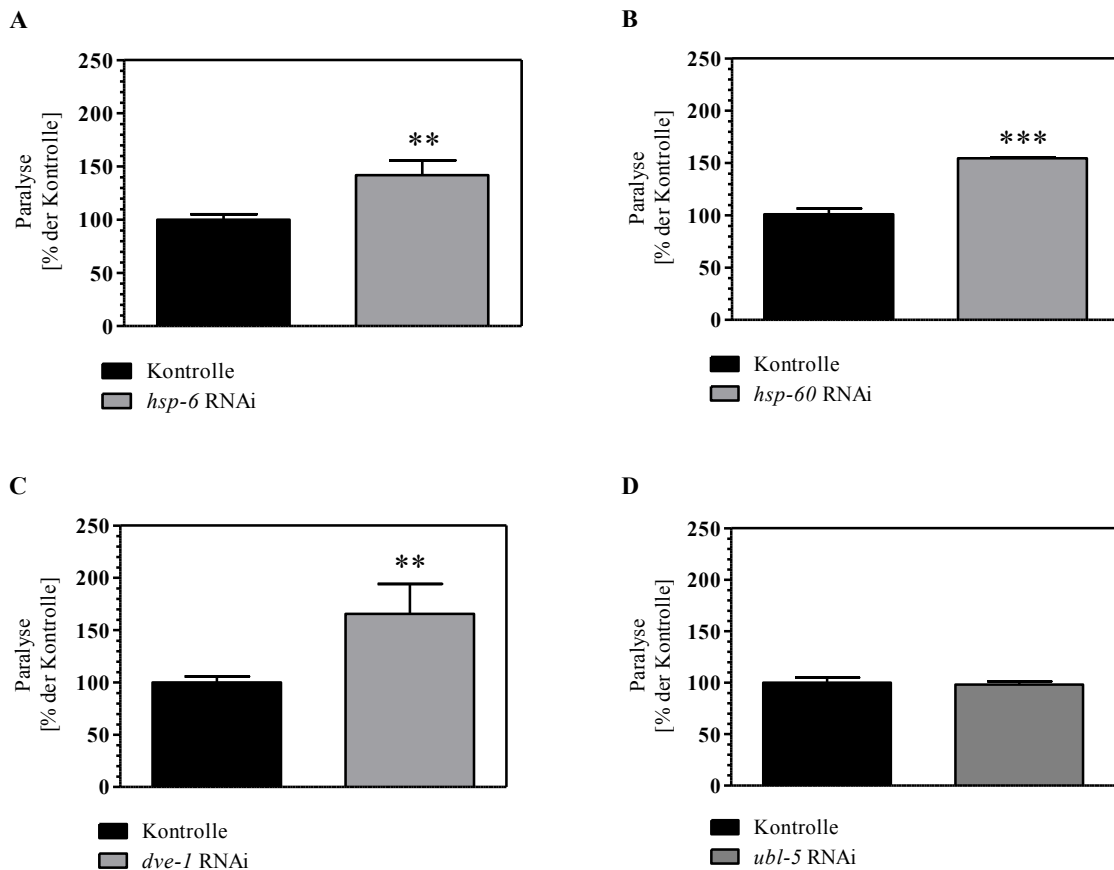


Abbildung 4-8 Paralyserate in UPR^{mt}-defizienten Nematoden

Paralyserate von CL2006 mit *hsp-6* (A), *hsp-60* (B), *dve-1* (C) und *ubl-5* RNAi (D) sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); ** $p < 0,01$ bzw. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Die Akkumulation fehlerhafter Proteine im ER führt analog zu den Mitochondrien zu akutem Stress, welcher die ER-assoziierte UPR aktiviert. Dieser Prozess wird hauptsächlich durch den zentralen Transkriptionsfaktor XBP-1 reguliert. Kommt es zu einer Blockade der UPR^{ER}, z. B. aufgrund einer verminderten *xbp-1* Expression, werden Proteine der ABU-Familie induziert. Eine RNAi des Transkriptionsfaktors XBP-1 steigerte die Paralyserate signifikant um 39% ($139 \pm 11\%$, $p < 0,001$, Abbildung 4-9) im Gegensatz zur Kontrolle. Die verminderte Expression der Gene *abu-1* sowie *abu-11* mittels RNAi führte jedoch zu keiner Veränderung der Paralyserate ($102 \pm 2\%$ bzw. $100 \pm 22\%$) verglichen mit der Kontrolle. Auch wenn eine RNAi der *abu*-Gene keinen Effekt auf die Paralyse hatte deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass neben einer aktiven UPR^{mt} auch eine effektive UPR^{ER} von Bedeutung für die Verhinderung der A β -induzierten Paralyse in CL2006 ist.

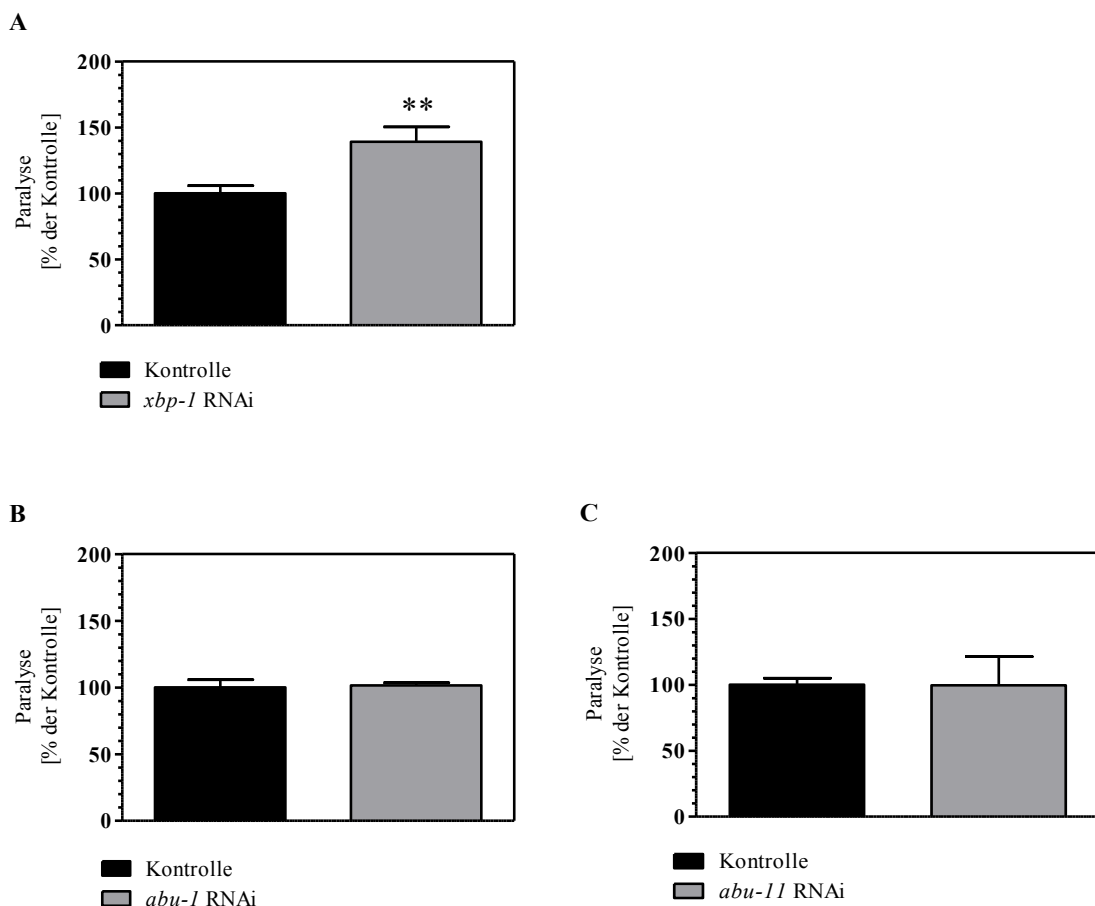


Abbildung 4-9 Paralyserate in UPR^{ER}-defizienten Nematoden

Paralyserate von CL2006 mit *xbp-1* RNAi (A), *abu-1* RNAi (B) bzw. *abu-11* RNAi (C) sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle.

4.3.2 Ein aktives Ubiquitin-Proteasom-System vermindert die Paralyse in CL2006

Terminal fehlgefaltete Proteine sowie eine Überlastung der UPR führen zu einer Aktivierung des ERAD, welches Proteine aus dem ER in das Cytosol transportiert. Dort werden diese durch das UPS abgebaut. Dafür ist eine Markierung mittels Ubiquitin erforderlich. Ubiquitin ist ein ubiquitär vorkommendes Polypeptid, welches u. a. benötigt wird, um Zielproteine zu ubiquitinieren. Diese werden vom Proteasom erkannt und können abgebaut werden (vgl. Kapitel 1.3.3). Für den Ubiquitinierungsprozess werden u. a. Ubiquitin-aktivierende und -konjugierende Enzyme sowie verschiedene Ligasen benötigt. In *C. elegans* wird *ubq-1*, neben *ubq-2*, als Ubiquitinhomolog beschrieben und *uba-1* als Ubiquitin-aktivierendes Enzym. Aufgrund der hohen Homologie zwischen *ubq-1* und *ubq-2* wird davon ausgegangen, dass eine RNAi von *ubq-1* gleichzeitig die Expression von *ubq-2* vermindert. Daher wurde *ubq-1* stellvertretend für die *C. elegans* Ubiquitin-homologen Gene untersucht. Wurde die Paralyse unter den entsprechenden RNAi-Bedingungen betrachtet, konnte festgestellt werden, dass die fehlende Expression der beiden proteasomalen Gene *ubq-1* sowie *uba-1* in CL2006 zu einer signifikant gesteigerten Paralyserate führte (Abbildung 4-10). Der Effekt war bei *ubq-1* RNAi mit einer Steigerung um 84% gegenüber der Kontrolle ($184 \pm 12\%$, $p < 0,001$) stärker, als mit *uba-1* RNAi, die zu einer 51% Steigerung der Paralyse gegenüber der Kontrolle führte ($151 \pm 24\%$, $p < 0,01$).

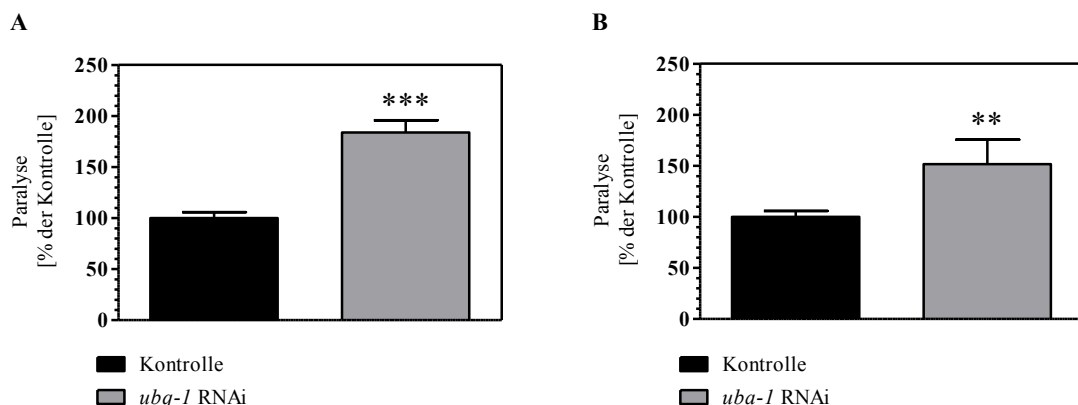


Abbildung 4-10 Paralyse mit *ubq-1* bzw. *uba-1* RNAi

Paralyse von CL2006 mit *ubq-1* (A) bzw. *uba-1* RNAi (B) sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); ** $p < 0,01$ bzw. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Im Folgenden konnte der direkte Beweis erbracht werden, dass durch die *ubq-1* bzw. die *uba-1* RNAi die Aktivität des Proteasoms gehemmt wird (Abbildung 4-11). Die *ubq-1* RNAi führte zu einer Senkung der proteasomalen Aktivität um 45% im Vergleich zur Kontrolle ($55 \pm 8\%$, $p < 0,01$), eine *uba-1* RNAi senkte die Proteasomaktivität signifikant um 37% im Vergleich zur Kontrolle ($63 \pm 6\%$, $p < 0,05$).

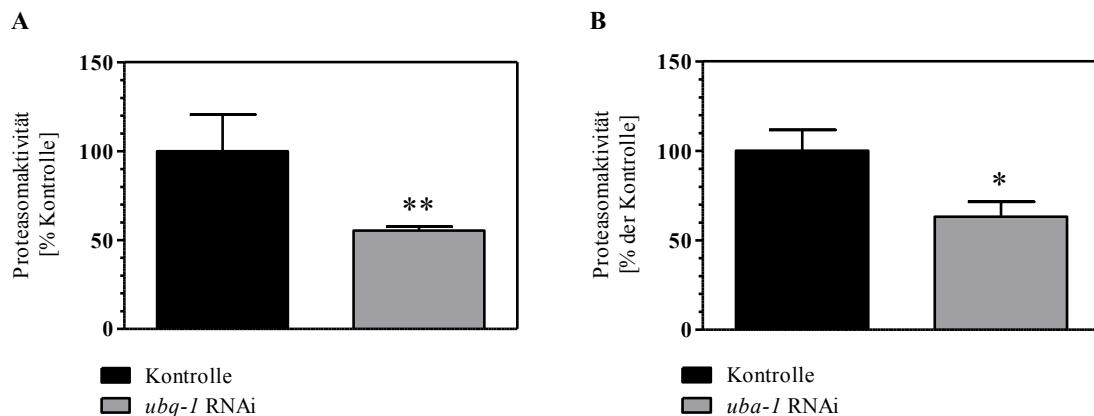


Abbildung 4-11 Proteasomaktivität mit *ubq-1* und *uba-1* RNAi

Proteasomaktivität als % der Kontrolle mit *ubq-1* (A) und *uba-1* RNAi (B); * $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle.

Die verminderte proteasomale Aktivität war assoziiert mit einer gesteigerten Menge an Proteinaggregaten in Lösung. Wie in Abbildung 4-12 dargestellt, führte die *ubq-1* RNAi zu einer Steigerung der Proteinaggregation um das 2,7-fache (270 ± 3 , $p < 0,001$), die *uba-1* RNAi zu einem Anstieg an Proteinaggregaten um 30% im Vergleich zur Kontrolle ($130 \pm 8\%$, $p < 0,001$). Diese Resultate deuten darauf hin, dass ein aktives proteasomales System zum Abbau fehlerhafter aggregierter Proteine Voraussetzung dafür ist, die Paralyse in CL2006 zu vermindern.

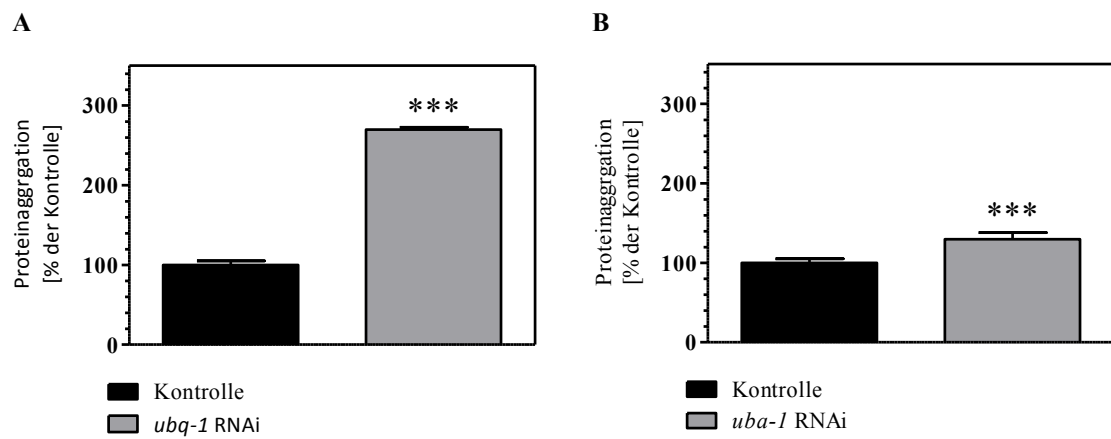


Abbildung 4-12 Proteinaggregation mit *ubq-1* bzw. *uba-1* RNAi

Proteinaggregation als % der Kontrolle mit *ubq-1* (A) bzw. *uba-1* RNAi (B); *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

4.3.3 Bedeutung der Autophagie für die Paralyse in CL2006

Neben dem UPS gibt es mit der Autophagie eine weitere Möglichkeit aggregierte Proteine abzubauen. Autophagie ist ein konservierter Prozess, der es der Zelle ermöglicht cytosolisch akkumulierte Proteine, geschädigte oder nicht mehr benötigte zelluläre Bestandteile sowie ganze Zellorganellen abzubauen. Die Autophagie wird in drei Wege aufgeteilt: die Makroautophagie, die Mikroautophagie und die CMA. Da für die Mikroautophagie kein Zusammenhang zu degenerativen Erkrankungen bekannt ist, sollte im Folgenden untersucht werden, welche Bedeutung die Makroautophagie sowie die CMA für die Entstehung des Alzheimer-Phänotyps im Alzheimer-Modell CL2006 haben. Die Makroautophagie zeichnet sich durch die initiale Bildung von Autophagosomen aus, die anschließend mit den Lysosomen verschmelzen. Dies ermöglicht den Abbau ganzer Zellorganellen oder komplexer Proteine. Da *bec-1* als zentrales Gen an der Bildung von Autophagosomen beteiligt ist, wurde dieses mittels RNAi in seiner Expression vermindert und der Effekt auf die Paralyse sowie der Effekt auf die Lysosomenbildung, als Marker für die Autophagie, in CL2006 ermittelt (siehe Abbildung 4-13). Die Durchführung der *bec-1* RNAi führte zu einem signifikanten Anstieg der Paralyserate. Im Vergleich zur Kontrolle waren mit *bec-1* RNAi 51% mehr Nematoden paralysiert ($151 \pm 5\%$, $p < 0,001$). Dies weist darauf hin, dass eine effektive Beseitigung fehlerhafter Proteine durch die Makroautophagie wichtig ist, um die Paralyse zu vermindern.

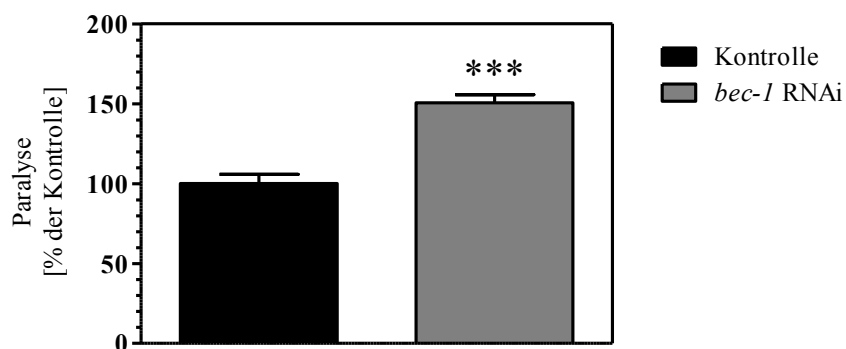


Abbildung 4-13 Paralyserate mit *bec-1* RNAi

Paralyserate von CL2006 mit *bec-1* RNAi sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Des Weiteren führte die *bec-1* RNAi in *C. elegans*, wie in Abbildung 4-14 dargestellt, zu einer um 29% signifikant verminderten Lysosomenbildung im Vergleich zur Kontrolle ($71 \pm 14\%$, $p < 0,001$). Das bestätigt die Annahme, dass BEC-1 essentiell für den vollständigen Ablauf der Autophagie ist.

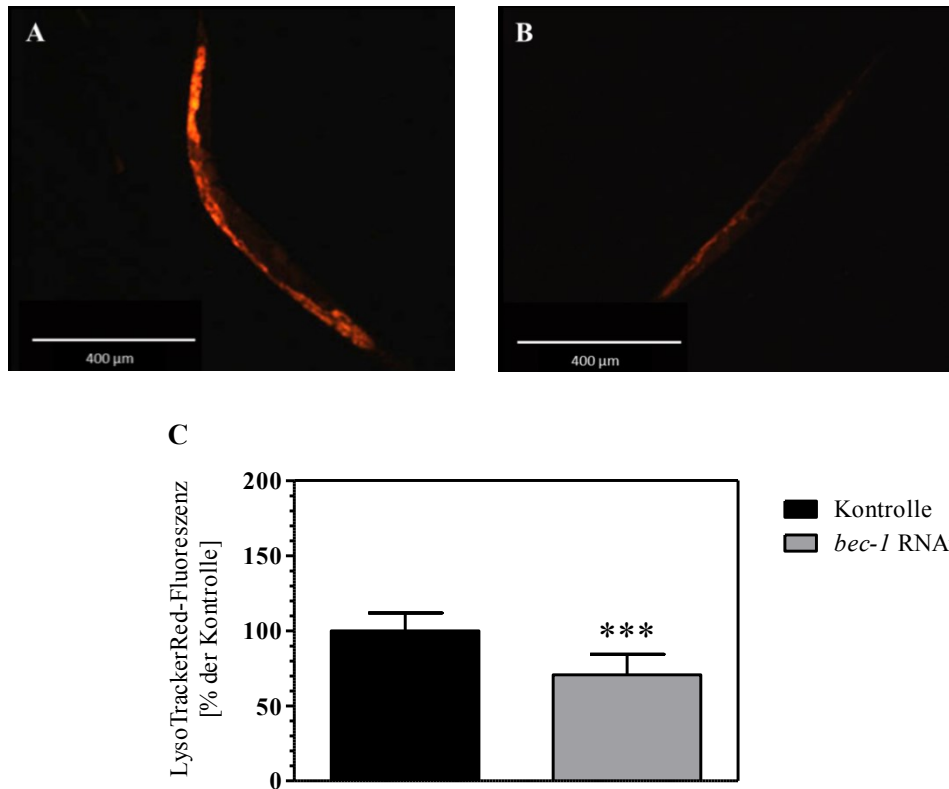


Abbildung 4-14 Lysosomenbildung mit *bec-1* RNAi

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefärbter Lysosomen in CL2006 Kontrolle (A) bzw. mit *bec-1* RNAi (B); Relative LysoTracker® Red Fluoreszenz als Maß für die Lysosomenbildung (C); *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Die CMA beschreibt eine Art der Autophagie, bei der im Gegensatz zu anderen autophagosomalen Prozessen die im Cytosol frei vorliegenden löslichen Proteine direkt in die Lysosomen aufgenommen und abgebaut werden können. Hierbei spielen spezifische Rezeptoren der LAMP2-Familie eine wichtige Rolle. Die CMA als Prozess ist bislang nur in Säugetieren beschrieben, jedoch sind für *C. elegans* strukturhomologe Gene bekannt, welche die Existenz der CMA in *C. elegans* vermuten lassen. *Lmp-2* ist eines von zwei in *C. elegans* beschriebenen LAMP-homologen Genen. Desweiteren wird UNC-46 als Transmembranprotein mit einem einzelnen LAMP2-homologen Motiv beschrieben. Weder die durch RNAi verminderte Expression von *Lmp-2* noch die

von *unc-46* führten in CL2006 zu einer veränderten Paralyserate gegenüber der Kontrolle ($92 \pm 7\%$ bzw. $90 \pm 8\%$, Abbildung 4-15). Dies deutet darauf hin, dass in *C. elegans* entweder keine CMA stattfindet oder diese ohne Bedeutung für die A β -induzierte Paralyse ist.

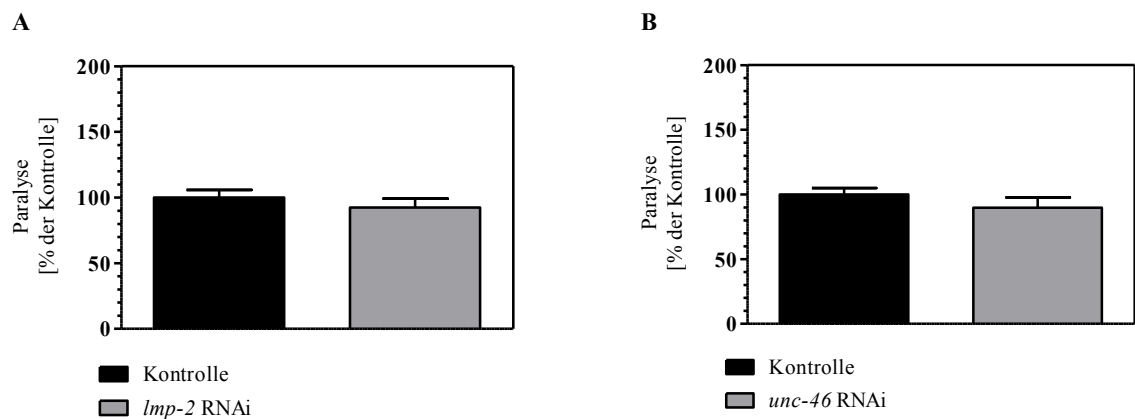


Abbildung 4-15 Paralyserate mit *Imp-2* bzw. *unc-46* RNAi

Paralyserate mit *Imp-2* (A) bzw. *unc-46* RNAi (B) sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C).

4.4 Bedeutung des Quercetins für die β -Amyloid-induzierte Paralyse in CL2006

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von Quercetin auf die Entwicklung des Alzheimer-Phänotyps im *C. elegans* Alzheimer-Modell CL2006. Polyphenole der menschlichen Ernährung, wie z. B. das Quercetin, werden in der Literatur häufig mit der Prävention neurodegenerativer Erkrankungen wie z. B. AD in Zusammenhang gebracht.

4.4.1 Quercetin senkt die Paralyse in CL2006

Zuerst sollte im Folgenden geklärt werden, welchen Effekt Quercetin in Bezug auf die Paralyse in CL2006 hat. Dazu wurden jung-adulte Nematoden für 48 h mit Quercetin in den Konzentrationen 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M inkubiert. Nach einem Hitzeschock

(1 h 35°C) wurde die Paralyserate ermittelt. Es zeigte sich eine von der Quercetinkonzentration abhängige Verminderung der Paralyserate. Wie in Abbildung 4-16 dargestellt, führte 1 μM Quercetin zu keiner Veränderung der Paralyserate ($93 \pm 15\%$) wohingegen die Inkubationen mit 10 μM und 100 μM Quercetin die Paralyse signifikant senkten. Eine Inkubation mit 10 μM Quercetin senkte die Paralyse um 25% im Vergleich zur Kontrolle ($75 \pm 4\%$, $p < 0,01$), eine Inkubation mit 100 μM führte zu einer Reduktion um 58% ($42 \pm 10\%$, $p < 0,001$). Da der Effekt mit 100 μM Quercetin am stärksten war, wurde diese Quercetinkonzentration, wenn nicht anders angegeben, für alle folgenden Versuche eingesetzt.

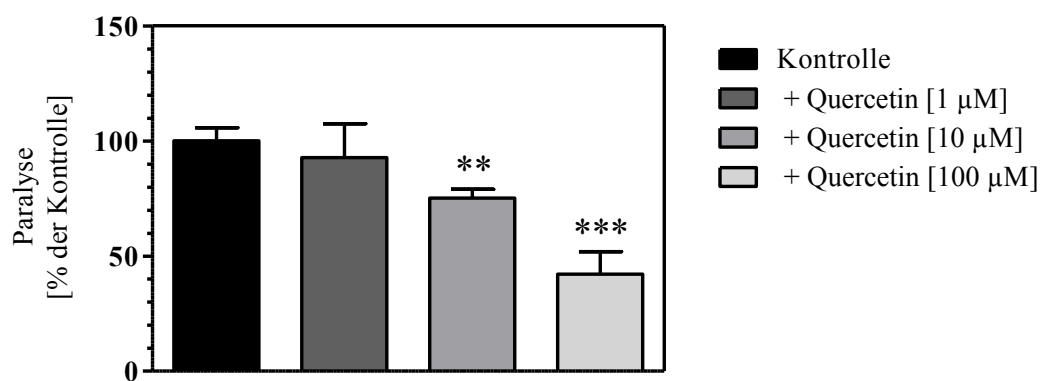


Abbildung 4-16 Paralyserate nach 48 h Inkubation mit 1 μM , 10 μM und 100 μM Quercetin

Paralyserate von CL2006 nach 48 h Inkubation mit 1 μM , 10 μM und 100 μM Quercetin sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); ** $p < 0,01$ bzw. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

4.4.2 Quercetin reduziert die Menge an aggregiertem Protein in CL2006

Neurodegenerative Erkrankungen sind in der Regel gekennzeichnet durch eine vermehrte Akkumulation und Aggregation fehlerhafter Proteine. Auch bei der AD kommt es vermehrt zu einer Bildung von Proteinaggregaten. Wie bereits gezeigt (Kapitel 4.1) weist auch CL2006 im Vergleich zu dem *C. elegans* Wildtyp eine gesteigerte Menge aggregierter Proteine in Lösung auf. Die folgenden Untersuchungen sollten klären, ob eine Inkubation mit 100 μM Quercetin die Menge an aggregiertem Protein beeinflussen kann.

Eine 48 h Inkubation mit Quercetin senkte die Menge an Proteinaggregaten im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 44% ($56 \pm 1\%$, $p < 0,001$, Abbildung 4-17). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass Quercetin über eine Verminderung der Proteinaggregation positiven Einfluss auf die Ausprägung des Alzheimer-Phänotyps in CL2006 nimmt.

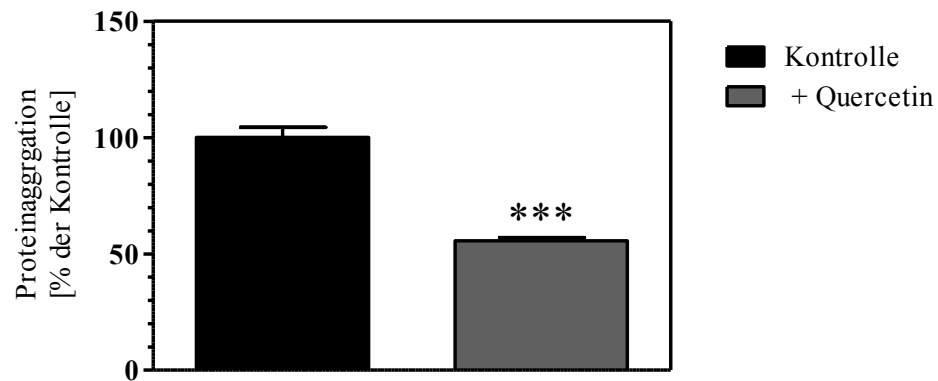


Abbildung 4-17 Proteinaggregation nach 48 h Inkubation mit Quercetin

Proteinaggregation in CL2006 nach 48 h Inkubation mit 100 μM Quercetin; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

4.4.3 Quercetin reduziert die Paralyse in CL2006 nicht aufgrund seiner antioxidativen Kapazität

Ein Effekt der Akkumulation fehlerhafter Proteine, speziell der A β -Plaques, ist die Initiierung oxidativer Prozesse, welche zu massiven Schädigungen und somit zu degenerativen Erkrankungen führen können. Gleichzeitig ist eine der beschriebenen Haupteigenschaften des Polyphenols Quercetin dessen antioxidatives Potential. Um die Bedeutung der antioxidativen Kapazität von Quercetin für dessen Effekt auf die Paralyse zu untersuchen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker® Red CM-H₂XRos verwendet (Kapitel 3.4). In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob die A β -Expression in CL2006 im Vergleich zum Wildtyp einen Einfluss auf die ROS-Bildung aufweist (Abbildung 4-18). CL2006 zeigte einen um 120% ($220 \pm 52\%$) erhöhten mitochondrialen ROS-Spiegel im Vergleich zum Wildtyp N2 ($p < 0,001$).

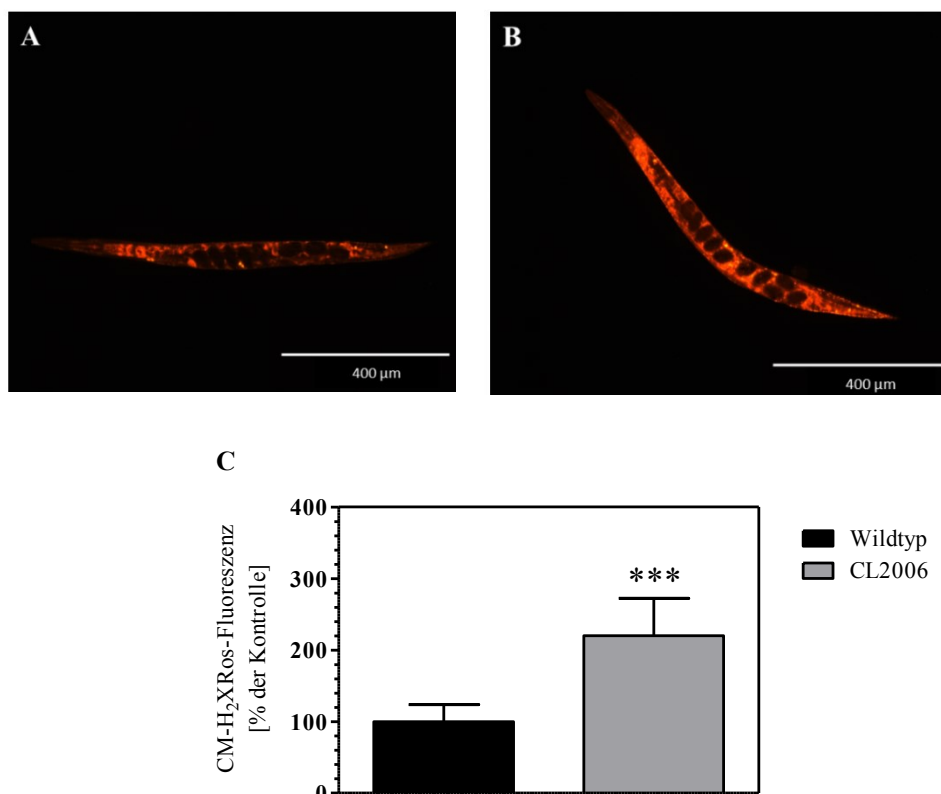


Abbildung 4-18 CM-H₂XRos von CL2006 im Vergleich zum *C. elegans* Wildtyp

Mitochondriale ROS-Spiegel vom Wildtyp N2 (A) im Vergleich zu CL2006 (B), Anfärbung mit CM-H₂XRos und Quantifizierung der ROS-Spiegel (C); *** $p < 0,001$ vs. N2.

Quercetin beeinflusste die mitochondrialen ROS-Spiegel in CL2006 konzentrationsabhängig (Abbildung 4-19). Während 1 μM Quercetin keinen Effekt auf die ROS-Bildung aufwies ($103 \pm 13\%$), senkte eine Inkubation mit 10 μM bzw. 100 μM Quercetin gebildete ROS ($p < 0,001$). 10 μM Quercetin senkte die ROS-Spiegel um 27% gegenüber der Kontrolle ($73 \pm 11\%$), 100 μM Quercetin führte zu einer Reduktion um 46% ($54 \pm 8\%$).

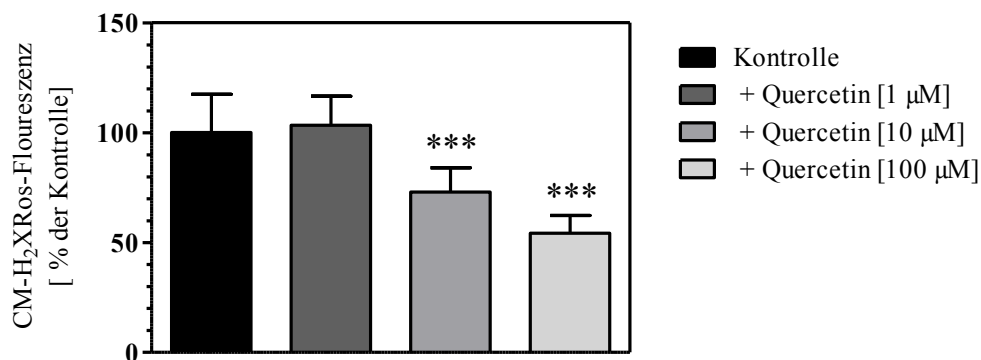


Abbildung 4-19 CM-H₂XROS nach 48 h Inkubation mit 1 μM , 10 μM und 100 μM Quercetin

Mitochondriale ROS-Spiegel nach 48 h Inkubation mit 1 μM , 10 μM und 100 μM Quercetin; Anfärbung mit MitoTracker® Red CM-H₂XROS und fluoreszenzmikroskopischer Bestimmung; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Um zu untersuchen, ob die Reduktion der ROS-Bildung der Grund für die geminderte Paralyserate in mit Quercetin behandelten Nematoden war, wurden jung-adulte CL2006 für 48 h mit dem Antioxidans Ascorbinsäure behandelt um freie ROS abzufangen. Abbildung 4-20 zeigt, dass Ascorbinsäure konzentrationsabhängig die ROS-Produktion unterdrückte ($p < 0,001$). Eine Behandlung der Nematoden mit 250 μM Ascorbinsäure führte zu einem Rückgang des ROS-Spiegels um 18% ($82 \pm 12\%$), mit 500 μM Ascorbinsäure sank dieser um 35% gegenüber der Kontrolle ($65 \pm 9\%$) und war somit vergleichbar mit dem durch 100 μM Quercetin erreichten Niveau.

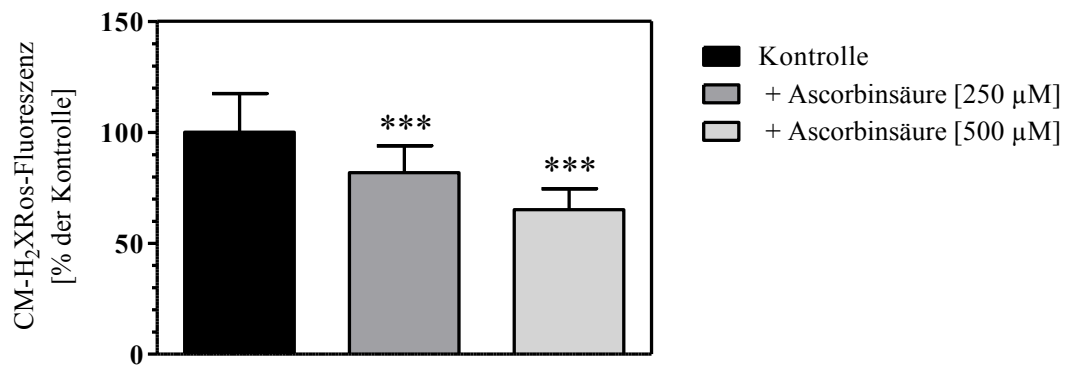


Abbildung 4-20 CM-H₂XROS nach 48 h Inkubation mit Ascorbinsäure

Mitochondriale ROS-Spiegel nach 48 h Inkubation mit 250 µM und 500 µM Ascorbinsäure; Anfärbung mit MitoTracker® Red CM-H₂XROS und fluoreszenzmikroskopischer Bestimmung; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Jedoch hatte eine Inkubation weder mit 250 µM noch mit 500 µM Ascorbinsäure Einfluss auf die Paralyserate in CL2006 (Abbildung 4-21). Diese Ergebnisse zeigen, dass die ROS-Spiegel nicht ursächlich für die Paralyse sind und das Quercetin eine Inhibierung der Paralyse durch Aktivitäten erreicht, die unabhängig von dessen antioxidativer Kapazität sind.

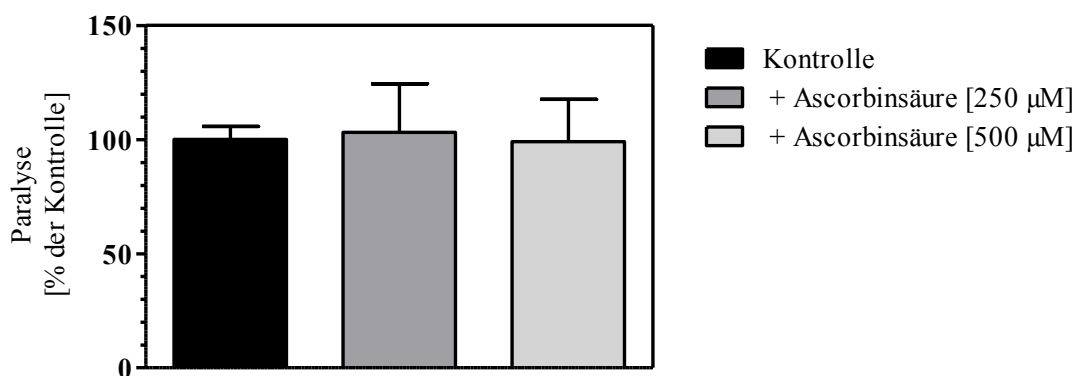


Abbildung 4-21 Paralyserate nach 48 h Inkubation mit Ascorbinsäure

Paralyserate von CL2006 nach 48 h Inkubation mit 250 µM und 500 µM Ascorbinsäure sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C).

4.4.4 Quercetin reduziert die Paralyse unabhängig von dessen Sirtuinaktivierung

Da Quercetin als Sirtuinaktivator beschrieben wird, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob die Reduktion der Paralyse durch Quercetin von der Aktivierung des Sirtuins SIR-2.1 abhängig ist. Die alleinige RNAi von *sir-2.1* führte, wie schon zuvor gezeigt (vgl. Kapitel 4.2.2.1), zu einer Reduktion der Paralyserate gegenüber der Kontrolle. Die zusätzliche Inkubation mit 100 μ M Quercetin führte zu einer weiteren Senkung ($p < 0,01$) der Paralyse um 28% im Vergleich zur *sir-2.1* RNAi-Gruppe auf $44 \pm 7\%$ der Kontrolle. Die Reduktion der Paralyse durch Quercetin ist diesen Erkenntnissen zu Folge unabhängig von dessen Sirtuinaktivierung.

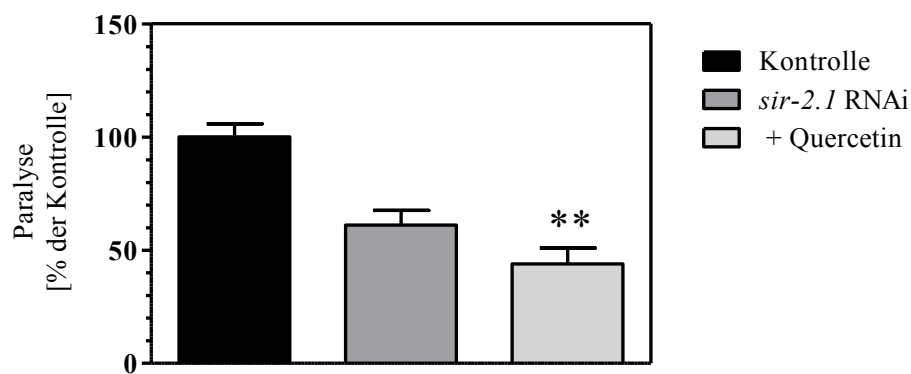


Abbildung 4-22 Paralyserate mit *sir-2.1* RNAi und nach 48 h Inkubation mit Quercetin

Paralyserate mit *sir-2.1* RNAi und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Quercetin sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); ** $p < 0,01$ vs. RNAi-Gruppe. Die Signifikanzen der *sir-2.1* RNAi sind der Abbildung 4-6 zu entnehmen.

4.4.5 Einfluss von Quercetin auf die Proteosase in CL2006

In Kapitel 4.1 wurden zentrale Gene der Proteostase mit Einfluss auf die A β -induzierte Paralyse in CL2006 ermittelt. Der folgende Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welche von diesen Genen Zielgene des Quercetins darstellen. Dazu wurden die entsprechenden Gene mittels RNAi in ihrer Expression gemindert und zusätzlich wurden die Nematoden für 48 h mit 100 μ M Quercetin inkubiert. Kam es mit RNAi zu keiner Senkung der Paralyse durch Quercetin deutete dies darauf hin, dass es sich bei dem entsprechenden Gen um ein Zielgen des Quercetins handelte.

4.4.5.1 Quercetin senkt die Paralyse in UPR^{mt}-defizienten Nematoden

Eine verminderte Expression der für die UPR^{mt} wichtigen Gene *hsp-6*, *hsp-60* und *dve-1* führte zu einem Anstieg der Paralyserate in CL2006 (Kapitel 4.3.1), welche durch Quercetin wieder gesenkt werden konnte (Abbildung 4-23).

In Kombination mit der RNAi von *hsp-6* und *hsp-60* führte die Quercetininkubation zu einem Rückgang der Paralyse um 40% (auf $78 \pm 17\%$) bzw. um 20% (auf $107 \pm 8\%$) verglichen mit der jeweiligen RNAi-Gruppe ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,05$). Unter der RNAi des Transkriptionsfaktors *dve-1* reduzierte sich die Paralyse durch Quercetin um 60% (auf $66 \pm 7\%$, $p < 0,001$). Auch wenn bereits gezeigt wurde, dass die *ubl-5* RNAi die Paralyse nicht beeinflusste (vgl. Kapitel 4.3.1), schließt dies nicht gänzlich eine mögliche Wirkung von Quercetin über UBL-5 auf die Paralyse aus, vorausgesetzt, dass der Faktor ursprünglich inaktiv wäre und erst durch Quercetin aktiviert würde. Um dies zu untersuchen wurde Quercetin auch auf *ubl-5* RNAi Nematoden appliziert. Mit der *ubl-5* RNAi kam es ebenfalls zu einer Reduktion der Paralyserate durch Quercetin um 26% (auf $72 \pm 9\%$) im Vergleich zur RNAi-Behandlung ($p < 0,001$). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die untersuchten Gene der UPR^{mt} nicht die Zielmoleküle des Quercetins im Hinblick auf die Reduktion der Paralyse sind.

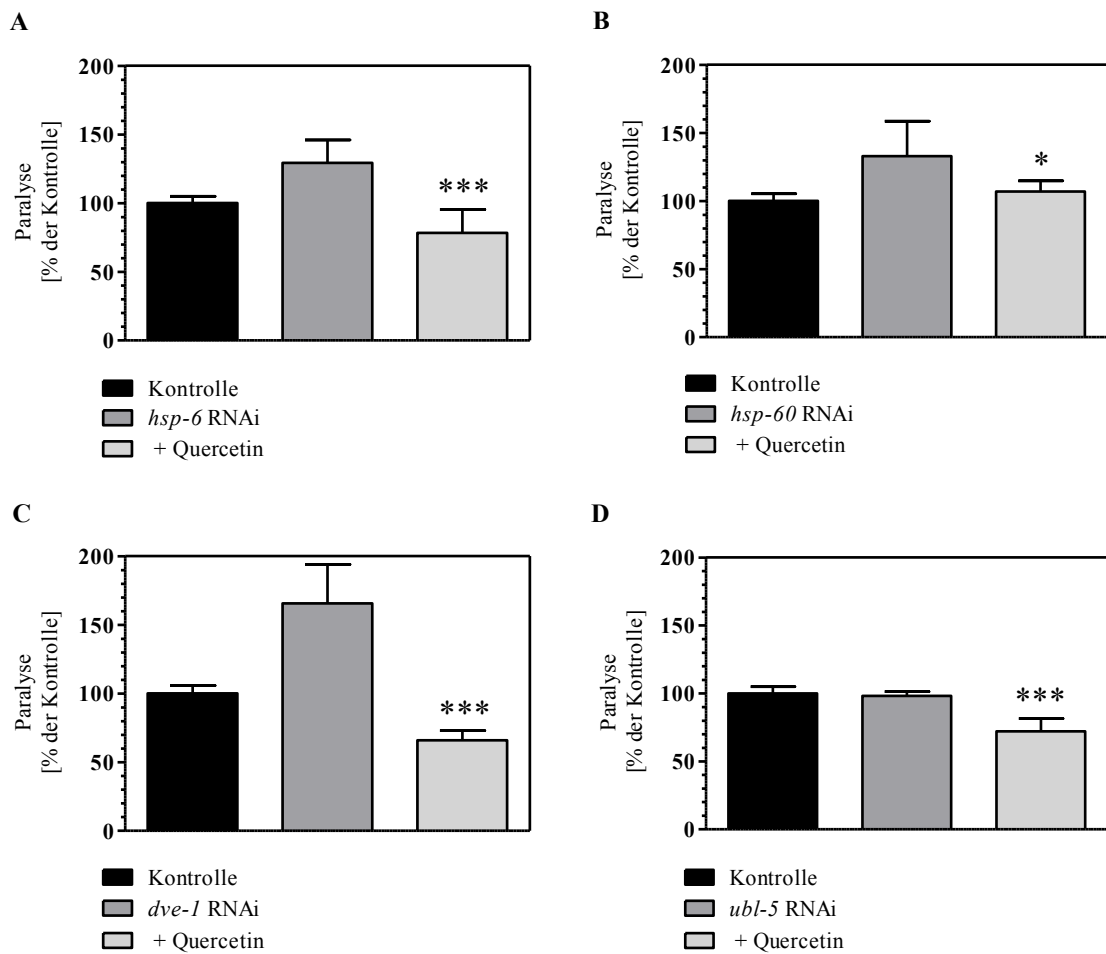


Abbildung 4-23 Paralyserate in UPR^{mt}-defizienten Nematoden und nach 48 h Inkubation mit Quercetin

Paralyserate mit *hsp-6* (A), *hsp-60* (B), *dve-1* (C) bzw. *ubl-5* RNAi (D) und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Quercetin sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); * $p < 0,05$ bzw. *** $p < 0,001$ vs. RNAi-Gruppe. Die Signifikanzen der RNAi-Gruppen sind der Abbildung 4-8 zu entnehmen.

Wie in Kapitel 4.3.1 gezeigt wurde, führte die RNAi des zentralen Transkriptionsfaktors XBP-1 der UPR^{ER} zu einem Anstieg der Paralyse. Die zusätzliche Applikation von Quercetin senkte auch mit *xbp-1* RNAi die Paralyse um 80% ($28 \pm 35\%$) im Vergleich zur RNAi-Gruppe ($p < 0,001$, Abbildung 4-24). Die *abu-1* und *abu-11* RNAi zeigte keinen Effekt auf die Paralyse. Analog zu *ubl-5* wurde dennoch die Bedeutung im Hinblick auf die Quercetinwirkung betrachtet. Mit RNAi von *abu-1* senkte Quercetin die Paralyse um 67% ($34 \pm 24\%$, $p < 0,001$) und mit *abu-11* RNAi senkte Quercetin die Paralyse ebenfalls noch um 51% ($49 \pm 16\%$, $p < 0,001$).

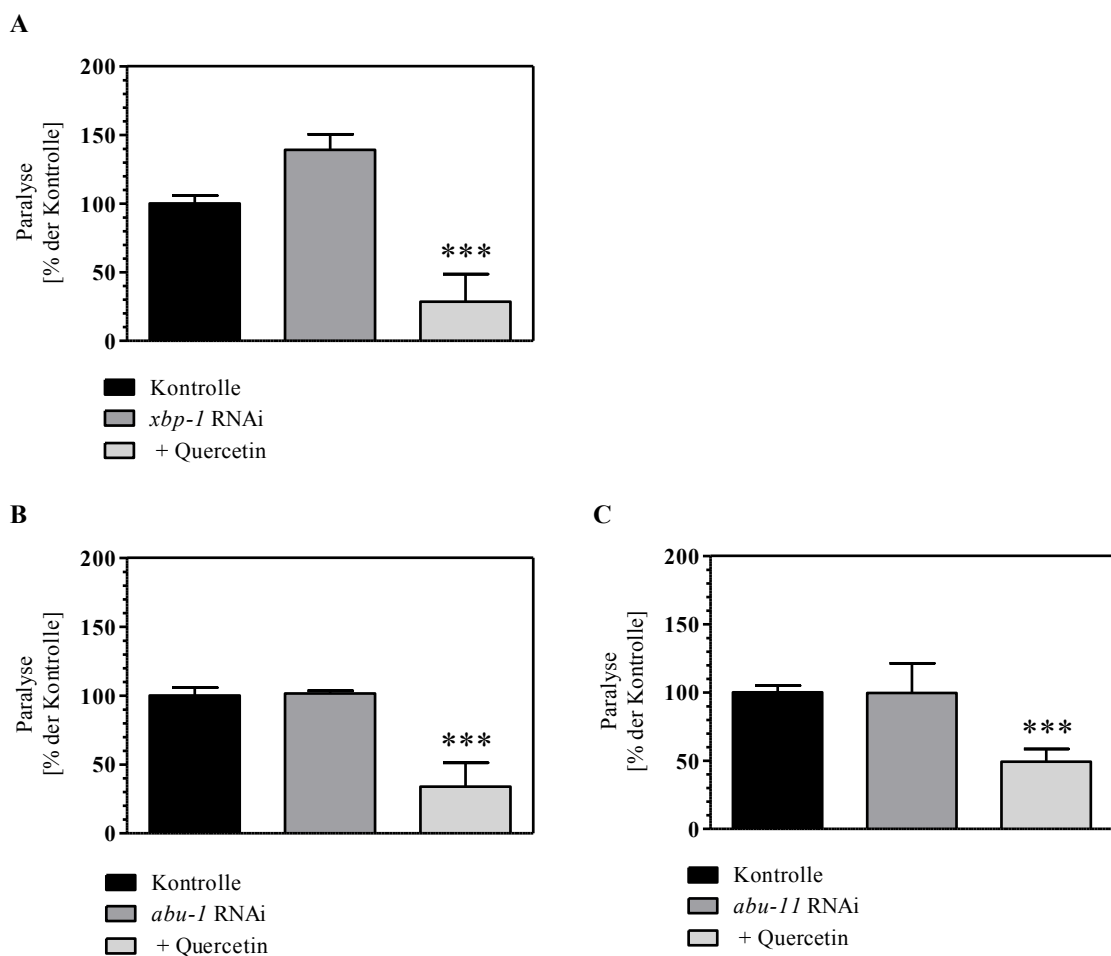


Abbildung 4-24 Paralyserate in UPR^{ER}-defizienten Nematoden und nach 48 h Inkubation mit Quercetin

Paralyserate mit *xbp-1* RNAi (A), *abu-1* (B) bzw. *abu-11* (C) und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Quercetin sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); *** $p < 0,001$ vs. RNAi-Gruppe. Die Signifikanzen der RNAi-Gruppen sind der Abbildung 4-9 zu entnehmen

4.4.5.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System erweist sich als Zielstruktur des Quercetins

Das UPS spielt eine wichtige Rolle im Abbau fehlerhafter, akkumulierter Proteine. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein effektiver proteasomaler Proteinabbau für die Verhinderung des Alzheimer-Phänotyps in CL2006 essentiell ist (Kapitel 4.3.2). Im Folgenden sollte die Bedeutung des UPS für die Effekte des Quercetins auf die Senkung der Paralyse in CL2006 im Mittelpunkt stehen. Wie bereits gezeigt, führte die RNAi von *ubq-1* und *uba-1* zu einer signifikanten Erhöhung der Paralyserate in CL2006. Eine 48 h Inkubation mit Quercetin konnte weder den paralysesteigernden Effekt der *ubq-1* noch den der *uba-1* RNAi ausgleichen. Mit *ubq-1* RNAi und Quercetin blieb die Paralyserate um 75% ($175 \pm 16\%$) im Vergleich zur Kontrolle erhöht, nach *uba-1* RNAi und Quercetininkubation war die Paralyserate um 38% ($138 \pm 12\%$) erhöht. Dies beweist, dass Quercetin ein aktives UPS benötigt oder dieses gar aktiviert, um die Paralyse im Alzheimer-Modell zu senken.

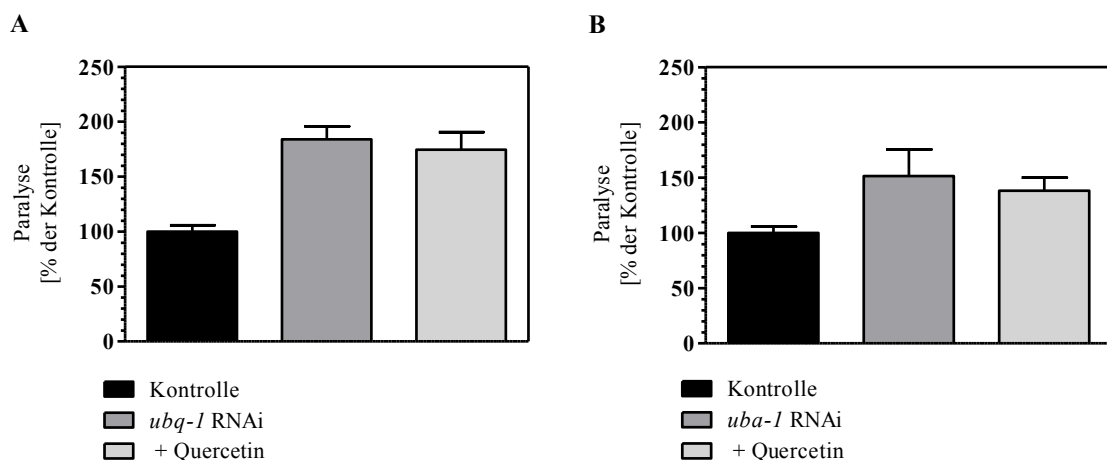


Abbildung 4-25 Paralyserate mit *ubq-1* bzw. *uba-1* RNAi und nach 48 h Inkubation mit Quercetin
Paralyserate mit *ubq-1* (A) bzw. *uba-1* RNAi (B) und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Quercetin sowie anschließendem Hintzeschock (1 h 35°C). Die Signifikanzen der *ubq-1* sowie *uba-1* RNAi sind der Abbildung 4-10 zu entnehmen.

Die Bestimmung der Proteasomaktivität anhand der proteolytischen Umsetzung eines an ein Fluorogen gekoppelten Peptids ergab, dass 100 μ M Quercetin die Proteasomaktivität in CL2006 signifikant um 54% ($154 \pm 24\%$) steigerte ($p < 0,001$, Abbildung 4-26).

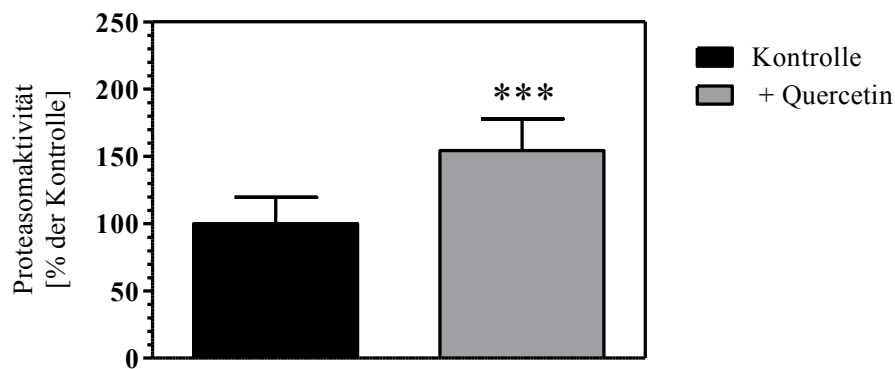


Abbildung 4-26 Proteasomaktivität nach 48 h Inkubation mit Quercetin

Proteasomaktivität als % der Kontrolle nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Quercetin; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Mit *uba-1* RNAi war die Proteasomaktivität signifikant erniedrigt und auch durch Quercetin nicht mehr steigerbar (Abbildung 4-27). Die Aktivität war mit *uba-1* RNAi mit $63 \pm 7\%$ im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,001$) auf einem ähnlich niedrigen Niveau wie mit zusätzlicher Quercetininkubation ($57 \pm 13\%$, $p < 0,001$). Diese Ergebnisse bestätigten, dass Quercetin über die Ubiquitinierung der Proteine direkten Einfluss auf das UPS nimmt und somit auch auf die Degradation fehlerhafter Proteine.

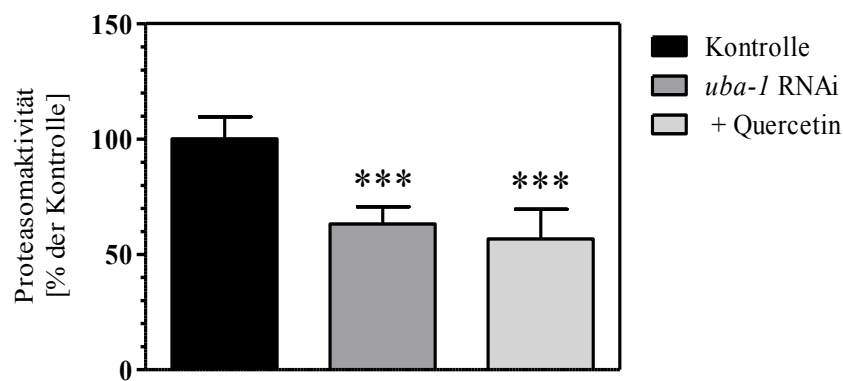


Abbildung 4-27 Proteasomaktivität mit *uba-1* RNAi und nach 48 h Inkubation mit Quercetin

Proteasomaktivität als % der Kontrolle mit *uba-1* RNAi und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Quercetin; *** $p <$ vs. Kontrolle.

4.4.5.3 Die Makroautophagie ist von zentraler Bedeutung für die Quercetin-vermittelte Reduktion der Paralyse

Die Autophagie ist neben dem UPS ein weiterer wichtiger Mechanismus fehlerhafte Proteine effektiv abzubauen. In Kapitel 4.3.3 wurden bereits zentrale Gene der Makroautophagie sowie der CMA mit Einfluss auf die A β -induzierte Paralyse in CL2006 ermittelt. Im Folgenden soll geklärt werden welche von diesen Genen Zielgene des Quercetins darstellen. Dazu wurden die entsprechenden Gene mittels RNAi in ihrer Expression gemindert und zusätzlich wurden die Würmer für 48 h mit 100 μ M Quercetin inkubiert. Um den zugrunde liegenden Mechanismus genauer aufzuklären, wurde zusätzlich der Einfluss des Quercetins und die Beteiligung entsprechender Gene auf die Lysosomenmenge untersucht. Die Makroautophagie ist, wie bereits gezeigt, maßgeblich an der Verminderung der Paralyse beteiligt.

Ein Ausschalten der Makroautophagie durch *bec-1* RNAi führte zu einem signifikanten Anstieg der Paralyserate in CL2006 (Kapitel 4.3.3). Auch durch die 48 h Inkubation mit 100 μ M Quercetin konnte die Paralyse unter *bec-1* RNAi nicht gesenkt werden und blieb um 40% ($140 \pm 7\%$) im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abbildung 4-28). Es bestand kein Unterschied der RNAi-behandelten Gruppen in Ab- bzw. Anwesenheit von Quercetin. Dieses Ergebnis zeigt, dass Quercetin die Paralyse in Abhängigkeit einer aktiven Makroautophagie senkt.

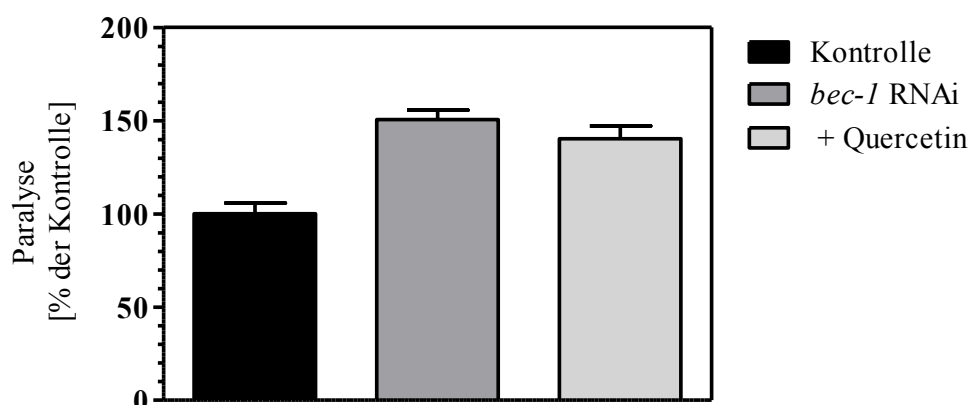


Abbildung 4-28 Paralyserate mit *bec-1* RNAi und nach 48 h Inkubation mit Quercetin

Paralyserate von CL2006 mit *bec-1* RNAi und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Quercetin sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); Die Signifikanzen der *bec-1* RNAi sind der Abbildung 4-13 zu entnehmen.

In Kapitel 4.3.3 konnte gezeigt werden, dass die Gene der CMA nicht an der Verminderung der Paralyse beteiligt sind. Da dies jedoch nicht gänzlich ausschließt, dass diese als Zielgene des Quercetins in Frage kommen, wurde eine RNAi der entsprechenden Gene durchgeführt und zusätzlich wurde Quercetin appliziert.

Mit *Imp-2* RNAi führte eine 48 h Inkubation mit 100 μ M Quercetin zu einer signifikanten Reduktion ($p < 0,001$) der Paralyse im Vergleich zur RNAi-Gruppe um 37% auf $58 \pm 1\%$. Mit *unc-46* RNAi fiel der Effekt mit einer Reduktion um 20% auf $72 \pm 14\%$ etwas geringer aus ($p < 0,05$, Abbildung 4-29). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Quercetin auch unter einer verminderten Expression der mit CMA in Verbindung gebrachten Gene *Imp-2* und *unc-46* Einfluss auf die Paralyse hat. Somit wird der Quercetineffekt nicht über diesen Weg der Autophagie vermittelt.

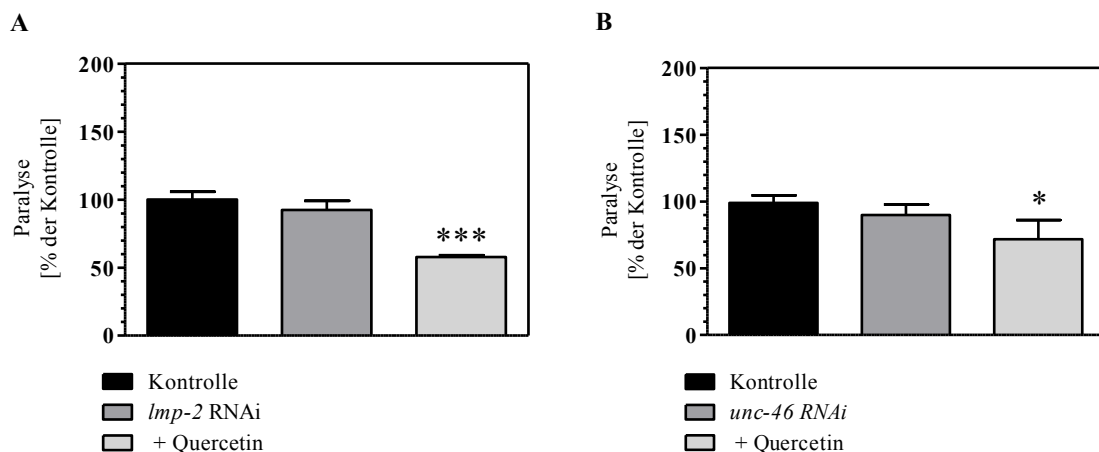


Abbildung 4-29 Paralyserate mit *Imp-2* bzw. *unc-46* RNAi und nach 48 h Inkubation mit Quercetin
Paralyserate in CL2006 mit *Imp-2* (A) bzw. *unc-46* RNAi (B) und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Quercetin sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); * $p < 0,05$ bzw. *** $p < 0,001$ vs. RNAi-Gruppe.

Jung-adulte Nematoden wurden für 48 h mit 100 μ M Quercetin inkubiert und mittels LysoTracker® Red wurde die Bildung der Lysosomen fluoreszenzmikroskopisch bestimmt (Abbildung 4-30). Es zeigte sich, dass Quercetin zu einer signifikanten Reduktion der Lysosomen um 43% im Vergleich zur Kontrolle führte ($57 \pm 18\%$, $p < 0,001$). Dies bestätigt, dass Quercetin die Autophagie auf lysosomaler Ebene beeinträchtigt.

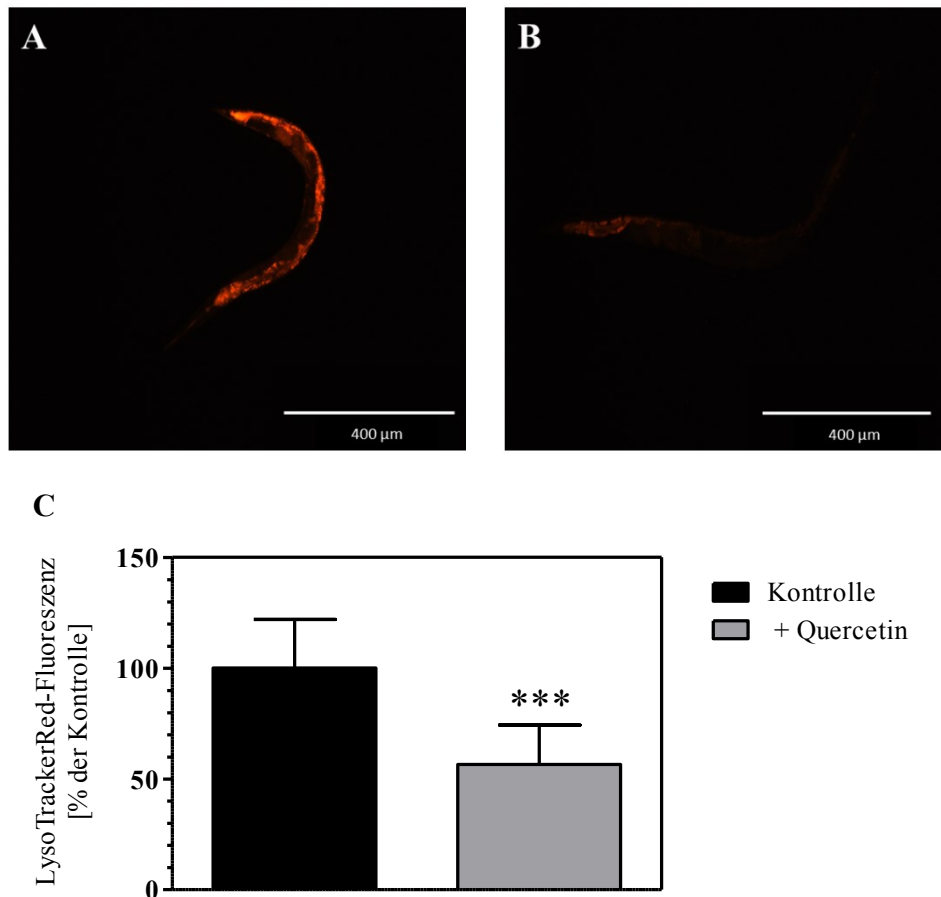


Abbildung 4-30 LysoTracker® Red Fluoreszenz nach 48 h Inkubation mit Quercetin

Anfärbung mit LysoTracker® Red: Kontrolle (A) und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Quercetin (B); LysoTracker® Red Fluoreszenz in % der Kontrolle nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Quercetin (C); *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Um zu klären über welchen Weg Quercetin letztendlich die Lysosomenbildung beeinflusst, wurden die Nematoden, zusätzlich zu Quercetin, ab dem jung-adulten Stadium mit 10 μ M Chloroquin inkubiert (Abbildung 4-31). Chloroquin hemmt den endolysosomalen Abbau über eine Erhöhung des lysosomalen pH und führt zu einer Akkumulation und Vergrößerung von Lysosomen. Eine Inkubation mit Chloroquin steigerte die Menge an Lysosomen um 47% im Vergleich zur Kontrolle ($147 \pm 25\%$, $p < 0,001$). Diese konnte in Gegenwart von Quercetin wieder um 21% im Vergleich zu nur mit Chloroquin behandelten Nematoden auf $116 \pm 24\%$ gesenkt werden ($p < 0,001$). Dies deutet darauf hin, dass Quercetin die Aktivierung des Proteinabbaus über die Autophagie verstärkt.

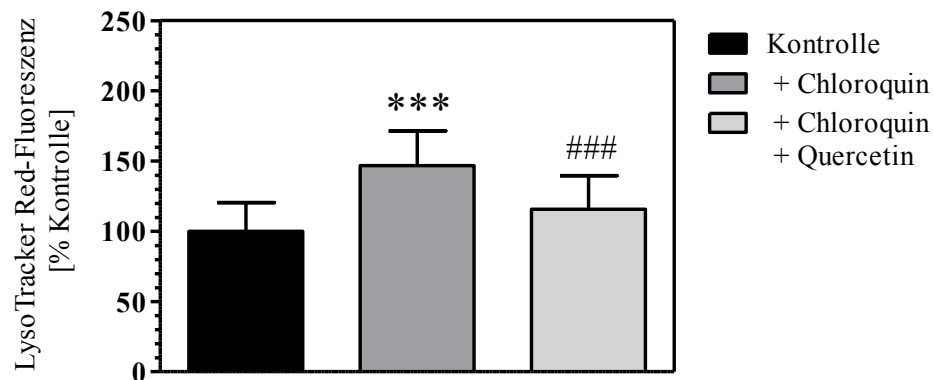


Abbildung 4-31 LysoTracker® Red Fluoreszenz nach 48 h Inkubation mit Chloroquin in Ab- und Anwesenheit von Quercetin

LysoTracker® Red Fluoreszenz in % der Kontrolle nach 48 h Inkubation mit 10 μ M Chloroquin in Ab- und Anwesenheit von 100 μ M Quercetin; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle bzw. ### $p < 0,001$ vs. mit Chloroquin behandelte Nematoden.

Wie gezeigt spielen die lysosomalen Rezeptoren der CMA funktionell keine Rolle für die Paralyse in CL2006 (vgl. Kapitel 4.3.3). Trotzdem sollte im Folgenden geklärt werden, ob sie dennoch eine Wirkung auf die Lysosomenbildung aufweisen und ob Quercetin für seine lysosomensenkende Wirkung die Rezeptoren benötigt (Abbildung 4-32).

Die RNAi von *Imp-2* führte zu einem signifikanten Rückgang der Menge an Lysosomen um 41% verglichen mit der Kontrolle ($59 \pm 17\%$, $p < 0,001$), wohingegen die RNAi von *unc-46* keinen Effekt aufwies ($98 \pm 25\%$). Wurden die Nematoden zusätzlich für 48 h mit 100 μ M Quercetin inkubiert, war wiederum ein signifikanter Rückgang der

Lysosomenmenge zu verzeichnen ($p < 0,01$), der unabhängig vom Gen-Effekt war. Unter *Imp-2* RNAi und Quercetininkubation sank die Menge an Lysosomen um 36% gegenüber der RNAi-Behandlung auf $38 \pm 12\%$ ($p < 0,01$). Mit *unc-46* RNAi sank die Lysosomenmenge durch zusätzliche Quercetininkubation um 30% gegenüber der RNAi-Gruppe auf $69 \pm 19\%$ der Kontrolle ($p < 0,01$). Dies bestätigt die Funktionalität von *Imp-2* in *C. elegans* und zeigt, dass Quercetin jedoch nicht über eine Aktivierung der lysosomalen Rezeptoren Einfluss auf die lysosomale Aktivität nimmt.

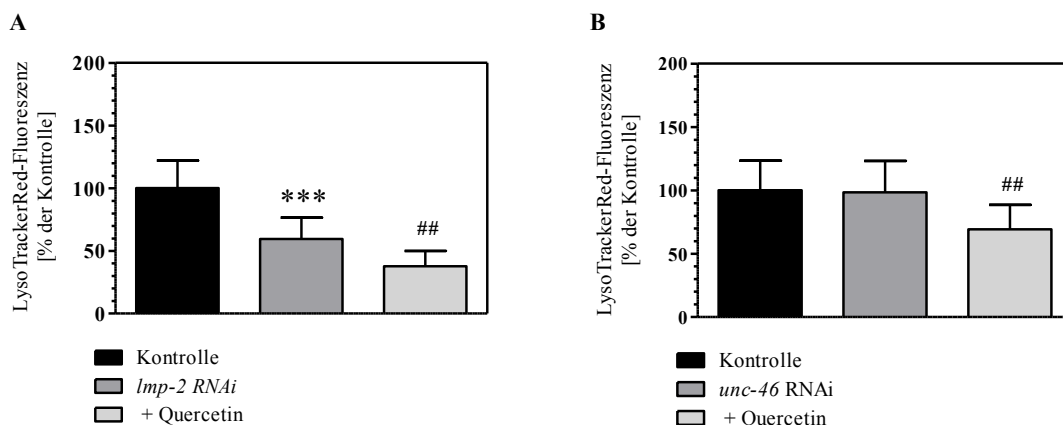


Abbildung 4-32 LysoTracker Red® Fluoreszenz mit *Imp-2* bzw. *unc-46* RNAi und nach 48 h Inkubation mit Quercetin

LysoTracker Red® Fluoreszenz in % der Kontrolle mit *Imp-2* (A) bzw. *unc-46* RNAi (B) und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Quercetin, *** $p < 0,001$ bzw. ## $p < 0,01$ vs. Kontrolle.

4.5 Bedeutung des Resveratrols für die β -Amyloid-induzierte Paralyse in CL2006

Der folgende Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung eines weiteren Polyphenols, des Resveratrols, für die Entwicklung des Alzheimer-Phänotyps in CL2006. Resveratrol ist neben Quercetin eines der am weitesten verbreiteten Polyphenole. Außerdem wird Resveratrol eine Bedeutung im Hinblick auf die Prävention einiger degenerativer Erkrankungen, inklusive neurodegenerativer Erkrankungen, zugesprochen.

4.5.1 Resveratrol senkt die Paralyse in CL2006

Zuerst sollte im Folgenden geklärt werden, welchen Effekt Resveratrol in Bezug auf die Paralyserate in CL2006 hat. Dazu wurden jung-adulte Nematoden für 48 h mit 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M Resveratrol inkubiert (Abbildung 4-33). Alle drei Konzentrationen senkten die Paralyserate signifikant. 1 μ M Resveratrol senkte die Paralyse um 39% im Vergleich zur Kontrolle ($61 \pm 14\%$, $p < 0,001$), 10 μ M Resveratrol um 25% ($75 \pm 7\%$, $p < 0,05$) und 100 μ M um 41% gegenüber der Kontrolle ($59 \pm 10\%$, $p < 0,001$). Wie schon für Quercetin gezeigt, senkte auch Resveratrol die Paralyserate in CL2006 konzentrationsabhängig, auch wenn die einzelnen Konzentrationen Unterschiede zu Quercetin in ihrer Effektivität aufwiesen. Um die Vergleichbarkeit mit Quercetin dennoch zu gewährleisten, wurde Resveratrol, wenn nicht anders angegeben, in einer Konzentration von 100 μ M weiter verwendet.

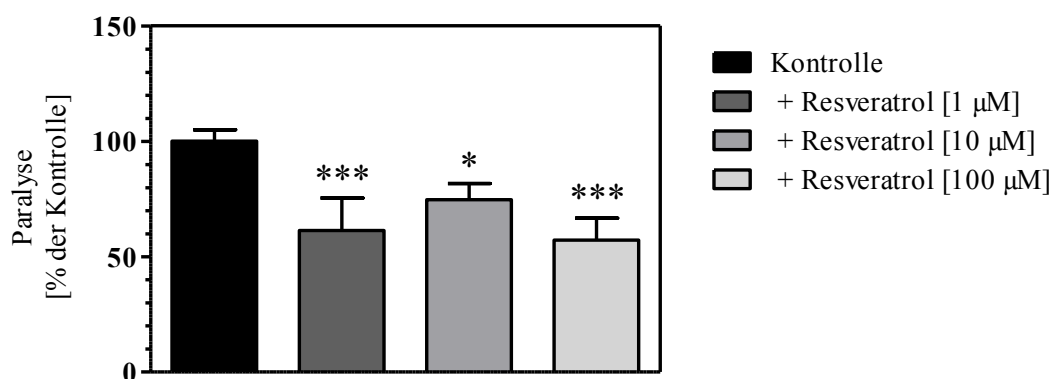


Abbildung 4-33 Paralyserate nach 48 h Inkubation mit 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M Resveratrol

Paralyserate von CL2006 nach 48 h Inkubation mit 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M Resveratrol sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); * $p < 0,05$ bzw. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

4.5.2 Resveratrol reduziert die Menge an aggregiertem Protein in CL2006

Wie in Kapitel 4.4.2 für Quercetin gezeigt, senkte auch Resveratrol die Menge aggregierter Proteine in Lösung und verminderte so die A β -induzierte Toxizität in CL2006 (Abbildung 4-34). Durch die Inkubation mit 100 μ M Resveratrol konnte ein signifikanter Rückgang der Menge der Proteinaggregate um 63% gegenüber der Kontrolle verzeichnet werden ($37 \pm 4\%$, $p < 0,001$).

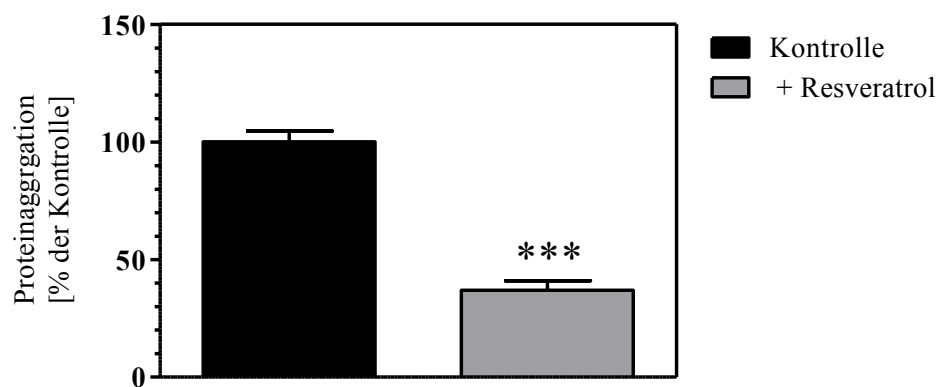


Abbildung 4-34 Proteinaggregation nach 48 h Inkubation mit Resveratrol

Proteinaggregation in Lösung von CL2006 nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Resveratrol; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

4.5.3 Resveratrol senkt mitochondriale ROS in CL2006

Während 1 μM Resveratrol, genau wie 1 μM Quercetin (vgl. Kapitel 4.4.3), keinen Einfluss auf die ROS-Spiegel in den Mitochondrien aufwies ($105 \pm 11\%$), senkte eine Inkubation mit 10 μM und 100 μM Resveratrol die mitochondriale ROS-Bildung signifikant ($p < 0,001$, Abbildung 4-35). Resveratrol in einer Konzentration von 10 μM senkte die ROS-Spiegel um 39% im Vergleich zur Kontrolle ($61 \pm 19\%$) und in einer Konzentration von 100 μM um 87% ($13 \pm 5\%$). In Kapitel 4.4.3 wurde bereits postuliert, dass die antioxidative Kapazität nicht entscheidend für die Paralyse ist. Dieses Postulat wird bestärkt durch die Reduktion der Paralyse durch 1 μM Resveratrol, die unabhängig von dessen antioxidativer Aktivität ist.

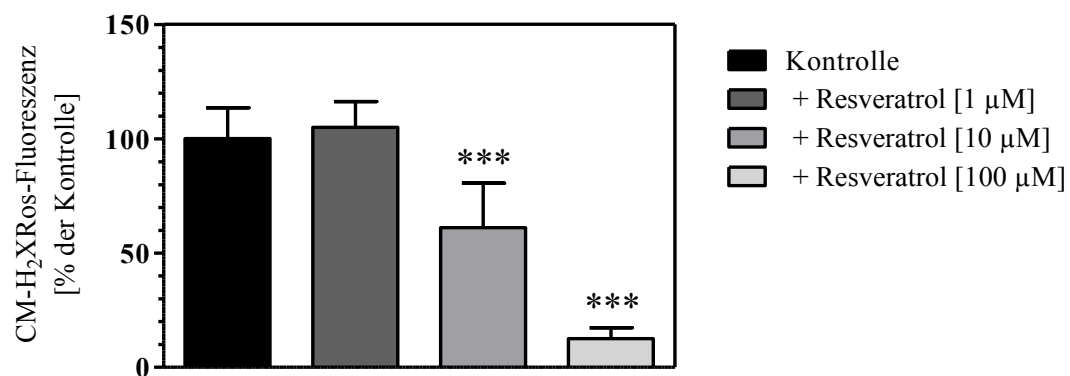


Abbildung 4-35 CM-H₂XROS nach 48 h Inkubation mit Resveratrol

Mitochondriale ROS-Spiegel nach 48 h Inkubation mit 1 μM , 10 μM und 100 μM Resveratrol; Anfärbung mit MitoTracker® Red CM-H₂XROS und fluoreszenzmikroskopischer Bestimmung; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

4.5.4 Einfluss von Resveratrol auf die Proteostase in CL2006

Um die Bedeutung der Proteostase für den durch Resveratrol vermittelten Effekt auf die Paralyserate in *C. elegans* CL2006 zu ermitteln, wurden die zentralen Gene der einzelnen Komponenten mittels RNAi in ihrer Expression vermindert. Im jung-adulten Stadium wurden die Nematoden mit 100 μ M Resveratrol für 48 h inkubiert, anschließend ein Hitzeschock (1 h, 35°C) durchgeführt und unmittelbar danach wurde die Paralyse gemessen.

4.5.4.1 Resveratrol aktiviert Zielproteine der UPR

Bei einer Inkubation von CL2006 mit 100 μ M Resveratrol konnte die Paralyserate trotz RNAi der mitochondrialen Chaperone HSP-6 und HSP-60 gesenkt werden ($p < 0,001$, Abbildung 4-36). Die RNAi von *hsp-6* senkte die Paralyse um 46% gegenüber der RNAi-Gruppe auf $71 \pm 25\%$, mit *hsp-60* RNAi sank die Paralyse durch Resveratrol gegenüber der RNAi-Gruppe um 52% auf $64 \pm 13\%$. Nach RNAi des Transkriptionsfaktors *dve-1* kam es zu einem Rückgang der Paralyse ($p < 0,001$) durch Resveratrol im Vergleich zur RNAi-Gruppe um 35% auf $58 \pm 5\%$. Obwohl eine *ubl-5* RNAi die Paralyse nicht beeinflusste (vgl. Kapitel 4.3.1) verhinderte sie die Reduktion der Paralyse durch Resveratrol ($99 \pm 7\%$). Dies deutet auf eine Aktivierung von UBL-5 durch Resveratrol hin.

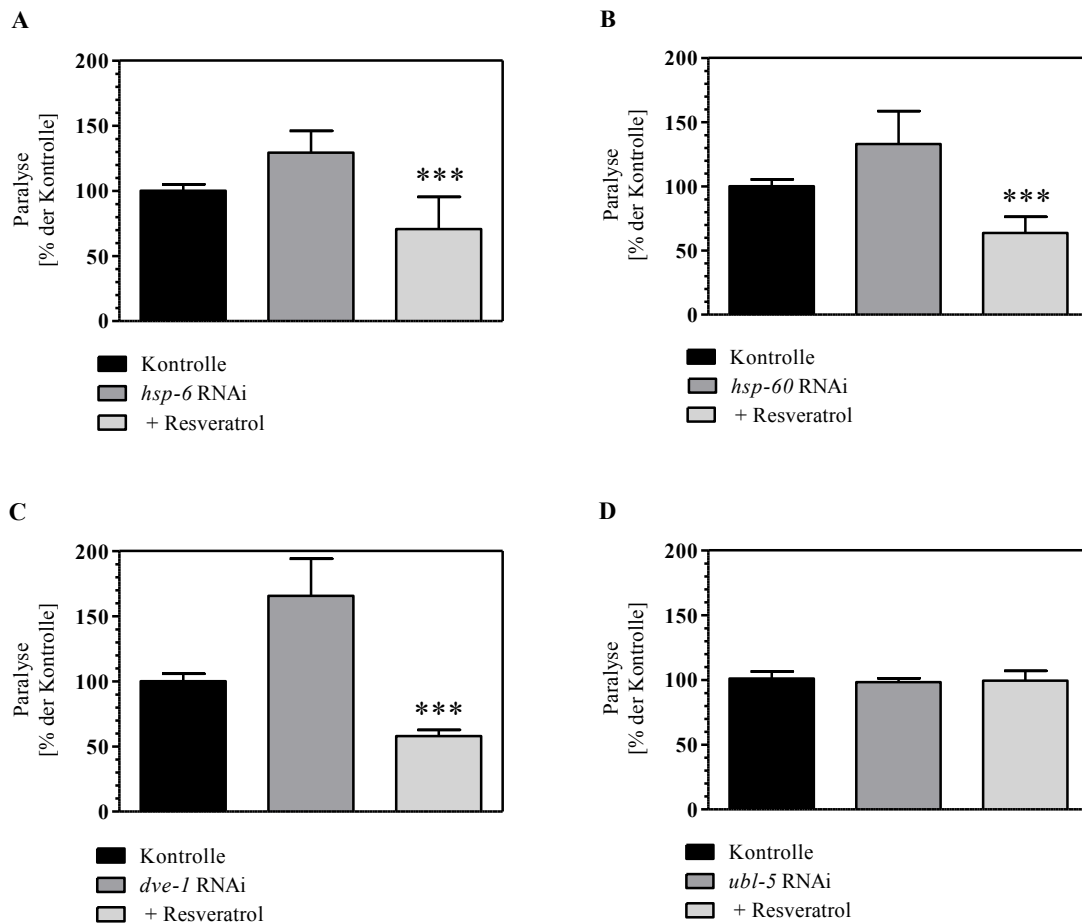


Abbildung 4-36 Paralyserate in UPR^{mt}-defizienten Nematoden und nach 48 h Inkubation mit Resveratrol

Paralyserate von CL2006 mit *hsp-6* (A), *hsp-60* (B), *dve-1* (C) bzw. *ubl-5* RNAi (D) und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Resveratrol sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); *** $p < 0,001$ vs. RNAi-Gruppe. Die Signifikanzen der RNAi-Gruppen sind der Abbildung 4-10 zu entnehmen.

Unter der verminderten Expression des UPR^{ER}-relevanten Transkriptionsfaktors XBP-1 konnte Resveratrol die Paralyserate nicht mehr senken ($125 \pm 22\%$, Abbildung 4-37). Mit *abu-1* bzw. *abu-11* RNAi führte eine Inkubation mit 100 μ M Resveratrol zu einer signifikanten Senkung der Paralyse ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$). Dabei sank die Paralyserate mit *abu-1* RNAi und Resveratrolinkubation um 44% gegenüber der RNAi-Behandlung auf $57 \pm 4\%$ und unter *abu-11* RNAi um 59% auf $41 \pm 5\%$. Dies zeigt, dass die UPR^{ER} über eine Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors XBP-1 Ziel des Resveratrols ist. Die *abu*-Gene, die als Antwort auf steigenden ER-Stress aktiviert werden, waren nicht durch Resveratrol beeinflussbar.

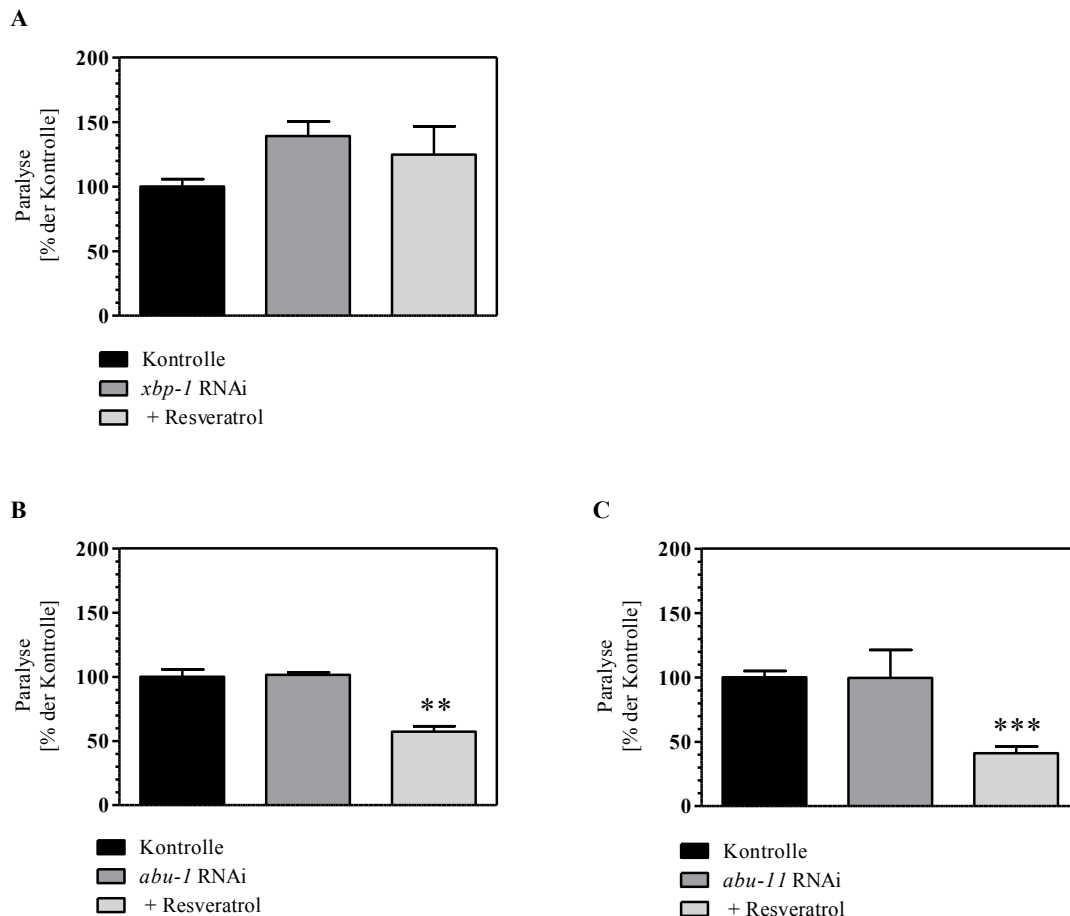


Abbildung 4-37 Paralyserate in UPR^{ER}-defizienten Nematoden und nach 48 h Inkubation mit Resveratrol

Paralyserate mit *xbp-1* (A), *abu-1* (B) bzw. *abu-11* RNAi (C) und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Resveratrol sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); ** $p < 0,01$ bzw. *** $p < 0,001$ vs. RNAi-Gruppe. Die Signifikanzen der RNAi-Gruppen sind der Abbildung 4-10 zu entnehmen

4.5.4.2 Einfluss von Resveratrol auf das Ubiquitin-Proteasom-System

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass ein effektiver proteasomaler Proteinabbau für die Verhinderung des Alzheimer-Phänotyps sowie die Vermittlung des Quercetineffektes in CL2006 essentiell ist (vgl. Kapitel 4.4.5.2). Im Folgenden wurde analog zu Quercetin die Bedeutung des UPS für die Vermittlung des Resveratroleffektes untersucht.

Eine 48 h Inkubation mit 100 μ M Resveratrol konnte den paralysesteigernden Effekt der RNAi des *C. elegans* Ubiquitin-Homologs *ubq-1* nicht wieder ausgleichen (Abbildung 4-38). Die Paralyserate blieb mit $177 \pm 11\%$ im Verhältnis zur Kontrolle auf einem ähnlich hohem Niveau wie die *ubq-1* RNAi-Gruppe ($184 \pm 12\%$). Mit *uba-1* RNAi und Resveratrolinkubation kam es zu einer signifikanten Reduktion der Paralyse ($p < 0,001$) um 43% gegenüber der RNAi-Behandlung auf $86 \pm 5\%$. Diese Ergebnisse zeigen, dass das UPS Zielstruktur des Resveratrols ist.

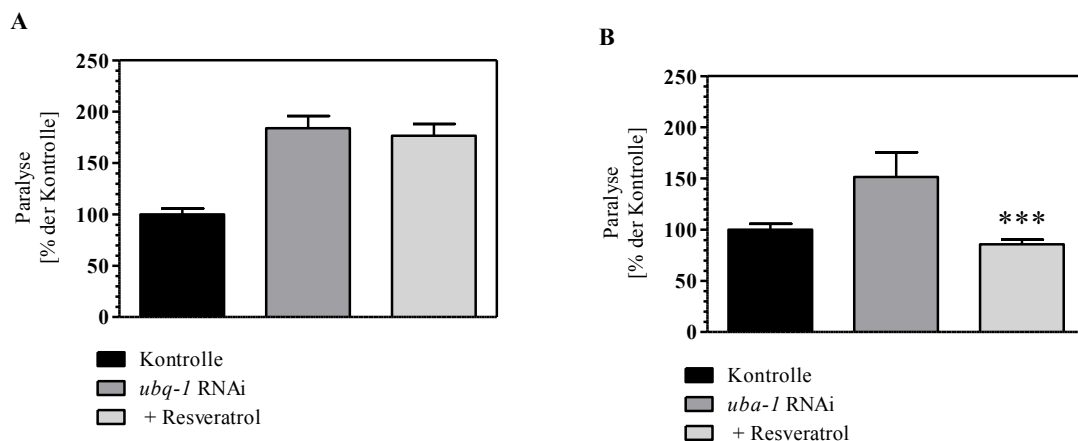


Abbildung 4-38 Paralyserate mit *ubq-1* bzw. *uba-1* RNAi und nach 48 h Inkubation mit Resveratrol
Paralyserate mit *ubq-1* (A) bzw. *uba-1* RNAi (B) und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Resveratrol sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); *** $p < 0,001$ vs. RNAi-Gruppe; Die Signifikanzen der *ubq-1* und *uba-1* RNAi sind der Abbildung 4-10 zu entnehmen.

Im Folgenden sollte geklärt werden, inwiefern Resveratrol die proteasomale Aktivität direkt moduliert. Wie schon zuvor für Quercetin (vgl. Kapitel 4.4.5.2) gezeigt, steigerte eine 48 h Inkubation jung-adulter Nematoden mit 100 μ M Resveratrol die proteasomale

Aktivität in *C. elegans* CL2006 signifikant um 65% ($165 \pm 29\%$, $p < 0,01$, Abbildung 4-39). Analog zu dem unter Quercetininkubation erreichten Ergebnis lässt dieses Resultat darauf schließen, dass Resveratrol das UPS direkt beeinflusst und somit auch die Degradation fehlerhafter Proteine vorantreibt.

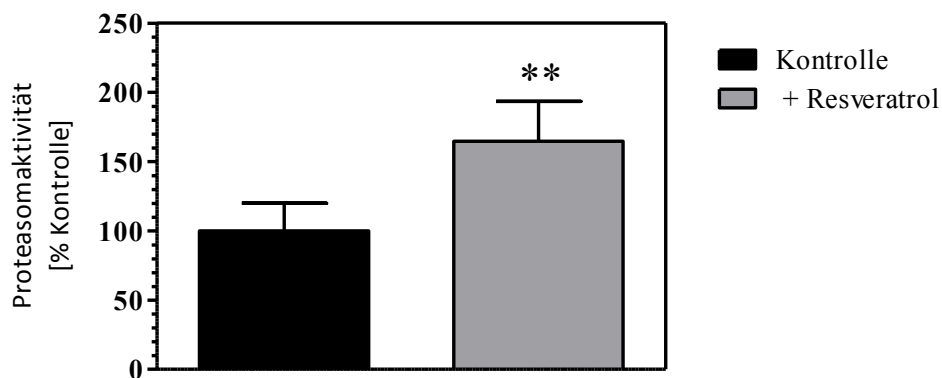


Abbildung 4-39 Proteasomaktivität nach 48 h Inkubation mit Resveratrol

Proteasomaktivität als % der Kontrolle nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Resveratrol; ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle.

4.5.4.3 Die Autophagie ist von zentraler Bedeutung für die Resveratrol-vermittelte Reduktion der Paralyse

Neben dem UPS spielt die Autophagie für den Abbau aggregierter Proteine eine zentrale Rolle. Im Folgenden wurde untersucht welcher Weg der Autophagie für den Resveratroleffekt von Bedeutung ist und welchen Einfluss Resveratrol auf die Lysosomenbildung hat.

Zunächst wurde die Bedeutung der Makroautophagie betrachtet. Nach einer 48 h Inkubation mit 100 μ M Resveratrol blieb die Paralyserate mit $142 \pm 3\%$ im Verhältnis zur Kontrolle unverändert gegenüber der *bec-1* RNAi-Gruppe (Abbildung 4-40). Diese Untersuchungen zeigten, dass Resveratrol, wie auch Quercetin, die Paralyse nur senken konnte, wenn eine aktive Makroautophagie mit einem aktiven BEC-1 vorhanden war.

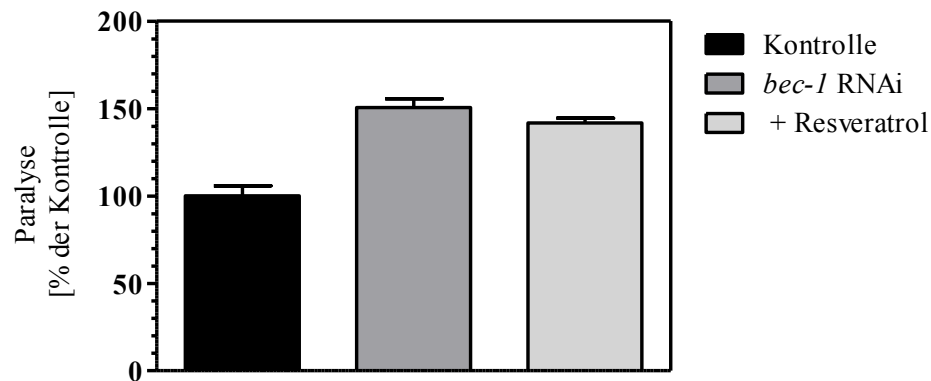


Abbildung 4-40 Paralyserate mit *bec-1* RNAi und nach 48 h Inkubation mit Resveratrol

Paralyserate von CL2006 mit *bec-1* RNAi und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Resveratrol sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C); Die Signifikanzen der *bec-1* RNAi sind der Abbildung 4-13 zu entnehmen.

LMP-2-defiziente Würmer zeigten keinen Rückgang der Paralyse durch Resveratrol ($92 \pm 23\%$, Abbildung 4-41), während Resveratrol mit *unc-46* RNAi zu einem signifikanten Rückgang ($p < 0,001$) der Paralyse im Vergleich zur *unc-46* RNAi-Gruppe um 55% auf $38 \pm 25\%$ führte. Hierbei zeigte sich, dass Resveratrol, anders als Quercetin, für seinen Effekt auf den Alzheimer-Phänotypen das CMA-assoziierte Gen *lmp-2* benötigt.

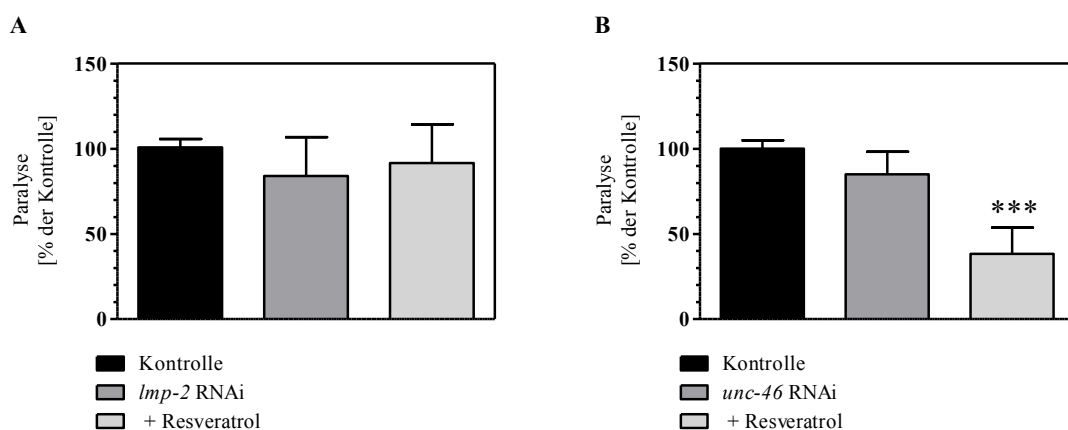


Abbildung 4-41 Paralyserate mit *lmp-2* bzw. *unc-46* RNAi und nach 48 h Inkubation mit Resveratrol

Paralyserate mit *lmp-2* (A) bzw. *unc-46* RNAi (B) und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Resveratrol sowie anschließendem Hitzeschock (1 h 35°C), *** $p < 0,001$ vs. RNAi-Gruppe.

Die Behandlung von CL2006 mit 100 μ M Resveratrol senkte die gebildete Menge an Lysosomen signifikant um 33% ($67 \pm 24\%$) gegenüber der Kontrolle ($p < 0,001$, Abbildung 4-42).

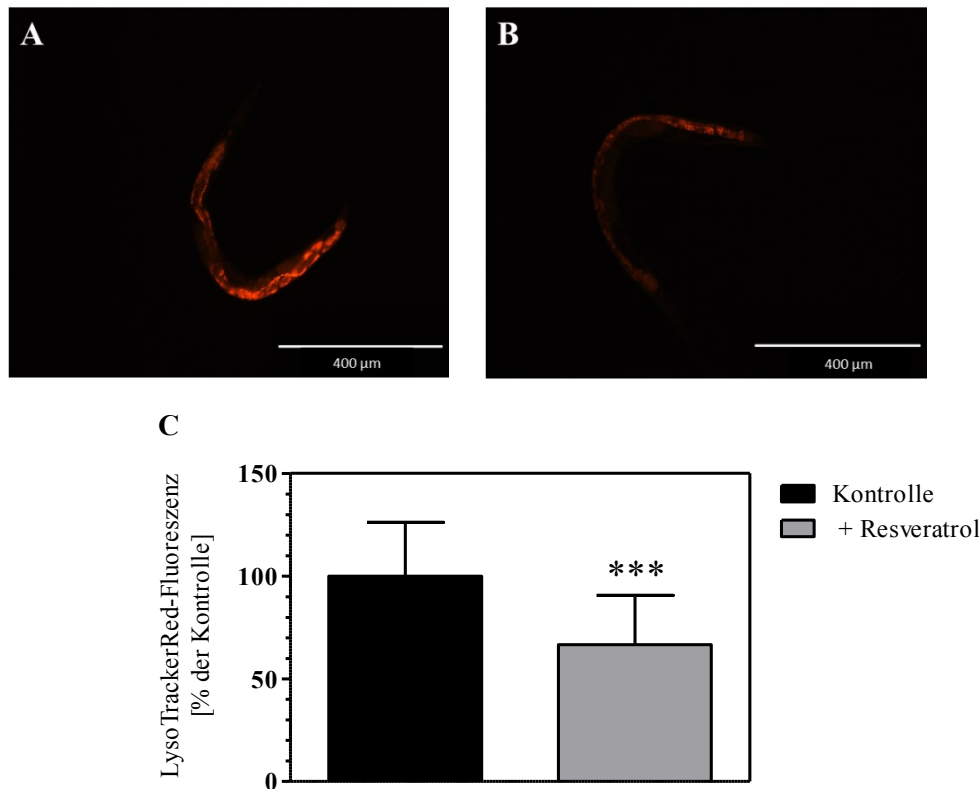


Abbildung 4-42 LysoTracker® Red Fluoreszenz in CL2006 nach 48 h Inkubation mit Resveratrol

Anfärbung mit LysoTracker® Red: Kontrolle (A) und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Resveratrol (B); LysoTracker® Red Fluoreszenz in % der Kontrolle nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Resveratrol (C); *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Für die genaue Aufklärung der Resveratrolwirkung auf die lysosomalen Prozesse wurde die Beeinflussung der Lysosomenmenge durch Resveratrol in Gegenwart von Chloroquin bestimmt. 10 μ M Chloroquin verhinderten die Reduktion der Lysosomenmenge durch Resveratrol (Abbildung 4-43). Sie blieb um 44% ($144 \pm 28\%$) erhöht im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,001$; vgl. Chloroquin um 50% erhöht). Dies deutet darauf hin, dass Resveratrol den Abbau von Proteinen in den Lysosomen beschleunigt.

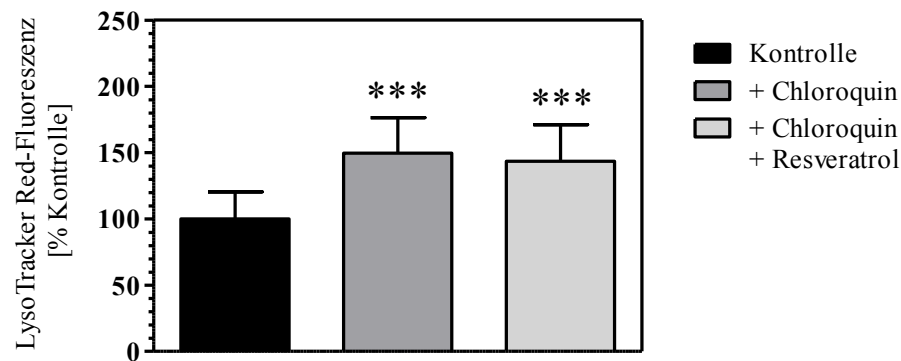


Abbildung 4-43 LysoTracker® Red Fluoreszenz nach 48 h Inkubation mit Chloroquin in Ab- und Anwesenheit von Resveratrol

LysoTracker® Red Fluoreszenz nach 48 h Inkubation mit 10 μ M Chloroquin in Ab- und Anwesenheit von 100 μ M Resveratrol; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Eine RNAi von *imp-2* verhinderte eine Senkung der Lysosomen durch die gleichzeitige Behandlung der Nematoden mit 100 μ M Resveratrol (Abbildung 4-44). Im Gegensatz dazu kam es mit *unc-46* RNAi und Resveratrolinkubation zu einem Rückgang ($p < 0,01$) der Lysosomenmenge verglichen mit der RNAi-Gruppe um 30% auf $64 \pm 18\%$. Demnach ist zu postulieren, dass *imp-2* einen funktionellen Rezeptor der CMA in *C. elegans* kodiert und dieser für den durch Resveratrol gesteigerten autophagosomalen Abbau von Proteinen und die Reduktion der Paralyse benötigt wird.

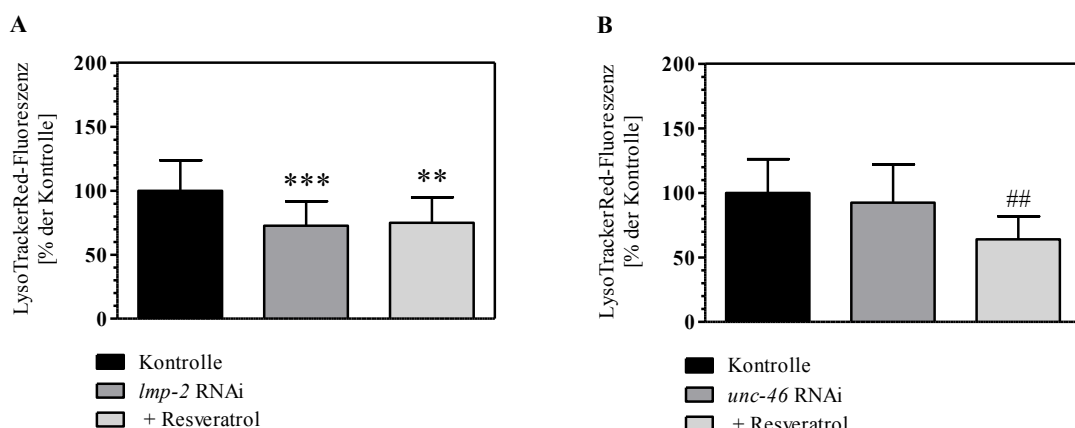


Abbildung 4-44 LysoTracker® Red Fluoreszenz mit *imp-2* bzw. *unc-46* RNAi und nach 48 h Inkubation mit Resveratrol

LysoTracker® Red Fluoreszenz mit *imp-2* (A) bzw. *unc-46* RNAi (B) und nach 48 h Inkubation mit 100 μ M Resveratrol; ** $p < 0,01$ bzw. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle (A), ## $p < 0,01$ vs. RNAi-Gruppe (B).

5 DISKUSSION

Die Alzheimer Erkrankung (AD) gehört zu den progressiven neurodegenerativen Erkrankungen und ist die häufigste Form der Altersdemenz. Bis heute ist keine Möglichkeit bekannt die Erkrankung aufzuhalten oder zu heilen. AD ist gekennzeichnet durch die Akkumulation von senilen Plaques im Gehirn. Diese setzen sich hauptsächlich aus β -Amyloid ($A\beta$) - Peptiden zusammen [37]. $A\beta$, welches aus 39-43 Aminosäuren (AS) besteht [37], entsteht durch die proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (*amyloid precursor protein*, APP). Dieses transmembrane Protein wird durch Sekretasen proteolytisch prozessiert. Erfolgt die Umsetzung durch die β - und γ -Sekretase entsteht unlösliches und toxisches $A\beta_{1-40}$ bzw. $A\beta_{1-42}$ [234]. Laut der „Amyloid-Hypothese“ spielt ihre Akkumulation zu Oligomeren die Schlüsselrolle in der Pathogenese der AD [35, 36]. Diese Proteinaggregate scheinen für verschiedene zelluläre Dysfunktionen verantwortlich zu sein. Dazu zählen erhöhter ROS-Stress, ein veränderter Ionenhaushalt sowie Dysfunktionen der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums (ER), welche die beobachtete Neurotoxizität des $A\beta$ zu bedingen scheinen [235]. Ob $A\beta$ intrazellulär oder, wie bisher angenommen, extrazellulär wirkt, wird derzeit stark diskutiert. Allerdings wird zunehmend anerkannt, dass intrazellulär akkumulierendes $A\beta$ cytotoxisch wirkt und für frühe Veränderungen im Rahmen der AD verantwortlich sein könnte. Extrazelluläres $A\beta$ hingegen scheint das Resultat von neuronalem Zelltod und Degeneration in einem späten Stadium der AD zu sein [236]. In der vorliegenden Arbeit wurde der transgene *C. elegans* Stamm CL2006, welcher humanes $A\beta_{1-42}$ in den Muskelzellen der Körperwand exprimiert [188], herangezogen, um den Einfluss verschiedener genetischer und nutrigenomischer Faktoren auf die $A\beta$ -induzierte Toxizität zu untersuchen. Im Fokus standen hier die Bedeutung AD-assoziiierter Gene des Steroid-Signalweges sowie eine nutritive Beeinflussbarkeit über eine niedrige Cholesterolversorgung. Ebenfalls galt es die genetische Bedeutung des Insulin-Signalweges zu klären. Des Weiteren wurde die Bedeutung molekularer Mechanismen der UPR^{mt} und UPR^{ER} , des proteasomalen Proteinabbaus sowie der Autophagie erörtert. In dem in dieser Arbeit verwendeten *C. elegans* Stamm führt das exprimierte humane $A\beta_{1-42}$ zu einer starken Proteotoxizität, die letztendlich zum Funktionsverlust der $A\beta$ -exprimierenden Zellen führt [188]. Unter diesem Aspekt scheint es wichtig anzumerken, dass die letztendlich gebildeten $A\beta$ -

Peptide A β ₃₋₄₂-Fragmente darstellen [189]. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass A β ₃₋₄₂ schneller Aggregate formt als A β ₁₋₄₂ und auch schneller fibrilläre Strukturen ausbildet, wodurch wiederum die A β ₁₋₄₂-Aggregation initiiert wird [189, 222]. Die A β ₃₋₄₂ Aggregate sind hoch toxisch, besonders wenn sie posttranslational am N-Terminus durch Glutaminylzyklasen pyroglutamyliert wurden [237 – 239]. Phänotypisch äußert sich die Toxizität durch eine zunehmende Paralyse der Nematoden. Der transgene *C. elegans* Stamm CL2006 wurde in der Vergangenheit häufig als *Screening*-Modell für die Suche nach Substanzen, welche die Proteotoxizität beeinflussen können, herangezogen [240]. Studien, die sich mit der Aufklärung der A β -Aggregation zugrunde liegenden Mechanismen beschäftigen, liegen bislang kaum vor.

5.1 Der Steroid-Signalweg beeinflusst über die Interaktion mit DAF-16 die Paralyse in CL2006

Zwischen Lipid- bzw. Cholesterolmetabolismus und der AD gibt es eine bekannte Verbindung. Polymorphismen des *ApoE*-Gens, welches für das Apolipoprotein E kodiert, sind genetische Risikofaktoren für die Entwicklung einer *late-onset* AD. ApoE ist für den Cholesteroltransport im Plasma, aber vor allem im Gehirn verantwortlich [70, 241]. Auch wenn der Zusammenhang zwischen ApoE-Polymorphismen und AD bekannt ist, ist der zugrunde liegende Mechanismus bislang ungeklärt. Einige Hinweise deuten darauf hin, dass Veränderungen im Plasmacholesterolspiegel Einfluss auf die AD-Entstehung haben [242]. So wird das Apo ϵ 4-Allel, welches mit dem erhöhten Risiko der AD in Verbindung gebracht wird, mit erhöhten Plasmacholesterolspiegeln assoziiert [243]. Patienten mit Hypercholesterinämien wiesen *post mortem* eine verstärkte A β -Akkumulation im Gehirn auf, unabhängig davon, dass es sich hierbei nicht um AD-Patienten handelte. Da in der genannten Studie darauf geachtet wurde, dass kein Apo ϵ 4-Polymorphismus vorlag [244], kann davon ausgegangen werden, dass die erhöhten Cholesterolspiegel alleine ursächlich für die A β -Aggregation waren und der Apo ϵ 4-Polymorphismus über die Erhöhung des Plasmacholesterols Einfluss auf die AD-Entstehung nimmt. Auch im umgekehrten Fall ist der Einfluss des Cholesterols auf die Entstehung der AD deutlich. So konnte in einer Zellkulturstudie mit APP-transfizierten Neuronen des Hippokampus gezeigt werden, dass ein zelluläres Cholesteroldefizit zu einer verminderten A β -Produktion und -Aggregation führte [245,

246]. Für die vorliegende Arbeit war daher von großem Interesse, ob AD-assoziierte Gene, die den Cholesteroltransport, die Cholesterolverorgung der Zelle und den Cholesterolmetabolismus beeinflussen, ebenfalls Einfluss auf die A β -Toxizität in dem verwendeten *C. elegans* Alzheimer-Modell haben. In *C. elegans* wird Cholesterol über die ApoB100 homologen Vitellogenine zu den Zielzellen transportiert [193]. Dort werden die cholesterolbeladenen Vitellogenine über den membranständigen Rezeptor RME-2 in die Zelle aufgenommen [195], wo Cholesterol wieder freigesetzt wird und den zellulären Steroid-Signalweg aktiviert. DAF-9 vermittelt die Oxidation von Cholesterol zu dafachronischen Säuren, die als Liganden des nukleären Hormonrezeptors DAF-12 agieren [196, 197]. Wird, stellvertretend für die Vitellogenine, *vit-6* mittels RNAi in seiner Expression vermindert und somit weniger Cholesterol zu den Zielzellen transportiert und aufgenommen [247], sinkt die Paralyserate in CL2006 um 46%. Auch wenn weitere Komponenten des Steroid-Signalweges, *daf-9* und *daf-12*, mittels RNAi inaktiviert wurden, war ein deutlicher Rückgang der Paralyserate zu erkennen. Eine Hemmung des cholesterolvermittelten Steroid-Signalweges verhindert demnach die Entstehung des Alzheimer-Phänotyps in CL2006. Um zu überprüfen, ob dies von der Cholesterolverorgung der Zelle abhängig war, wurde in einem weiteren Ansatz *vit-6* in seiner Expression gemindert und mit den RNAis von *daf-9* bzw. *daf-12* kombiniert. Es zeigte sich, dass es zu keinem additiven Rückgang der Paralyse kam. Die Paralyserate blieb in Kombination von *vit-6* RNAi mit *daf-9* bzw. *daf-12* RNAi auf dem Niveau der *vit-6* RNAi konstant. Demnach scheint die Cholesterolverorgung der Zelle letztendlich der limitierende Faktor für die A β -Toxizität und Paralyse in CL2006 zu sein. Um die nutritive Beeinflussbarkeit der A β -Toxizität zu untersuchen, wurde die Wirkung eines Cholesteroldefizits in der Nahrung ermittelt. *C. elegans* ist Cholesterol-auxotroph, weshalb dem Medium normalerweise 5 μ g/ml Cholesterol zugesetzt wurden. Um ein Cholesteroldefizit zu erreichen wurden die Nematoden in 2,5 μ g/ml cholesterolhaltigem NGM-Medium kultiviert. Es zeigte sich, dass die Paralyserate durch den Cholesterolmangel um 27% reduziert wurde. Bei gleichzeitigem Fehlen der Schlüsselproteine des Steroid-Signalweges, VIT-6, DAF-9 sowie DAF-12, und Cholesterolmangel war kein additiver Effekt auf die Paralyse ersichtlich. Dies zeigt, dass der Rückgang der Paralyserate auf ein Cholesteroldefizit in der Nahrung und somit tatsächlich auf eine verminderte Cholesterolverorgung der Zelle zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtung, dass geringe

Cholesterolkonzentrationen im Plasma und in Zellen die A β -Toxizität und die Inzidenz der AD senken [245, 246, 248]. Epidemiologischen Studien zeigten, dass Plasmahypercholesterinämien die A β -Akkumulation im Gehirn steigern [244]. Darüber hinaus konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass eine hohe Cholesterolaufnahme mit der Nahrung zur Verstärkung von mit AD-assoziierten pathologischen Prozessen führte, darunter auch die Akkumulation von A β [249]. Ebenso konnte in einer Zellkulturstudie mit Neuronen des Hippokampus gezeigt werden, dass ein zelluläres Cholesteroldefizit mit einer verminderten A β -Produktion und Aggregation einhergeht [245, 246]. Dem könnte die Beeinflussung der A β -Produktion aus APP und der daran beteiligten Enzyme durch Cholesterol zugrunde liegen [250]. So konnte in humanen Zellkulturstudien gezeigt werden, dass durch geringe Cholesterolkonzentrationen die α -Sekretase, die für den nicht-amyloidogenen Abbauweg verantwortlich ist, stimuliert wird [251, 252]. Gleichzeitig scheint die Aktivität der β -Sekretase, die den amyloidogenen Abbauweg des APP einleitet, durch niedrige Cholesterolkonzentrationen gemindert zu werden [245, 253, 254]. Umgekehrt konnte an Zellkulturen gezeigt werden, dass hohe Cholesterolkonzentrationen die Aktivität der β -Sekretase steigern [255] und die Freisetzung löslicher APP-Fragmente dadurch inhibieren [256, 257]. Auch die γ -Sekretase, die den letzten Schritt in beiden Abbauwegen katalysiert, scheint durch niedrige Cholesterolkonzentrationen in ihrer Aktivität gehemmt zu werden. Dies geschieht unabhängig von der Beeinflussung der Aktivität der β -Sekretase [253, 258]. Da *C. elegans* für die β -Sekretase keine Homologe besitzt, kann der durch die Cholesterolmenge vermittelte Effekt nicht über diesen Mechanismus wirken. Zwar wäre eine Aktivierung der α -Sekretase auch in *C. elegans* denkbar, allerdings hätte dies in letzter Konsequenz keinen Einfluss auf die A β -Produktion, da diese aufgrund des Transgens unabhängig synthetisiert wird [188]. Ein anderer Mechanismus muss durch die verminderte zelluläre Cholesterolkonzentration aktiviert werden.

Parallel zu dem Steroid-Signalweg verläuft der Insulin/IGF-Signalweg in *C. elegans*. Es ist eine Interaktion zwischen beiden Signalwegen beschrieben [197]. Der Insulin-Signalweg wird durch die Bindung Insulin-ähnlicher Liganden an den DAF-2-Rezeptor aktiviert. Das Signal mündet letztendlich in der Phosphorylierung des stromabwärts liegenden FOXO Transkriptionsfaktor DAF-16. Dephosphoryliert transloziert DAF-16 in den Zellkern und transkribiert Gene für Stressresistenz und Langlebigkeit [197].

Kalorienrestriktion hemmt beispielsweise den Insulin-Signalweg und führt zu einer Dephosphorylierung von DAF-16, welches im Anschluss daran in den Zellkern wandert und dort transkriptionell aktiv ist [203, 204]. Studien mit Mäusen zeigen, dass Kalorienrestriktion zu einer verlangsamten Entstehung der AD beitragen kann [259]. Die RNAi von *daf-16* führte in CL2006 zu einer Steigerung der Paralyserate um 40%. Dies zeigt, dass aktives, dephosphoryliertes DAF-16 und somit ein inaktiver Insulin-Signalweg Voraussetzung für eine Verminderung der Paralyse in CL2006 sind. Um zu klären, ob dies tatsächlich von der transkriptionellen Aktivität von DAF-16 abhängig ist, sollten beschriebene Co-Faktoren ebenfalls mittels RNAi in ihrer Expression unterdrückt werden und die Bedeutung für die Paralyse ermittelt werden. Als erstes wurde die Bedeutung der beiden in *C. elegans* beschriebenen 14-3-3 Proteine PAR-5 und FTT-2 [203, 260] untersucht. 14-3-3 Proteine gehören zu einer Familie hoch konservierter cytoplasmatischer Proteine, die meist als Hetero- oder Homodimere vorkommen [261], phosphorylierte Substratproteine binden [262] und eine Konformationsänderung bewirken [263]. In *C. elegans* werden 14-3-3 Proteine sowohl im Zusammenhang mit lebensverlängernden Effekten als auch im Zusammenhang mit der Interaktion mit DAF-16 beschrieben [204, 264]. So können sie DAF-16 binden und dessen transkriptionelle Aktivität fördern, was wiederum Einfluss auf Stressresistenz und Lebensspanne hat (265). Im *C. elegans* Alzheimer-Modell führte die RNAi der beiden 14-3-3 Gene zu einem deutlichen Anstieg der Paralyse, was darauf hindeutet, dass transkriptionell aktives DAF-16 von Bedeutung für die Paralysereduktion ist. Zusätzlich wurde SIR-2.1, welches ebenfalls als Co-Faktor von DAF-16 beschrieben ist und auch mit den 14-3-3 Proteinen interagieren soll, betrachtet. Sirtuine sind hoch konserviert, kommen in den verschiedensten Organismen vor und werden primär durch Kalorienrestriktion aktiviert [266, 267]. Sie vermitteln Stressresistenz [268] und steigern die Überlebensfähigkeit eines Organismus [269], daher lässt sich das Ergebnis der Paralysemessung mit *sir-2.1* RNAi nicht ganz erklären. Entgegen der Erwartungen führte eine *sir-2.1* RNAi in *C. elegans* zu einem signifikanten Rückgang der Paralyserate. Eine mögliche Erklärung bietet eine beschriebene Interaktion von SIR-2.1 mit ABU-Proteinen, die im Rahmen der Proteostase im ER eine Rolle spielen. Demnach hemmt SIR-2.1 die ABU-Proteine [207]. Es wäre denkbar, dass eine *sir-2.1* RNAi diese Hemmung aufhebt und die ABUs somit aktiviert, was wiederum andere protektive zelluläre Mechanismen der Proteostase induzieren könnte. Da die AD eine auf

fehlerhaften Proteinen basierende Erkrankung ist [2], ist anzunehmen, dass eine aktive Proteostase protektiv wirkt. Dennoch zeigten diese Untersuchungen, dass SIR-2.1 als Co-Aktivator von DAF-16 im Rahmen der Verhinderung der Paralyse keine Rolle spielt. Da das Fehlen der Co-Aktivatoren FTT-2 und PAR-5 jedoch gleichgerichtete Effekte wie die RNAi von *daf-16* aufweist, ist davon auszugehen, dass die Paralysesteigerung unter *daf-16* RNAi dennoch auf das Ausbleiben dessen transkriptioneller Aktivität zurückzuführen ist.

Zusätzlich interagiert DAF-16 auch mit dem stromabwärts des Steroid-Signalweges liegenden Transkriptionsfaktor DAF-12 [197]. Um die Bedeutung der Interaktion für die Paralyse in CL2006 zu betrachten, wurde eine Doppel-RNAi von *daf-16* und *daf-12* durchgeführt. In Kombination der beiden RNAis blieb die Paralyse deutlich erhöht. Der paralyse senkende Effekt der *daf-12* RNAi ist demnach abhängig von DAF-16. Die paralyse senkende Wirkung des vermindert ablaufenden Steroid-Signalweges in CL2006 scheint letztendlich über eine Aktivierung des FOXO Transkriptionsfaktors DAF-16 durch unbeladenes DAF-12 vermittelt zu werden. Dies könnte die Transkription stressresistenzfördernder Gene bewirken und könnte so die A β -Toxizität in CL2006 vermindern. Dennoch erklärt dies nicht die molekularen Mechanismen, die der A β -Toxizität zugrunde liegen. Diese galt es im Folgenden genauer zu betrachten und aufzuklären.

5.2 Die Proteostase bestimmt die β -Amyloid-induzierte Toxizität in CL2006

Das im Rahmen der AD gebildete A β akkumuliert in den Zellen hauptsächlich in Lysosomen [270], Mitochondrien [271] und dem ER [272]. Insbesondere der im ER durch A β ausgelöste Stress wird als eine der entscheidenden pathologischen Veränderungen im Rahmen der AD vermutet [272]. Neben den funktionellen Einschränkungen der Zellorganelle, scheinen Protein-Protein-Interaktionen ebenfalls einen Beitrag zur verminderten Funktionsfähigkeit der Zellen zu leisten. Dies wird durch humane, auf Proteinarrays basierenden Studien gestützt, die 324 zelluläre Proteine identifizierten, welche auf unterschiedlichste Weise mit A β ₁₋₄₂ interagieren [273]. Basierend auf der Tatsache, dass die Funktionsfähigkeit von Proteinen und damit

auch die gesamte Funktionalität der Zelle, als Grundlage für die Überlebensfähigkeit und Gesundheit eines Organismus, auf deren dreidimensionaler Struktur beruht, kann vermutet werden, dass die zelluläre Proteostase, die für die Reparatur oder den Abbau fehlerhafter Proteine verantwortlich ist, auch großen Einfluss auf die Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, wie z. B. AD, besitzt [274].

In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass der im Cytosol lokalisierte Hitzeschockfaktor 1 (HSF-1) den durch A β verursachten proteotoxischen Stress in den transgenen CL2006 Würmern verringert [275]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Oligomere, die zur Aggregation neigen, auch physiologisch im Alterungsprozess [188] sowie nach der Applikation eines Hitzeschocks in A β -exprimierenden Tieren akkumulieren [276]. Das lässt vermuten, dass die erhöhte Temperatur letztendlich Einfluss auf die Effektivität der Proteostase hat, diese schwächt und so eine entscheidende Rolle für die Lebensspanne, aber auch die Gesundheit des Organismus spielt. In der vorliegenden Arbeit wurde dies als Grundlage für die experimentelle Durchführung der Paralysemessungen herangezogen. Der induzierte Hitzeschock für 1 h bei 35°C führte zu einem Auftreten der Paralyse bei ca. 50% der Nematodenpopulation, wohingegen der Wildtyp N2 nicht paralytierte (nicht gezeigte Daten). Dieses Erscheinungsbild war assoziiert mit einer deutlichen Zunahme der aggregierten Proteine in Lösung. Der A β -exprimierende *C. elegans* Stamm wies eine deutlich höhere Menge aggregierter Proteine auf als der Wildtyp N2. Da die einzige genetische Varianz zwischen CL2006 und dem Wildtyp das humane A β ist, ist davon auszugehen, dass insbesondere A β in CL2006 aggregiert und dieses für die Paralyse der Nematoden verantwortlich ist. Studien zeigten, dass die Aggregate aus A β sich in ihrer Größe deutlich unterscheiden können [277]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Aggregate mit einem großen Molekulargewicht vermehrt auftraten, wenn die Paralyse in A β -exprimierenden Nematoden durch eine Inaktivierung des Insulin/IGF-Signalweges gesenkt wurde [275]. Dies lässt darauf schließen, dass unterschiedliche Proteinaggregate auch unterschiedliche degenerative Mechanismen beeinflussen und induzieren [277] und, dass das in der vorliegenden Arbeit verwendete ProteoStat® Protein Aggregation Assay offensichtlich eine toxische Form der A β -Aggregate detektiert. In *C. elegans* sind verschiedene Mechanismen der Proteostase bekannt, die auch für Vertebraten beschrieben sind. Diese führen letztendlich zur Detoxifikation von Peptiden oder Peptidaggregaten. In den Mitochondrien sind die Chaperone HSP-6 und

HSP-60 maßgeblich für eine korrekte Faltung und somit für die Stabilisierung von Proteinen verantwortlich [210, 211]. Auch im Rahmen der A β -Detoxifikation in CL2006 scheint dies essentiell, da die reduzierte Expression von *hsp-6* und *hsp-60* durch RNAi die Paralyserate deutlich erhöhte. Die Bildung von A β -Oligomeren und die anschließende Aggregation sind von der Konformation des Proteins abhängig [278], weshalb es möglich erscheint, dass die Chaperone durch Neufaltung der Peptide zur Entgiftung bzw. Verhinderung der Bildung von toxischen Oligomeren beitragen. Tatsächlich waren die humanen Chaperonhomologe HSP70 und HSP90 in der Lage *in vitro* einzelne A β -Peptide zu binden und so die Oligomerisierung zu verhindern [279]. Für diese Arbeit war darüber hinausgehend von großem Interesse, ob weitere Gene der Proteostase die A β -induzierte Toxizität und damit die Paralyse beeinflussen. Deshalb wurde in einem weiteren Schritt der für die UPR^{mt} zentrale Transkriptionsfaktor DVE-1, welcher die durch mitochondrialen Stress induzierte Aktivität und Expression der Chaperone reguliert [214, 215], mittels RNAi in seiner Expression vermindert. Dies führte zu einem deutlichen Anstieg der Paralyserate gegenüber der Kontrolle und verdeutlicht die wichtige Rolle der UPR^{mt} für die zelluläre Proteostase und die Prävention des Alzheimer-Phänotyps der Nematoden. Nachdem in einer anderen Arbeit gezeigt werden konnte, dass *dve-1* RNAi die *hsp-6* und *hsp-60* Expression vermindert aber nicht vollständig unterdrückt [215], ist davon auszugehen, dass weitere am Proteostaseprozess beteiligte Proteine die Expression der Chaperone regulieren. Auch müssen weitere protektive Faktoren durch DVE-1 aktiviert werden, da der Anstieg der Paralyse mit *dve-1* RNAi stärker war als mit *hsp-6* und *hsp-60* RNAi. Dem Ubiquitin-ähnlichen Protein 5 (UBL-5) wird ebenfalls eine wichtige Rolle im Rahmen der UPR^{mt} zugesprochen. Es gibt Hinweise, dass es gemeinsam mit DVE-1 einen nukleären Komplex bildet, welcher die Bindung des DVE-1 an die Promotorregion der UPR^{mt}-relevanten Zielgene, z. B. *hsp-6* und *hsp-60*, fördert [215]. Interessanterweise beeinflusste die RNAi von *ubl-5* die Paralyse in CL2006 nicht. Dies deutet darauf hin, dass DVE-1 letztendlich unabhängig von UBL-5 die Proteostase beeinflusst. Entsprechend kann postuliert werden, dass es in der Zelle unter A β -induziertem Stress zu einer DVE-1 vermittelten Expression der *hsp-6* und *hsp-60* Chaperone kommt und diese für die Verhinderung der A β -induzierten Paralyse essentiell sind. Ähnlich wie die UPR^{mt} gibt es auch im ER eine spezifische, durch akkumulierende Proteine induzierten Stress aktivierte, zelluläre Antwort, die UPR^{ER}. Untersuchungen an Menschen zeigten,

dass Mutationen im PS1-Gen, die mit der Entstehung der FAD assoziiert sind, die UPR^{ER} schwächen. Dies beeinflusst die ER-Proteostase und trägt letztendlich zur Entstehung von ER-Stress bei [280]. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der transgenen A β -exprimierenden Nematoden in einem nächsten Schritt die Rolle der UPR^{ER} für die Reduktion der A β -Toxizität untersucht. Die UPR^{ER} wird in *C. elegans* hauptsächlich über den bZip Transkriptionsfaktor XBP-1 reguliert. XBP-1 wird durch Spleißen der mRNA durch die transmembrane Proteinkinase IRE-1 aktiviert [281]. Darüber hinaus wurden in *C. elegans* Proteine der ABU-Familie identifiziert, die zur Kompensation des verstärkten ER-Stresses aktiviert werden, wenn die UPR^{ER} blockiert ist [217]. Es bestätigte sich die zentrale Rolle des XBP-1 für die Effektivität der UPR^{ER} und somit für die Detoxifikation des A β . Die RNAi von *xbp-1* führte in CL2006 zu einem Anstieg der Paralyserate, wohingegen die RNAi der für die ABUs kodierenden Gene, *abu-1* und *abu-11*, keinen Einfluss auf die Paralyse hatte. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass die RNAi der *abu*-Gene ER-Stress steigert [217], scheint dieser durch aktives XBP-1 kompensierbar zu sein. XBP-1 hingegen, welches u. a. die Transkription des ER-spezifischen Chaperons *hsp-4* in *C. elegans* reguliert [282], ist essentiell für die Verhinderung der Paralyse und kann demnach nicht durch ABU-1 und ABU-11 kompensiert werden. Ähnlich wie in den Mitochondrien ist die UPR auch im ER unabdingbar an der Limitation der A β -Toxizität beteiligt.

Wird davon ausgegangen, dass die funktionellen Schäden der Zellen tatsächlich durch eine Akkumulation toxischer A β -Fragmente entstehen, wäre denkbar, dass neben der Verhinderung der Entstehung auch die effektive Beseitigung bereits entstandener Proteinaggregate einen möglichen Mechanismus darstellt um die Toxizität zu reduzieren. Wird der durch Proteine ausgelöste Stress in den Organellen zu groß oder können einige Proteine die UPR^{ER} nicht passieren, werden sie vom ERAD erkannt und aus dem ER in das Cytosol transportiert [124]. Dort existieren zwei Möglichkeiten anfallende Proteinaggregate zu beseitigen. Diese sind zum einen das UPS, als Möglichkeit ubiquitinierte Proteine abzubauen [283], zum anderen die Autophagie, die für den Abbau ganzer Zellorganelle und langlebiger Proteine verantwortlich ist [144]. Das UPS spielt für den Abbau von pathogenen, abnormalen und fehlgefalteten Proteinen eine besonders wichtige Rolle. So wurden bereits einige auf Proteinaggregation beruhende Erkrankungen, wie z. B. die Parkinson Erkrankung und AD, mit veränderten proteasomalen Aktivitäten in Verbindung gebracht [284]. In der

Hirnsubstanz von AD-Patienten konnte eine Abnahme an E1- und E2-Enzymen, die für die Ubiquitinierung von abzubauenen Peptiden benötigt werden, gezeigt werden. Ebenso war die Trypsin-ähnliche katalytische Aktivität des Proteasoms hier vermindert [140]. Unklar ist jedoch, ob dies Ursache oder Folge der Ablagerung der senilen Plaques ist. In *C. elegans* sind eine E1-Ligase, das *uba-1* [224], und zwei Ubiquitinhomologe, *ubq-1* und *ubq-2* [218], beschrieben. Da die Ähnlichkeit zwischen beiden Ubiquitinhomologen so groß ist, dass die RNAi von dem einen wahrscheinlich auch zur verminderten Expression des anderen führt [223], wurde UBQ-1 stellvertretend für Ubiquitin in dieser Arbeit betrachtet. Fehlten UBQ-1 und UBA-1 aufgrund von RNAi, so kam es zu einer deutlichen Steigerung der Paralyse in CL2006. Wie zu erwarten, war der Effekt mit *ubq-1* RNAi mit 84% mehr paralysierten Nematoden stärker als mit *uba-1* RNAi mit einer gesteigerten Paralyserate um 51%. Die RNAi sowohl von *ubq-1* als auch von *uba-1* führten im *C. elegans* Alzheimer-Modell zu einem deutlichen Rückgang der Chymotrypsin-ähnlichen proteasomalen Aktivität. Dies war mit einer starken Steigerung der aggregierten Proteine in Lösung assoziiert. Der Effekt war jeweils unter *ubq-1* RNAi mit einer 2,7-fachen Steigerung der Proteinaggregation deutlicher, als unter *uba-1* RNAi. Die betrachteten Parameter machen deutlich, dass ein effektives proteasomales System einen Einfluss auf die A β -induzierten Schäden nimmt, indem es die toxischen Proteinaggregate abbaut. Da mitochondriale Dysfunktionen, die durch die A β -Akkumulation im Rahmen der AD auftreten, die Proteasomaktivität negativ beeinflussen können [285], ergibt sich ein Kreislauf, der die Proteotoxizität und damit den Verlauf der Erkrankung verstärkt.

Die Autophagie stellt neben dem UPS den zweiten Hauptabbauweg aggregierter oder schädlicher Proteine dar. Die Autophagie kann über verschiedene Wege ablaufen, die alle letztendlich mit der Aufnahme der abzubauenen Proteine in Lysosomen enden [144]. Lange galt die Autophagie lediglich als ein Prozess der Zellhomöostase und als Möglichkeit der Energiebeschaffung in Hungersituationen [286]. Neuere Studien jedoch weisen auf Verbindungen zwischen UPS und zahlreichen Erkrankungen hin, darunter Krebs und neurodegenerative Erkrankungen [287]. So deutete eine Studie an einem Alzheimer-Mausmodell darauf hin, dass A β zu einer Aktivierung der Autophagie führt [288]. Darüber hinaus zeigten weitere Tiermodellstudien, dass auch die Beseitigung autophagischer Vakuolen in AD-Gehirnen beeinträchtigt ist [289]. Um die Bedeutung der Autophagie für die Paralyse des *C. elegans* Alzheimer-Modells zu evaluieren,

wurden die zentralen Gene mittels RNAi vermindert exprimiert. Dazu wurde *bec-1*, das zentrale Gen der Makroautophagie, in den Fokus gestellt. BEC-1 ist für die Bildung der Autophagosomen, welche die abzubauenen Proteine zu den Lysosomen transportieren, verantwortlich [290]. Wurde *bec-1* durch RNAi vermindert exprimiert, stieg die Paralyserate in *C. elegans* bei gleichzeitig sinkender Menge gebildeter Lysosomen, als Zeichen für einen blockierten autophagosomalen Abbauweg, an. Studien zeigten, dass zu Beginn des pathologischen AD-Prozesses eine Akkumulation von Autophagosomen zu verzeichnen ist, wobei nicht klar ist, ob es sich dabei um ein Resultat verstärkter autophagischer Aktivitäten oder einer verminderten Verschmelzung von Autophagosomen mit Lysosomen handelt [291]. Tatsächlich konnten bereits Jäger *et al.* zeigen, dass die Makroautophagie auch am Abbau von APP und A β beteiligt ist und dass bei AD-Patienten die Expression von Beclin-1 vermindert ist. Dies ging mit einem Anstieg der APP- und A β -Spiegel im Gehirn einher, was wiederum die Autophagie hemmte [292]. Diese Beobachtungen können dahingehend interpretiert werden, dass in der frühen Phase der AD die verstärkte lysosomale Aktivität ein Versuch ist, das toxische A β zu kompensieren, wohingegen die autophagosomale Aktivität mit Voranschreiten der Erkrankung als Folge dessen abnimmt [288]. Ein weiterer für Vertebraten gezeigter Autophagieweg ist die CMA, bei der Proteine aus dem Cytosol direkt in Lysosomen aufgenommen werden. In *C. elegans* ist dieser Weg nicht funktionell beschrieben, jedoch sind homologe Gene des für die Aufnahme der Proteine in die Lysosomen verantwortlichen Rezeptors identifiziert. Das LAMP2-Homolog LMP-2 und das ebenfalls als Membranprotein beschriebene UNC-46 [230] zeigten keinen Einfluss auf die Entstehung des Alzheimer-Phänotyps, da ihre RNAi die Paralyserate nicht beeinflusste. Dies kann darauf zurück zu führen sein, dass sie lediglich strukturelle Homologien zeigen oder dass ihre Aktivität durch die anderen beschriebenen LAMP-Homologe kompensiert wird [230].

Aus den dargestellten Ergebnissen zeigt sich die Notwendigkeit einer funktionierenden Proteostase, bestehend aus der Proteinfaltung durch Chaperone, sowie der UPR^{mt} und UPR^{ER}, als auch letztendlich des Abbaus der Proteine über das Proteasom oder die Autophagie. Diese Mechanismen sind für die Reduktion der A β -induzierten Toxizität im *C. elegans* Alzheimer-Modell essentiell. Insbesondere die Chaperone HSP-6 und HSP-60 sowie die Transkriptionsfaktoren der UPR^{ER} und UPR^{mt} sind von Bedeutung. Für den effektiven Abbau aggregierter Proteine sind die UPS-assoziierten Proteine

UBQ-1 und UBA-1 sowie das für den autophagosomalen Abbau essentielle BEC-1 notwendig. Letztendlich scheint es für die Verhinderung der A β -Toxizität notwendig, dass Proteine während der Faltung optimal stabilisiert, bei Bedarf neu gefaltet oder dass aggregierte toxische Proteine möglichst effektiv wieder beseitigt werden.

5.3 Quercetin und Resveratrol senken die β -Amyloid-induzierte Toxizität über die Aktivierung der zellulären Proteindegradation in CL2006

AD, als eine Erkrankung deren höchster Risikofaktor das Alter ist, stellt in der immer älter werdenden Gesellschaft ein kontinuierlich wachsendes Problem dar [12]. Bis heute ist keine Möglichkeit der Heilung oder Verzögerung des Krankheitsverlaufes bekannt. Allerdings verdichten sich die Hinweise darauf, dass bestimmte Mikronährstoffe und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe den Ausbruch der Erkrankung verzögern oder verhindern könnten. Polyphenole sind in der menschlichen Ernährung weit verbreitet und sowohl experimentelle als auch epidemiologische Studien mit diesen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen deuten darauf hin, dass sie protektive Effekte auf die AD-Entstehung haben [167, 293, 294]. Zu den am weitesten verbreiteten Polyphenolen in Nahrungspflanzen gehören Quercetin und Resveratrol. Quercetin ist primär in Zwiebeln und Äpfeln zu finden [295], während Resveratrol hauptsächlich in der roten Traube und somit im Rotwein vorkommt [164].

Welche Einflüsse die Polyphenole Quercetin und Resveratrol im Rahmen der A β -Toxizität im *C. elegans* Stamm CL2006 besitzen, sollte in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden. Obwohl Quercetin und Resveratrol beide zur Klasse der Polyphenole gehören, weisen sie dennoch strukturelle Unterschiede auf und sind somit auch in der Lage unterschiedliche Mechanismen zu aktivieren [296]. Es zeigte sich, dass Quercetin konzentrationsabhängig Einfluss auf die Paralyse nahm und diese in einer Konzentration von 100 μ M um ca. 58% senkte. 1 μ M zeigte keinen Einfluss, wohingegen 10 μ M die Paralyserate zwar senkte, der Effekt mit 25% jedoch geringer ausfiel als mit 100 μ M Quercetin. Auch Resveratrol senkte die Paralyse in CL2006 konzentrationsabhängig, wobei im Gegensatz zu Quercetin alle drei getesteten Konzentrationen zu einer Senkung führten. Interessanterweise waren 1 μ M und 100 μ M

gleich effektiv, wohingegen 10 μM Resveratrol die Paralyse zwar ebenfalls senkte, der Effekt jedoch deutlich geringer ausfiel als mit den anderen getesteten Konzentrationen. Bei 100 μM der beiden Polyphenole war ihre paralyse-senkende Wirkung etwa gleich stark ausgeprägt. Da bereits gezeigt wurde, dass letztendlich die Toxizität des A β und die daraus resultierende Paralyse über die Menge aggregierter Proteine bestimmt wird (vgl. Kapitel 4.1), galt es grundlegend zu klären, ob dies auch für die Paralysereduktion durch die Polyphenole galt. In einer Konzentration von 100 μM senkten sowohl Quercetin, als auch Resveratrol die Menge aggregierter Proteine in Lösung signifikant und bestätigen damit die Annahme, dass die Menge aggregierter Proteine der limitierende Faktor für die A β -Toxizität und Prägung des Alzheimer-Phänotyps in CL2006 sind. Welche Mechanismen dazu aktiviert wurden wird im Folgenden diskutiert. Eine der Haupteigenschaften von Polyphenolen ist ihre antioxidative Kapazität [297]. Da die AD mit einem verstärkten Aufkommen an oxidativem Stress [298], welcher zu Schäden in neuronalen Zellen führt, einhergeht [299], lag es nahe zu vermuten, dass die beiden Polyphenole aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften [297] die Paralyse in CL2006 reduzieren. Insbesondere dem Quercetin wird ein großer Beitrag zum Schutz neuronaler Zellen vor ROS-induzierten Schäden zugesprochen [166, 300]. Die Expression des A β in CL2006 führte zu einem verstärkten Vorkommen von mitochondrialen ROS im Vergleich zum Wildtyp N2. Durch die Inkubation mit den beiden Polyphenolen wurden die mitochondrialen ROS-Spiegel effektiv gesenkt. Genau wie hinsichtlich der Paralyse bewirkte Quercetin eine konzentrationsabhängige Senkung. Auch wenn Resveratrol die Paralyse mit 1 μM und 100 μM am effektivsten senkte, so zeigte sich für die antioxidative Kapazität das gleiche konzentrationsabhängige Verteilungsmuster wie bei Quercetin. 1 μM beider Polyphenole spielte für die Verhinderung erhöhter mitochondrialer ROS keine Rolle, während 10 μM bzw. 100 μM die mitochondrialen ROS-Spiegel signifikant senkten. Dieser Effekt fiel bei einer Polyphenolkonzentration von 100 μM am deutlichsten aus. Da Resveratrol in einer Konzentration von 1 μM zwar die Paralyse nicht jedoch die mitochondrialen ROS-Spiegel senkte, war davon auszugehen, dass die antioxidative Kapazität der Polyphenole keine Bedeutung für die Verminderung der A β -Toxizität hatte. Um dies final zu bestätigen, wurde Ascorbinsäure als eines der bekanntesten und potentesten Antioxidantien [301] zum Vergleich herangezogen. Ascorbinsäure senkte in den beiden getesteten Konzentrationen die mitochondrialen ROS-Spiegel stark, hatte jedoch keinerlei Einfluss

auf die Paralyse. Dies bestätigte, dass die antioxidative Kapazität von Polyphenolen als Mechanismus für die Reduktion der Paralyserate ausgeschlossen werden kann. Da sich 100 μ M als potenteste Konzentration der beiden Polyphenole zeigte und mit dieser Konzentration gleich starke Effekte auf die Paralyse erzielt wurden, wurden für alle weiteren Versuche Polyphenole mit dieser Konzentration appliziert. Polyphenolen wird eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Stressresistenz zugesprochen. So wurden Quercetin und Resveratrol als Sirtuinaktivatoren identifiziert [206, 302]. Stellvertretend für die beiden in dieser Arbeit verwendeten Polyphenole wurden CL2006 Nematoden mit 100 μ M Quercetin inkubiert und zusätzlich wurde eine *sir-2.1* RNAi durchgeführt. Der paralyseenkende Effekt der *sir-2.1* RNAi wurde hierdurch nochmal verstärkt. Demnach muss die Polyphenolwirkung auf die Paralyse unabhängig von der SIR-2.1 Aktivierung vermittelt werden. In einer anderen Studie wurde in Bezug auf die Verlängerung der Lebensspanne in *C. elegans* durch Quercetin bereits gezeigt, dass auch hier ein SIR-2.1 unabhängiger Mechanismus existieren muss [303].

Im Rahmen der Verhinderung des, durch die A β -vermittelte Toxizität, generierten Alzheimer-Phänotyps wurde, wie in Kapitel 5.1 bereits diskutiert, der zellulären Proteostase eine besondere Rolle zugesprochen. Da bereits gezeigt wurde, dass Polyphenole Einfluss auf die Proteinaggregation ausüben, erweisen sich die Mechanismen der zellulären Proteostase als mögliche Ziele der Polyphenole. Um die Bedeutung der Proteostase für die durch Quercetin und Resveratrol vermittelten Effekte zu ermitteln, wurden die einzelnen zentralen Gene der Proteostase unter Verwendung der RNAi untersucht. Die mitochondrialen Chaperone HSP-6 und HSP-60 wurden für die Quercetin- als auch die Resveratrolwirkung nicht benötigt. Auch unter RNAi beider Chaperone führte die Inkubation mit beiden Polyphenolen zu einer Senkung der Paralyse. Neuste Studien weisen darauf hin, dass die Proteostase Ziel von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen sein könnte [304]. In einer humanen Zellkulturstudie wurde gezeigt, dass Quercetin das humane HSP70 inhibiert. Diese von Hosokawa *et al.* beschriebene HSP70-Hemmung in HeLa-Zellen sowie in Zellen einer Kolonkarzinomzelllinie [305] könnte darauf basieren, dass in Anwesenheit der Polyphenole weniger fehlgefaltete Proteine entstehen und deshalb die Aktivitäten von HSP-6 und HSP-60 in Bezug auf die A β -Aggregation unbedeutender werden. Mitochondriale Dysfunktionen sind ein Indikator für neurodegenerative Erkrankungen. Studien zeigten, dass Polyphenole speziell Einfluss auf die Mitochondrien haben

können [306]. So konnten z. B. Anthocyane in Mäusen, die mitochondriale Dysfunktionen in Zellen des Hippokampus aufwiesen, diese verbessern, indem sie die mitochondriale Biogenese aktivierten sowie ROS-Spiegel und Vorkommen von Carbonylverbindungen senkten [307]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine polyphenolreiche Ernährung die Spiegel des antioxidativ wirkenden Glutathions in zerebralen Mitochondrien von Mäusen erhöhte [308]. Demnach wäre es denkbar, dass auch Quercetin und Resveratrol über eine Beeinflussung mitochondrialer Mechanismen, z. B. eine Aktivierung der UPR^{mt}, zur Detoxifikation von A β beitragen. Allerdings kam es auch in UPR^{mt}-defizienten Nematoden zu einer Reduktion der Paralyse durch Quercetin. Weder der Transkriptionsfaktor DVE-1 noch das UBL-5 sind Zielgene des Quercetins. Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse mit Resveratrol zeigten jedoch, dass Resveratrol in Bezug auf die UPR^{mt} anders wirkt als Quercetin. Eine *dve-1* RNAi verhinderte den Rückgang der Paralyse durch Resveratrol ebenfalls nicht, die RNAi von *ubl-5* hingegen schon. Wie bereits diskutiert muss UBL-5 demnach unabhängig von DVE-1 wirken (siehe Kapitel 5.1). Resveratrol könnte über eine Induktion von UBL-5 wirken und dieser könnte über die Aktivierung von Promotorregionen anderer Zielgene als der genannten der UPR^{mt} den Resveratroleffekt vermittelt. Das ER-Analog zur UPR^{mt}, die UPR^{ER}, ist ebenfalls nicht in die Vermittlung des Quercetineffektes involviert. Auch wenn für andere Polyphenole eine XBP-1-aktivierende Funktion gezeigt wurde [309], kommt es in XBP-1-, ABU-1- und ABU-11-defizienten Nematoden nach wie vor zu einer Reduktion der A β -Toxizität durch Quercetin. Die Stabilisierung der Proteine sowie die UPR als Reaktion auf ER-Stress können demnach nicht die Quercetin-induzierte Senkung der cytotoxischen A β -Aggregate und der Paralyserate katalysieren. Resveratrol jedoch war unter *xbp-1* RNAi nicht mehr in der Lage die Paralyse zu senken. In Abwesenheit der ABUs aufgrund von *abu-1* bzw. *abu-11* RNAi kam es, wie mit Quercetin auch gezeigt, zu einer Reduktion der Paralyse durch Resveratrol. Es ist dennoch deutlich, dass Resveratrol eine effektiv funktionierende UPR^{ER} benötigt, da bei Fehlen des zentralen Transkriptionsfaktors XBP-1 keine Reduktion der A β -induzierten Toxizität möglich war und dieser wahrscheinlich die fehlenden ABUs kompensieren kann. Wie bereits beschrieben wird XBP-1 über verschiedene Wege durch Spleißen der mRNA aktiviert. In *C. elegans* sind IRE-1, das PERK Homolog PEK-1 sowie ATF-6 mögliche Aktivierungswege von *xbp-1* [213]. Es wäre denkbar, dass Resveratrol hier eingreift und die Aktivität einer dieser

Wege beeinflusst. Tatsächlich konnte an einer humanen Kolonkarzinomzelllinie gezeigt werden, dass Resveratrol ein verstärktes Spleißen von XBP-1 bewirkt [310]. Auf humaner Ebene wurde neben der strukturellen Verbindung zwischen ER und den Mitochondrien auch eine funktionelle Verbindung beschrieben [311]. So ist z. B. bekannt, dass ein Lipid- sowie Ca^{2+} -Austausch zwischen beiden Organellen stattfindet, der die Faltung von Proteinen mittels Chaperonen reguliert [312, 313]. Insbesondere eine Verbindung im Rahmen der Stressantwort konnte nachgewiesen werden. Diese wird über den Austausch von Proteinen vermittelt [314]. Eine besondere Rolle kommt dabei dem humanen GRP78, ein Ca^{2+} -bindendes ER-spezifisches Chaperon, zu, das bei ER-Stress zwischen ER und Mitochondrien transloziert und so auch die Stressantwort in den Mitochondrien aktiviert [315, 316]. Resveratrol ist in der Lage die transkriptionelle Aktivität von GRP78 zu erhöhen [310]. Wenn auch mechanistisch nicht ganz geklärt, gibt es Hinweise darauf, dass die Aktivierung auch umgekehrt funktioniert. Die RNAi der Adenylatkinase 2, ein mitochondriales Enzym, das Nukleotid-Interkonversionen reguliert, führte zu einer verminderten Expression UPR^{ER} -relevanter Gene [317]. Dies bestätigend zeigte eine Studie mit Mäusen, dass eine verminderte mitochondriale Funktionsfähigkeit verschiedene ER-Stressmarker induziert, u. a. das vermehrte Spleißen von XBP-1 [318]. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Aufhebung der paralyse senkenden Wirkung des Resveratrols in CL2006 unter *ubl-5* RNAi. Es wäre denkbar, dass Resveratrol durch eine Aktivierung von UBL-5 zu einem verstärkten Spleißen des ER-spezifischen Transkriptionsfaktors XBP-1 führt und so die UPR^{ER} aktiviert. Dies könnte den durch Proteinaggregation verursachten ER-Stress reduzieren und so die Paralyse in CL2006 senken. Es lässt sich abschließend feststellen, dass Resveratrol, anders als Quercetin, über eine Aktivierung der UPR^{ER} die A β -induzierte Toxizität senkt. Warum Quercetin nicht den gleichen Weg aktiviert ist nicht ganz erklärbar, allerdings sind bereits zuvor Unterschiede in der Signalwegaktivierung verschiedener Polyphenole gezeigt worden [319].

Funktioniert die UPR^{ER} nicht effektiv oder kommt es zu einer Überladung dieser mit fehlgefalteten oder aggregierten Proteinen, erkennt das ERAD-System diese Proteine und transportiert sie zurück in das Cytosol [124]. Dort erfolgt die Degradation über die beschriebenen Abbauewege, das UPS und die Autophagie. Das UPS ist im Rahmen degenerativer Erkrankungen häufig gestört [108, 139, 140]. Als Modulatoren werden insbesondere Polyphenole aus Tee schon seit einiger Zeit im Rahmen von

Krebstherapien erforscht [320, 321]. Fehlte in *C. elegans* CL2006 das Ubiquitinomolog UBQ-1 oder das Ubiquitin-aktivierende Enzym UBA-1, war die Paralyse stark erhöht und konnte auch durch die Inkubation mit Quercetin nicht wieder gesenkt werden. Resveratrol wirkte ebenfalls auf das UPS, da eine *ubq-1* RNAi die Senkung der Paralyse durch das Stilben verhinderte. Jedoch kam es unter *uba-1* RNAi nach wie vor zu einer Senkung der Paralyserate durch Resveratrol. Zwar ist UBA-1 als einziges Ubiquitin-aktivierendes Enzym in *C. elegans* beschrieben, es gibt jedoch noch ein zweites Ortholog, das UBA-2. Dieses formt zusammen mit einer katalytischen Untereinheit AOS-1 (*activator of sumo (yeast AOS homolog)*), ein heterodimeres Enzym, welches das Ubiquitin-ähnliche Protein SMO-1 (*SUMO (ubiquitin-related homolog)*) aktiviert [322]. In *C. elegans* ist UBA-2 essentiell für die Embryogenese und die Vulvaentwicklung [323]. Es spielt für den proteasomalen Abbau keine Rolle und kann demnach den Effekt des Resveratrols mit *uba-1* RNAi nicht erklären. Schlussendlich jedoch scheinen sowohl Quercetin als auch Resveratrol Einfluss auf den proteasomalen Abbau zu haben. Um dieses Postulat zu verifizieren, wurde die spezifische Proteasomaktivität über die Umsetzung eines Fluorogen-markierten Peptids bestimmt. Sowohl Quercetin als auch Resveratrol waren in der Lage die proteasomale Aktivität deutlich zu steigern. Fehlte UBA-1 aufgrund von RNAi, was zu einer Hemmung des UPS-Abbauweges führte, so war die Proteasomaktivität erniedrigt und konnte durch Quercetin nicht mehr gesteigert werden. Quercetin scheint die Ubiquitinierung abzubauender Proteine in CL2006 zu aktivieren. Dies steigerte wiederum den Proteinabbau über das UPS [324] und trägt somit zu einer effektiven Detoxifikation des A β bei. Resveratrol steigerte in den durchgeführten Untersuchungen ebenfalls die proteasomale Aktivität. Unter Berücksichtigung der Paralyseergebnisse mit *uba-1* RNAi geschieht dies wahrscheinlich durch die direkte Aktivierung von UBQ-1. Da die UBA-1 als einzige E1-Ligase in *C. elegans* beschrieben ist, sollte eine Aktivierung des Proteasoms eigentlich unter *uba-1* RNAi nicht mehr möglich sein. Da jedoch trotz *uba-1* RNAi eine gewisse Restaktivität des Proteasoms vorhanden war, muss es demnach noch weitere Möglichkeiten geben das Proteasom unabhängig von UBA-1 zu beeinflussen. Hier wäre ein Eingreifen des Resveratrols denkbar. Dafür spricht ebenfalls, dass die Auswirkungen einer *ubq-1* RNAi auf die Entwicklung deutlich stärker ausgeprägt sind als die einer *uba-1* RNAi [224]. Eine weitere, wenn auch rein hypothetische Erklärung wäre, dass Resveratrol die Expression von *uba-1* so

stark aktiviert, dass die mRNA-Spiegel stärker ansteigen, als sie von der RANi wieder abgebaut werden können. Dies erscheint angesichts der etablierten Methode der RNAi als unwahrscheinlich, könnte allerdings in zukünftigen Forschungsansätze überprüft werden.

Neben dem UPS verfügt die Zelle mit der Autophagie über eine weitere Möglichkeit Proteine, die vom ERAD wieder ins Cytosol transportiert wurden, abzubauen. Die Autophagie wird z. B. durch die Kalorienrestriktion ausgelöst [325], welche in Vertebraten den FOXO Transkriptionsfaktor aktiviert [268] und so die Expression von für die Autophagie essentiellen ATGs verstärkt [326]. Wie bereits diskutiert (vgl. Kapitel 5.2) spielt die Autophagie bei der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Im Rahmen der Autophagie können die abzubauenden Proteine über verschiedene Wege in die Lysosomen gelangen. Die Makroautophagie stellt hier einen wesentlichen Weg dar. Das Fehlen von BEC-1 führt zu einem blockierten makroautophagosomalen Abbau, da der initiale Schritt, die Bildung der Autophagosomen, ausbleibt [141]. Weder Quercetin noch Resveratrol konnten unter *bec-1* RNAi die Paralyserate in CL2006 senken. Dies zeigt letztendlich, dass BEC-1 und somit die Makroautophagie essentiell für die Polyphenol-vermittelte Reduktion der A β -Toxizität ist. Ein weiterer in Vertebraten und im Menschen beschriebener Autophagieweg ist die CMA. Diese ist funktionell bislang nicht für *C. elegans* beschrieben [230]. Auch mit RNAi von *Imp-2* bzw. *unc-46*, zwei CMA-Rezeptorhomologen, kam es zu einer Reduktion der Paralyserate in CL2006 durch Quercetin. Resveratrol hingegen war nach *Imp-2* RNAi nicht mehr in der Lage die Paralyserate zu senken. Dies deutet auf eine funktionelle Bedeutung des LMP-2 auch in *C. elegans* hin. Darüber hinaus senkte eine Inkubation mit Quercetin bzw. Resveratrol die Lysosomenmenge, als Marker für Autophagie, in dem *C. elegans* Alzheimer-Modell CL2006. Da bereits in mehreren Studien an verschiedenen humanen Krebszelllinien beschrieben wurde, dass Quercetin die Autophagie aktiviert [327, 328], ist davon auszugehen, dass das Absinken der Lysosomen auf einen vermehrten Umsatz und somit eine verstärkte Aktivität des autophagosomalen Abbaus zurückzuführen ist. Um zu klären, wie genau Quercetin und Resveratrol in den autophagosomalen Abbau eingreifen, wurde der endolysosomale Abbauweg durch die Zugabe von Chloroquin gehemmt [329]. Dies steigerte die Menge der vorhandenen Lysosomen in CL2006 deutlich, da Chloroquin den pH-Wert in den Lysosomen steigert und so eine Hemmung

der dort aktiven Proteasen hervorruft [329]. Bei gleichzeitiger Inkubation von Chloroquin und Quercetin senkte Quercetin die Lysosomenmenge zwar, jedoch nicht vollständig bis zu dem Niveau der Kontrolle. Resveratrol konnte nach Chloroquininkubation die Lysosomenmenge nicht wieder senken. Die RNAi des CMA-Homologs *lmp-2* führte zu einem Absinken der Lysosomenmenge, während diese von einer *unc-46* RNAi unbeeinflusst blieb. Quercetin senkte auch unter RNAi der beiden CMA-Gene die Lysosomenmenge, während Resveratrol mit *lmp-2* RNAi nicht mehr in der Lage war die Lysosomenmenge zu reduzieren. Dies lässt postulieren, dass Quercetin den Abbau in den Lysosomen fördert, wahrscheinlich über ein Herabsetzen des pH-Wertes. Es konnte zuvor bereits auf zellulärer Ebene an humanen Caco-2-Zellen gezeigt werden, dass Quercetin in der Lage ist den pH-Wert von Lysosomen zu senken [330]. Resveratrol hingegen scheint lediglich über eine Aktivierung des Proteinabbaus in den Lysosomen zu wirken, die allerdings nicht direkt über eine Senkung des pH-Wertes reguliert wird, da in Kombination mit Chloroquin keine Reduktion der Lysosomenmenge erkennbar ist. Zusätzlich zeigten die Beobachtungen mit RNAi der CMA-homologen Rezeptoren, dass auch in *C. elegans* die CMA funktionell eine Rolle spielt. Resveratrol scheint den Abbau der Proteine in den Lysosomen über eine Aktivierung des LMP-2-Rezeptors zu fördern. Eine Studie an einer Kolonkarzinomzelllinie zeigte, dass Resveratrol Lysosomen-spezifische Caspasen aktivieren und beeinflussen kann [331]. Entsprechend der Ergebnisse dieser Arbeit ist wahrscheinlich, dass dies in Abhängigkeit von LMP-2 geschieht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl Quercetin als auch Resveratrol die Paralyse in CL2006 senken, indem sie die Menge anfallender Proteinaggregate in Lösung um ca. 50% reduzieren. Dies bestätigt die zuvor aufgestellte Hypothese, dass die Menge aggregierter Proteine letztendlich die A β -Toxizität in CL2006 definiert. Quercetin vermindert die A β -induzierte Toxizität in CL2006 über den verstärkten proteolytischen Abbau des A β mittels UPS und Makroautophagie. Resveratrol hingegen senkt die A β -induzierte Toxizität über eine Aktivierung der UPR, welche ER-Stress und mitochondrialen Stress reduzieren, sowie den proteolytischen Abbau über das UPS und der Autophagie, unter Berücksichtigung der CMA. Wie in Abbildung 5-1 dargestellt sind die Faktoren HSP-6, HSP-60 und DVE-1 der UPR^{mt} für die Verminderung der Paralyse essentiell, während UBL-5 keine Rolle spielt. Der UPR^{ER} Transkriptionsfaktor XBP-1 ist ebenfalls von Bedeutung, während die Gene *abu-1* und *abu-11* unbedeutend

sind. Sowohl UBQ-1 als auch UBA-1, als essentielle Faktoren des UPS, sind wichtig im Rahmen der Paralyse senkung. Für die Paralyse senkung ist BEC-1 als zentrales Protein der Makroautophagie essentiell, während LMP-2 und UNC-46 als Faktoren der CMA keine Rolle spielen. Quercetin senkt die Paralyse über eine Aktivierung von UBA-1, UBQ-1 sowie BEC-1, Resveratrol senkt die Paralyse über eine Aktivierung von UBL-5, XBP-1, UBQ-1, BEC-1 und LMP-2.

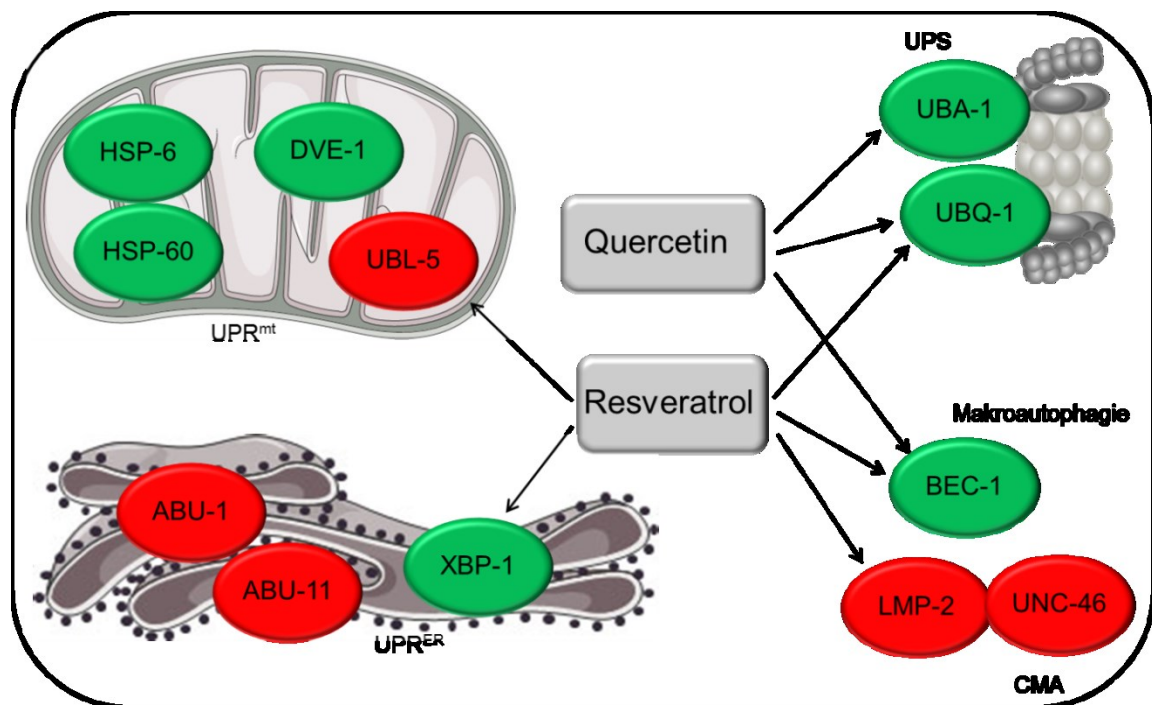


Abbildung 5-1 Schematische Darstellung der Bedeutung der Proteostase für die Paralyse in CL2006

Schematische Darstellung der Proteostase mit Kennzeichnung der Faktoren, welche die Paralyse in CL2006 beeinflussen; grün: Proteine der Proteostase, welche die Paralyse in CL2006 beeinflussen bzw. deren RNAi die Paralyse steigert; rot: Proteine der Proteostase, welche die Paralyse nicht beeinflussen; Pfeile zeigen an welche Faktoren durch das jeweilige Polyphenol aktiviert werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Alzheimer Erkrankung (AD) ist die häufigste Form der Altersdemenz, die insbesondere aufgrund der veränderten Altersstruktur der westlichen Gesellschaft deutlich zunimmt. Die Akkumulation von β -Amyloid (A β) - Peptiden im Gehirn gilt als histopathologisches Erkennungsmerkmal der AD und als Ursache der Neurodegeneration und der schweren kognitiven Ausfälle. Neben genetischen Einflüssen scheinen beim Menschen bestimmte Nahrungsinhaltsstoffe die Ausprägung der Erkrankung zu verändern. So wird Cholesterol beispielsweise eine AD-fördernde Wirkung zugeschrieben, während die in Nahrungspflanzen vielfach enthaltenen Polyphenole im Kontext einer AD-Prävention diskutiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der transgene *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) Stamm CL2006 als ein AD-Modell verwendet, um einerseits die Wirkungen bestimmter Gene auf den AD-Phänotyp zu erfassen und andererseits Interaktionen zwischen Genen und Nahrungsinhaltsstoffen aufzuklären. CL2006 exprimiert das humane A β unter der Kontrolle eines Muskelpromotors, wodurch die neuromuskuläre Transmission gehemmt wird, was wiederum die Paralyse als erfassbaren Phänotyp bedingt. Die Exposition der Nematoden gegenüber einem Hitzestress von 35°C für 1 h bewirkte bei ca. 50% der CL2006 Population die Paralyse, wohingegen der Wildtyp nicht paralyisierte.

Während beim Menschen eine Isoform des am Cholesteroltransportes beteiligten Apolipoprotein E mit einem erhöhten AD-Risiko einhergeht, konnte in CL2006 gezeigt werden, dass eine mittels RNA-Interferenz (RNAi) erzielte verminderte Expression eines *Apo*-homologen Gens, des *vit-6*, die Paralyse reduzierte. Da eine verminderte Cholesterolversorgung die gleichen Effekte erzielte, jedoch die durch *vit-6* RNAi reduzierte Paralyse nicht beeinflusste, ist davon auszugehen, dass VIT-6 durch die zelluläre Versorgung mit Cholesterol den AD-Phänotyp beeinflusst. Des Weiteren konnte aufgeklärt werden, dass die intrazelluläre Signalvermittlung des Cholesterols über den Steroid-Signalweg mit seinen beiden zentralen Schlüsselproteinen DAF-9 und DAF-12 erfolgt, die schließlich den Stressresistenz- und Langlebigkeit-vermittelnden FOXO-Transkriptionsfaktor DAF-16 hemmen.

Da die durch den Hitzestress in CL2006 induzierte Paralyse mit einer erhöhten Menge aggregierter Proteine in Lösung assoziiert war und solche Proteinaggregate als

ursächlich für den AD-Phänotyp diskutiert werden, wurde im Folgenden die Bedeutung verschiedener Gene in CL2006 untersucht, die an der zellulären Protein-Homöostase, der Proteostase, beteiligt sind. Die durch RNAi erzielte verminderte Expression der an der *unfolded protein response* der Mitochondrien (UPR^{mt}) beteiligten mitochondrialen Chaperone HSP-6 und HSP-60 steigerte die Paralyse in CL2006 signifikant. Die UPR des endoplasmatischen Retikulums (UPR^{ER}) trug ebenfalls zur Prävention des Alzheimer-Phänotyps bei, da die RNAi des unter ER-Stress aktivierten Gens *xbp-1* die Paralyse deutlich erhöhte. Im Gegensatz dazu zeigten die Gene *abu-1* und *abu-11*, die üblicherweise eine blockierte UPR^{ER} kompensieren, keinen Einfluss auf die Paralyse. Neben Proteinen, die über die korrekte Faltung von Zielproteinen Einfluss auf den A β -induzierten Phänotyp in CL2006 nehmen, konnten sowohl der proteasomale als auch der autophagosomale Abbau von Proteinen als protektive Mechanismen gegenüber dem Auftreten der Paralyse in den Nematoden identifiziert werden.

Das in Zwiebeln und Äpfeln reichlich vorkommende Polyphenol Quercetin sowie das in Rotwein enthaltene Resveratrol senkten die Paralyse signifikant. Hierzu reichte eine Konzentration von 1 μ M Resveratrol, wohingegen deutlich höhere Quercetinkonzentrationen notwendig waren. Im Hinblick auf die Abhängigkeit der Polyphenolwirkungen von zentralen Genen der Proteostase wurde gezeigt, dass Quercetin die Paralyse unabhängig von Proteinen der UPR^{mt} und der UPR^{ER} senkte, während die Funktionalität des Proteasoms und der Makroautophagie unabdingbare Voraussetzung der reduzierten Paralyse waren. Resveratrol führte ebenfalls zu einem verstärkten Proteinabbau über das proteasomale und, unter Einbeziehung der Chaperon-vermittelten Autophagie, auch über das autophagosomale System. Darüber hinaus war die Resveratrolwirkung, im Gegensatz zu den Quercetineffekten, auch abhängig von der UPR^{mt} und UPR^{ER}.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der transgene A β -exprimierende *C. elegans* Stamm CL2006 ein hervorragendes Modell darstellt, AD-assoziierte Phänomene auf molekularer Ebene zu erfassen. In der vorliegenden Arbeit wurde aufgezeigt, dass die Versorgung des Organismus mit Cholesterol den AD-assoziierten Phänotyp über eine Aktivierung des Steroid-Signalweges verstärkt. Desweiteren wurde die Proteostase als zentraler Mechanismus einer A β -induzierten Paralyse identifiziert. Die Polyphenole Quercetin und Resveratrol benutzen schließlich unterschiedliche Zielproteine der Proteostase um der A β -induzierten Paralyse entgegenzuwirken.

7 SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of senile dementia and due to the aging population it is an increasing issue. The accumulation of β -amyloid (A β) peptides is considered to be the key histopathological change of AD as well as the cause of the neurodegeneration and the severe cognitive symptoms. Besides genetic factors certain food components seem to modulate the development of the disease. Therefore cholesterol is adjudged to have an AD-promoting effect, while polyphenols are discussed in the context of AD prevention. In the present work the transgenic *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) strain CL2006 was used as an Alzheimer model to study the influence of certain genes on the AD-phenotype on the one side, as well as interactions between genes and food components on the other side. CL2006 expresses human A β under the control of a muscle promoter, causing a progressive adult onset paralysis. When a standardized heat shock for 1 h at 35°C was applied, 50% of the nematode population showed to be paralysed, while the *C. elegans* wildtype did not.

In humans a polymorphism of the apolipoprotein E, which is involved in cholesterol transportation, goes along with an increased risk of developing AD. In CL2006 it could be shown, that a knockdown of the *apo*-homologous gene *vit-6* reduced paralysis. Because a reduced cholesterol exposure showed the same effects, it can be assumed, that VIT-6 influences the Alzheimer phenotype through the cellular cholesterol supply. Furthermore it could be clarified that the intracellular cholesterol signalling, that is carried out by the two key proteins DAF-9 and DAF-12 of the steroid signalling, finally results in an activation of the stress resistance and longevity conveying FOXO transcription factor DAF-16.

Due to the fact that the heat-induced paralysis is accompanied by an increase in aggregated proteins in solution and such protein aggregates are discussed in the context of the Alzheimer phenotype, the meaning of CL2006 genes, involved in the cellular protein homeostasis process, the proteostasis, was examined in the following. The RNAi knockdown of the mitochondrial chaperones HSP-6 and HSP-60, which are involved in the mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt}), increased paralysis in CL2006 significantly. Likewise, the UPR of the endoplasmic reticulum (UPR^{ER}) also contributed to the prevention of the Alzheimer phenotype, since the RNAi of *xbp-1*, that

is induced upon ER-stress, increased paralysis in CL2006. In contrary the genes *abu-1* and *abu-11* which are usually activated to compensate a blocked UPR showed no effect on paralysis. Besides proteins, that have influence on the A β -induced phenotype due to their ability to modulate the folding process of target proteins, the proteasome as well as the autophagosomal degradation of proteins have been identified as protective mechanisms towards the paralysis in nematodes.

The polyphenol quercetin that can be found in onions and apples, as well as resveratrol from red wine significantly reduced paralysis. Therefore a concentration of 1 μ M resveratrol was sufficient, whereas quercetin was needed in a higher dosage. In terms of the dependency of the polyphenol effects on central genes from the proteostasis network, it was found that quercetin did not reduce paralysis by activating the key proteins involved in UPR^{mt} and UPR^{ER}. However, the functionality of the protein degradation systems, the UPS and the macroautophagy, is indispensable. Resveratrol also activated the protein degradation by activating the proteasomal system and, considering the chaperone-mediated autophagy, also by activating the autophagosomal degradation. Additionally the resveratrol effect also depended on the UPR^{mt} and UPR^{ER}.

In conclusion, it was assessed that CL2006, the *C. elegans* A β -expressing transgene, is an excellent model to study AD-associated changes on a molecular level. In the present work it was shown, that the supply of the organism with cholesterol increases the AD-associated phenotype due to an activation of the steroid signalling pathway. Furthermore the proteostasis network has been identified as a central mechanism to prevent A β -induced paralysis. The polyphenols quercetin and resveratrol finally use different target proteins of the proteostasis to counteract paralysis.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Alzheimer A** (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*. 64:146-148.
2. **Selkoe DJ** (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 298(5594):789-791.
3. **Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A** (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med*. 7(12):548-554.
4. **Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, et al.** (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 21(3):383-421.
5. **Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R** (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*. 30(4):572-580.
6. **Selkoe DJ** (2011) Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi: 10.1101/cshperspect.a004457.
7. **Haupt M, Kurz A, Pollmann S, Romero B** (1992) Symptom severity and symptom progression in Alzheimer's disease-- comparison between two cases with early and late onset. *Nervenarzt*. 63(9).
8. **Mendez MF, Martin RJ, Smyth KA, Whitehouse PJ** (1990) Psychiatric symptoms associated with Alzheimer's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2(1):28-33.
9. **Brodaty H, Seeher K, Gibson L** (2012) Dementia time to death: a systematic literature review on survival time and years of life lost in people with dementia. *Int Psychogeriatr*. 24(7):1034-1045.
10. **Batsch N, Mittelman M** (2012) *Overcoming the stigma of dementia*. World Alzheimer Report. <http://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2012.pdf> (Stand 13.10.2013).
11. **Bickel H** (2001) Demenz im höheren Lebensalter: Schätzungen des Vorkommens und der Versorgungskosten. *Z Gerontol Geriatr*. 34(2):108-115.
12. **Braak H, Braak E, Bohl J, Reintjes R** (1996) Age, neurofibrillary changes, A beta-amyloid and the onset of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1996, 210(2):87-90.
13. **Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD** (2003) Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology*. 61(9):1185-1190.

14. **Querfurth HW, LaFerla FM** (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 362(4):329-344.
15. **Maccioni RB, Munos JP, Barbeito L** (2001) The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Sci.* 32(5):367-381.
16. **LaFerla FM, Oddo S** (2005) Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med.* 11(4):170-176.
17. **Mortimer JA, French LR, Hutton JT, Schuman LM** (1985) Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease. *Neurology.* 35(2).
18. **Heyman A, Wilkinson WE, Stafford JA, Helms MJ, Sigmon AH, Weinberg T** (1984) Alzheimer's disease: a study of epidemiological aspects. *Ann Neurol.* 15(4):335-341.
19. **Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, Cha R, Kokmen E, O'Brien PC, Palumbo PJ** (1997) Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Am J Epidemiol.* 145(4):301-308.
20. **Oddo S, Caccamo A, Green KN, Liang K, Tran L, Chen Y, Leslie FM, LaFerla FM** (2005) Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(8):3046-3051.
21. **Wood WG, Li L, Müller WE, Eckert GP** (2013) Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *J Neurochem.* [Epub ahead of print].
22. **Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, Evans DA, Mendes de Leon CF, Arnold SE, Barnes LL, Bienias JL** (2003) Education modifies the relation of AD pathology to level of cognitive function in older persons. *Neurology.* 60(12):1909-1915.
23. **Rovio S, Kåreholt I, Helkala EL, Viitanen M, Winblad B, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A, Kivipelto M** (2005) Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 4(11):705-711.
24. **Gillette-Guyonnet S, Secher M, Vellas B** (2013) Nutrition and neurodegeneration: epidemiological evidence and challenges for future research. *Br J Clin Pharmacol.* 75(3):738-755.
25. **Beard CM, Waring SC, O'Brien PC, Kurland LT, Kokmen E** (1980) Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer's disease: a case-control study in Rochester, Minnesota, 1980 through 1984. *Mayo Clin Proc.* 73(10):951-955.
26. **Fassbender K, Masters C, Beyreuther K** (2001) Alzheimer's disease: molecular concepts and therapeutic targets. *Naturwissenschaften.* 88(6):261-267.

-
27. **Petanceska SS, DeRosa S, Olm V, Diaz N, Sharma A, Thomas-Bryant T, Duff K, Pappolla M, Refolo LM** (2002) Statin therapy for Alzheimer's disease: will it work? *J Mol Neurosci.* 19(1-2):155-161.
 28. **Siemers E, Skinner M, Dean RA, Gonzales C, Satterwhite J, Farlow M, Ness D, May PC** (2005) Safety, tolerability, and changes in amyloid beta concentrations after administration of a gamma-secretase inhibitor in volunteers. *Clin Neuropharmacol.* 28(3):126-132.
 29. **Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, et al.** (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med.* 6(8):116-119.
 30. **Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, et al.** (2000) A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature.* 408(6815):979-982.
 31. **Bhullar KS, Rupasinghe HP** (2013) Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev* . doi: 10.1155/2013/891748.
 32. **Albarracin SL, Stab B, Casas Z, Sutachan JJ, Samudio I, Gonzalez J, Gonzalo L, Capani F, Morales L, Barreto GE** (2012) Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. *Nutr Neurosci.* 15(1):1-9.
 33. **Glenner GG und Wong CW** (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 120(3):885-890.
 34. **Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K** (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(12):4245-4249.
 35. **Hardy J** (2006) Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved? *Curr Alzheimer Res.* 3(1):71-73.
 36. **Hardy J und Selkoe DJ** (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297(5580):535-536.
 37. **Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y** (1994) Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron.* 13(1):45-53.
 38. **Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B** (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 325(6106):733-736.

-
39. **Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Okamoto T, Murayama Y, Ogata E** (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature*. 362(6415):75-79.
 40. **Soba P, Eggert S, Wagner K, Zentgraf H, Siehl K, Kreger S, Löwer A, Langer A, Merdes G, Paro R, et al.** (2005) Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J*. 24(29):3624-3634.
 41. **Jin LW, Ninomiya H, Roch JM, Schubert D, Masliah E, Otero DA, Saitoh T** (1994) Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *J Neurosci*. 14(9):5461-5470.
 42. **Mattson MP, Barger SW, Cheng B, Lieberburg I, Smith-Swintosky VL, Rydel RE** (1993) beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 16810:409-414.
 43. **LaFerla FM, Green KN, Oddo S** (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 8(7):499-509.
 44. **Sinha S und Lieberburg I** (1999) Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(20):11049-11053.
 45. **Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R** (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron*. 37(6):925-937.
 46. **De Strooper B** (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron*. 38(1):9-12.
 47. **Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP** (1996) Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem*. 67(5):1882-1896.
 48. **Cao X und Südhof TC** (2001) A transcriptionally [correction of transriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*. 293(5527):115-120.
 49. **Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB, Selkoe DJ** (2000) The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry*. 39(35):10831-19839.
 50. **Grune T, Jung T, Merker K, Davies KJ** (2004) Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 36(12):2519-2530.

-
51. **Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW** (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72(5):1858-1862.
 52. **Jenkins SM und Johnson GV** (1998) Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ. *Neuroreport*. 9(1):67-71.
 53. **Biernat J und Mandelkow EM** (1999) The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. *Mol Biol Cell*. 10(3):727-740.
 54. **Mandelkow EM, Schweers O, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E** (1996) Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann N Y Acad Sci*. 777:96-106.
 55. **Roush W** (1995) Protein studies try to puzzle out Alzheimer's tangles. *Science*. 267(5199):793-794.
 56. **Cente M, Filipcik P, Pevalova M, Novak M** (2006) Expression of a truncated tau protein induces oxidative stress in a rodent model of tauopathy. *Eur J Neurosci*. 24(4):1085-1090.
 57. **Dias-Santagata D, Fulga TA, Duttaroy A, Feany MB** (2007) Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in Drosophila. *J Clin Invest*. 117(11):236-245.
 58. **Mandelkow EM und Mandelkow E** (1998) Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*. 8(11):425-427.
 59. **Jicha GA, Weaver C, Lane E, Vianna C, Kress Y, Rockwood J, Davies P** (1999) cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 19(17):7486-7494.
 60. **Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K** (1994) Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience*. 61(4):765-772.
 61. **Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM** (2001) Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science*. 293(5534):1491-1495.
 62. **Tomidokoro Y, Ishiguro K, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Park JM, Yasutake K, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M** (2001) Abeta amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP(Sw) mice. *Neurosci Lett*. 299(3):169-172.

-
63. **Echeverria V, Ducatenzeiler A, Dowd E, Jänne J, Grant SM, Szyf M, Wandosell F, Avila J, Grimm H, Dunnett SB, et al.** (2004) Altered mitogen-activated protein kinase signaling, tau hyperphosphorylation and mild spatial learning dysfunction in transgenic rats expressing the beta-amyloid peptide intracellularly in hippocampal and cortical neurons. *Neuroscience*. 129(3):583-592.
64. **Selkoe DJ** (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 81(2):741-766.
65. **Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al.** (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 349(6311):704-706.
66. **Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al.** (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 375(6534):754-760.
67. **Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, et al.** (1992) Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*. 258(5082):668-671.
68. **Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al.** (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 269(5226):973-977.
69. **Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, et al.** (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*. 376(6543):775-778.
70. **Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA** (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 261(5123):921-923.
71. **Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD** (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(5):1977-1981.
72. **Tokuda T, Fukushima T, Ikeda S, Sekijima Y, Shoji S, Yanagisawa N, Tamaoka A** (1997) Plasma levels of amyloid beta proteins Abeta1-40 and Abeta1-42(43) are elevated in Down's syndrome. *Ann Neurol*. 41(2):271-273.
73. **Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ** (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*. 360(6405):672-674.

-
74. **Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, et al.** (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2(8):864-870.
75. **Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Martinez A, Madrigal L, et al.** (1996) The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med.* 2(10):1146-1150.
76. **Sherrington R, Froelich S, Sorbi S, Campion D, Chi H, Rogaeva EA, Levesque G, Rogaev EI, Lin C, Liang Y, et al.** (1996) Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum Mol Genet.* 5(7):985-988.
77. **Mahley RW** (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 240(4852):622-630.
78. **Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH** (1987) Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem.* 262(29):14352-14360.
79. **Harris FM, Tesseur I, Brecht WJ, Xu Q, Mullendorff K, Chang S, Wyss-Coray T, Mahley RW, Huang Y** (2004) Astroglial regulation of apolipoprotein E expression in neuronal cells. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 279(5):3862-3868.
80. **Eto M, Watanabe K, Chonan N, Ishii K** (1998) Familial hypercholesterolemia and apolipoprotein E4. *Atherosclerosis.* 72(2-3):123-128.
81. **Murakami K, Shimizu M, Yamada N, Ishibashi S, Shimano H, Yazaki Y, Akanuma Y** (1993) Apolipoprotein E polymorphism is associated with plasma cholesterol response in a 7-day hospitalization study for metabolic and dietary control in NIDDM. *Diabetes Care.* 16(4):564-569.
82. **Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD** (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(20):9649-9653.
83. **Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, et al.** (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 7(2):180-184.

-
84. **Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, et al.** (2000) Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(6):2892-2897.
 85. **Reiss AB und Voloshyna I** (2012) Regulation of cerebral cholesterol metabolism in Alzheimer disease. *J Investig Med.* 60(3):576-582.
 86. **Gearing M, Mori H, Mirra SS** (1996) Abeta-peptide length and apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 39(3):395-399.
 87. **Lee CY, Tse W, Smith JD, Landreth GE** (2012) Apolipoprotein E promotes β -amyloid trafficking and degradation by modulating microglial cholesterol levels. *J Biol Chem.* 287(3):2032-2044.
 88. **Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE** (1994) Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science.* 264(5160):850-852.
 89. **Willnow TE, Carlo AS, Rohe M, Schmidt V** 2012) SORLA/SORL1, a neuronal sorting receptor implicated in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci.* 21(4):315-329.
 90. **Reitz C** (2013) Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's disease. *Curr Atheroscler Rep.* 15(3):307.
 91. **Scherzer CR, Offe K, Gearing M, Rees HD, Fang G, Heilman CJ, Schaller C, Bujo H, Levey AI, Lah JJ** (2004) Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 61(8):1200-1205.
 92. **Björkhem I, Cedazo-Minguez A, Leoni V, Meaney S** (2009) Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med.* 30(3):171-179.
 93. **Hauptmann S, Keil U, Scherping I, Bonert A, Eckert A, Müller WE** (2006) Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 41(7):668-673.
 94. **Fernández-Vizarra P, Fernández AP, Castro-Blanco S, Serrano J, Bentura ML, Martínez-Murillo R, Martínez A, Rodrigo J** (2004) Intra- and extracellular Abeta and PHF in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Histol Histopathol.* 19(3):823-844.
 95. **Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M** (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 21(9):3017-3023.
 96. **Casley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, Sharpe MA** (2002) Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem.* 80(1):91-100.
 97. **Chagnon P, Bétard C, Robitaille Y, Cholette A, Gauvreau D** (1995) Distribution of brain cytochrome oxidase activity in various neurodegenerative diseases. *Neuroreport.* 6(5):711-715.

-
98. **Trimmer PA, Swerdlow RH, Parks JK, Keeney P, Bennett JP Jr, Miller SW, Davis RE, Parker WD Jr** (2000) Abnormal mitochondrial morphology in sporadic Parkinson's and Alzheimer's disease cybrid cell lines. *Exp Neurol.* 162(1):37-50.
99. **Aleardi AM, Benard G, Augereau O, Malgat M, Talbot JC, Mazat JP, Letellier T, Dachary-Prigent J, Solaini GC, Rossignol R** (2005) Gradual alteration of mitochondrial structure and function by beta-amyloids: importance of membrane viscosity changes, energy deprivation, reactive oxygen species production, and cytochrome c release. *J Bioenerg Biomembr.* 37(4):207-225.
100. **Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, Müller-Spahn F, Haass C, Czech C, Pradier L** (2004) Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J Biol Chem.* 279(48):50310-50320.
101. **Butterfield DA und Lauderback CM** (2002) Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 32(11):1050-1060.
102. **Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR, Lovell MA** (2005) Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 93(4):953-962.
103. **Mark RJ, Pang Z, Geddes JW, Uchida K, Mattson MP** (1997) Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *J Neurosci.* 17(3):1046-1054.
104. **Blanc EM, Keller JN, Fernandez S, Mattson MP** (1998) 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, impairs glutamate transport in cortical astrocytes. *Glia.* 22(2):149-160.
105. **Mark RJ, Hensley K, Butterfield DA, Mattson MP** (1995) Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J Neurosci.* 15(9):6239-6249.
106. **Mattson MP** (1992) Calcium as sculptor and destroyer of neural circuitry. *Exp Gerontol.* 27(1):29-49.
107. **Castegna A, Aksenov M, Aksenova M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery WR, Butterfield DA** (2002) Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med.* 33(4):562-571.
108. **Choi J, Levey AI, Weintraub ST, Rees HD, Gearing M, Chin LS, 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.

-
109. **Yang SG, Wang WY, Ling TJ, Feng Y, Du XT, Zhang X, Sun XX, Zhao M, Xue D, Yang Y, et al.** (2010) α -Tocopherol quinone inhibits β -amyloid aggregation and cytotoxicity, disaggregates preformed fibrils and decreases the production of reactive oxygen species, NO and inflammatory cytokines. *Neurochem Int.* 57(8):914-922.
110. **More SS und Vince R** (2012) Potential of a γ -glutamyl-transpeptidase-stable glutathione analogue against amyloid- β toxicity. *ACS Chem Neurosci.* 3(3):204-210.
111. **Vance JE** (2012) Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech.* 5(6):746-755.
112. **Dietschy JM und Turley SD** (2001) Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol.* 12(2):105-112.
113. **Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, Tuomilehto J, Nissinen A** (1998) Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology.* 17(1):14-20.
114. **Jeon H, Blacklow SC** (2005) Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem.* 74:535-562.
115. **Boyles JK, Zoellner CD, Anderson LJ, Kosik LM, Pitas RE, Weisgraber KH, Hui DY, Mahley RW, Gebicke-Haerter PJ, Ignatius MJ, et al.** (1989) A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J Clin Invest.* 83(3):1015-1031.
116. **Herz J** (2001) The LDL receptor gene family: (un)expected signal transducers in the brain. *Neuron.* 29(3):571-581.
117. **Marcinkowska E und Wiedlocha A** (2002) Steroid signal transduction activated at the cell membrane: from plants to animals. *Acta Biochim Pol.* 49(3):735-745.
118. **Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M** (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature.* 475(7356):324-332.
119. **Ellis RJ** (1990) The molecular chaperone concept. *Semin Cell Biol.* 1(1):1-9.
120. **Priya S, Sharma SK, Goloubinoff P** (2013) Molecular chaperones as enzymes that catalytically unfold misfolded polypeptides. *FEBS Lett.* 587(13):1981-1987.
121. **Stolz A und Wolf DH** (2010) Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. *Biochim Biophys Acta.* 1803(6):694-705.
122. **Hartl FU und Hayer-Hartl M** (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 295(5561):1852-1858.
123. **Hu F und Liu F** (2011) Mitochondrial stress: a bridge between mitochondrial dysfunction and metabolic diseases? *Cell Signal.* 23(10):1528-1533.

-
124. **Pellegrino MW, Nargund AM, Haynes CM** (2013) Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta*. 1883(2):410-416.
 125. **Walter P und Ron D** (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 334(6059):1081-1086.
 126. **Kotiadis VN, Duchen MR, Osellame LD** (2013) Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. *Biochim Biophys Acta*. doi:10.1016/j.bbagen.2013.10.041
 127. **Ron D und Walter P** (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:519-529.
 128. **Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH** (2011) The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α . *Physiol Rev*. 91(4):1219-1243.
 129. **Kriegenburg F, Ellgaard L, Hartmann-Petersen R.** Molecular chaperones in targeting misfolded proteins for ubiquitin-dependent degradation. *FEBS J*. 2012, 279(4), S. 532-542.
 130. **Ciechanover A und Brundin P** (2003) The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*. 40(2):427-446.
 131. **Cell Signaling Technology.** www.cellsignal.com/reference/pathway/Ubiquitin_Proteasome.html. (04. Dezember 2013).
 132. **Kostova Z und 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.
 133. **Pickart CM** (2000) Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci*. 25(11):544-548.
 134. **Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM** (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*. 19(1):94-102.
 135. **Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R** (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*. 386(6624):463-471.
 136. **Adams J** (2003) The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev*. 29, Suppl 1:3-9.
 137. **Glickman MH und Ciechanover A** (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*. 82(2):373-428.
 138. **Szweda PA, Friguet B, Szweda LI** (2002) Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radic Biol Med*. 33(1):29-36.
 139. **Bence NF, Sampat RM, Kopito RR** (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*. 292(5521):1552-1555.

140. **López Salon M, Morelli L, Castaño EM, Soto EF, Pasquini JM** (2000) Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 62(2):302-310.
141. **He C und Klionsky DJ** (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 43:67-93.
142. **Kuang E, Okumura CY, Sheffy-Levin S, Varsano T, Shu VC, Qi J, Niesman IR, Yang HJ, López-Otín C, Yang WY, et al.** (2012) Regulation of ATG4B stability by RNF5 limits basal levels of autophagy and influences susceptibility to bacterial infection. *PLoS Genet.* 8(10):e1003007.
143. **Eskelinen EL und Saftig P** (2009) Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1793(4):664-673.
144. **Martinez-Vicente M und Cuervo AM** (2007) Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol.* 6(4):352-361.
145. **Tan CC, Yu JT, Tan MS, Jiang T, Zhu XC, Tan L** (2013) Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: implications for pathogenesis and therapy. *Neurobiol Aging.* doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.019.
146. **Ahlberg J und Glaumann H** (1985) Uptake--microautophagy--and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, ATP, and inhibitors of proteolysis. *Exp Mol Pathol.* 42(1):78-88.
147. **Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y** (2007) Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells.* 12(2):209-218.
148. **Nice DC, Sato TK, Stromhaug PE, Emr SD, Klionsky DJ** (2002) Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *J Biol Chem.* 277(33):3198-30207.
149. **Majeski AE und Dice JF** (2004) Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(12):2435-2444.
150. **Agarraberes FA und Dice JF** (2001) A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci.* 114(Pt13):2491-2499.
151. **Salvador N, Aguado C, Horst M, Knecht E** (2000) Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J Biol Chem.* 275(35):27447-27456.
152. **Agarraberes FA, Terlecky SR, Dice JF** (1997) An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J Cell Biol.* 137(4):825-834.

-
153. **Singh B, Parsaik AK, Mielke MM, Erwin PJ, Knopman DS, Petersen RC, Roberts RO** (2014) Association of Mediterranean Diet with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis.* 39(2):271-282.
154. **Lourida I, Soni M, Thompson-Coon J, Purandare N, Lang IA, Ukoumunne OC, Llewellyn DJ** (2013) Mediterranean diet, cognitive function, and dementia: a systematic review. *Epidemiology.* 24(4):479-489.
155. **St-Laurent-Thibault C, Arseneault M, Longpré F, Ramassamy C** (2011) Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid- β -induced toxicity. Involvement of the NF- κ B signaling. *Curr Alzheimer Res.* 8(5):543-551.
156. **Grossi C, Ed Dami T, Rigacci S, Stefani M, Luccarini I, Casamenti F** (2012) Employing Alzheimer Disease Animal Models for Translational Research: Focus on Dietary Components. *Neurodegener Dis.* [Epub ahead of print].
157. **Pocernich CB, Lange ML, Sultana R, Butterfield DA** (2011) Nutritional approaches to modulate oxidative stress in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 8(5):452-469.
158. **Kennedy DO und Wightman EL** (2011) Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Adv Nutr.* 2(1):32-50.
159. **Diaz Napal GN, Defagó MT, Valladares GR, Palacios SM** (2010) Response of *Epilachna paenulata* to two flavonoids, pinocembrin and quercetin, in a comparative study. *J Chem Ecol.* 36(8):898-904.
160. **Treutter D** (2005) Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol (Stuttg).* 7(6):581-591.
161. **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.
162. **Scalbert A und Williamson G** (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 130(8S Suppl):2073S-2085S.
163. **Beecher GR** (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr.* 133(10):3248S-3254S.
164. **Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L** (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79(5):727-747.
165. **Marambaud P, Zhao H, Davies P** (2005) Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem.* 280(45):37377-37382.
166. **Ansari MA, Abdul HM, Joshi G, Opii WO, Butterfield DA** (2009) Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta(1-42): relevance to Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem.* 20(4):269-275.

-
167. **Ramesh BN, Rao TS, Prakasam A, Sambamurti K, Rao KS** (2010) Neuronutrition and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 19(4):1123-1139.
168. **Jayasena T, Poljak A, Smythe G, Braidy N, Münch G, Sachdev P** (2013) The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* 12(4):867-883.
169. **Cheng B, Gong H, Xiao H, Petersen RB, Zheng L, Huang K** (2013) Inhibiting toxic aggregation of amyloidogenic proteins: a therapeutic strategy for protein misfolding diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1830(10):4860-4871.
170. **Brenner S** (1974) The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 77:71-91.
171. **Poinar GO** (1983) The natural history of nematodes. *New Jersey: Prentice-Hall Inc.*
172. **Lucius R und Loos-Frank B** (2008) *Biologie der Parasiten.* 2. ed. Berlin: Springer.
173. **Nicholas WL** (1984) *The biology of free-living nematodes.* 2. ed. Oxford : Clarendon Press, 1984.
174. **The C. elegans Sequencing Consortium** (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science.* 282(5396):2012-2018.
175. **Corsi AK** (2006) A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*. *Anal Biochem.* 359(1):1-17.
176. **Altun ZF und Hall DH (eds.)** (2002) Wormatlas. <http://wormatlas.org> (Dezember 2013).
177. **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.
178. **Stiernagle T** (1999) Maintenance of *C. elegans*. In Hope IA (Ed.). *C. elegans: A practical approach.* (S. 51-67). Oxford: Oxford University Press.
179. **Sulston JE und Horvitz HR** (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* 56(1):110-156.
180. **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.
181. **Golden JW und Riddle DL** (1984) The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Dev Biol.* 102(2):368-78.
182. **White JG** (1988) The anatomy. In Wood WB (Ed). *The nematode C. elegans.* (S. 81-122). New York: Cold Spring Harbor.

-
183. **Daigle I und Li C** (1993) Apl-1, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(24):12045-12049.
184. **Hornsten A, Lieberthal J, Fadia S, Malins R, Ha L, Xu X, Daigle I, Markowitz M, O'Connor G, Plasterk R, et al.** (2007) APL-1, a *Caenorhabditis elegans* protein related to the human beta-amyloid precursor protein, is essential for viability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(6):1971-1976.
185. **Tax FE, Thomas JH, Ferguson EL, Horvitz HR** (1997) Identification and characterization of genes that interact with lin-12 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 147:1675-1695.
186. **Smialowska A und Baumeister R** (2006) Presenilin function in *Caenorhabditis elegans*. *Neurodegener Dis.* 3(4-5):227-232.
187. **Saraceno C, Musardo S, Marcello E, Pelucchi S, Luca MD** (2013) Modeling Alzheimer's disease: from past to future. *Front Pharmacol.* doi:10.3389/fphar.2013.00077.
188. **Link CD** (1995) Expression of human β -amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *proc Natl Acad Sci.* 92:9368-9372.
189. **McColl G, Roberts BR, Gunn AP, Perez KA, Tew DJ, Masters CL, Barnham KJ, Cherny RA, Bush AI** (2009) The *Caenorhabditis elegans* A beta 1-42 model of Alzheimer disease predominantly expresses A beta 3-42. *J Biol Chem.* 284(34):22697-22702.
190. **Rebolledo DL, Aldunate R, Kohn R, Neira I, Minniti AN, Inestrosa NC** (2011) Copper reduces A β oligomeric species and ameliorates neuromuscular synaptic defects in a *C. elegans* model of inclusion body myositis. *J Neurosci.* 31(28):10149-10158.
191. **Entchev EV und Kurzchalia TV** (2005) Requirement of sterols in the life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Semin Cell Dev Biol.* 16(2):175-182.
192. **Tata JR** (1976) The expression of the vitellogenin gene. *Cell.* 9(1):1-14.
193. **Baker ME** (1988) Is vitellogenin an ancestor of apolipoprotein B-100 of human low-density lipoprotein and human lipoprotein lipase? *Biochem J.* 225(3):1075-1060.
194. **Blumenthal T, Squire M, Kirtland S, Cane J, Donegan M, Spieth J, Sharrock W** (1984) Cloning of a yolk protein gene family from *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol.* 174(1):1-18.
195. **Grant B und Hirsh D** (1999) Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol Biol Cell.* 10(12):4311-4326.
196. **Rottiers V, Motola DL, Gerisch B, Cummins CL, Nishiwaki K, Mangelsdorf DJ, Antebi A** (2006) Hormonal control of *C. elegans* dauer formation and life span by a Rieske-like oxygenase. *Dev Cell.* 10(4):473-482.

-
197. **Motola DL, Cummins CL, Rottiers V, Sharma KK, Li T, Li Y, Suino-Powell K, Xu HE, Auchus RJ, Antebi A, Mangelsdorf DJ** (2006) Identification of ligands for DAF-12 that govern dauer formation and reproduction in *C. elegans*. *Cell*. 124(6):1209-1223.
 198. **Held JM, White MP, Fisher AL, Gibson BW, Lithgow GJ, Gill MS** (2006) DAF-12-dependent rescue of dauer formation in *Caenorhabditis elegans* by (25S)-cholestenoic acid. *Aging Cell*. 5(4):283-291.
 199. **Beckstead RB und Thummel CS** (2006) Indicted: worms caught using steroids. *Cell*. 124(6):1137-1140.
 200. **Baumeister R, Schaffitzel E, Hertweck M** (2006) Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity. *J Endocrinol*. 190(2):191-202.
 201. **Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G** (1996) A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 382(6591):536-539.
 202. **Paradis S und Ruvkun G** (1998) *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev*. 12(16):2488-2498.
 203. **Wang W und Shakes DC** (1997) Expression patterns and transcript processing of *ftt-1* and *ftt-2*, two *C. elegans* 14-3-3 homologues. *J Mol Biol*. 268(3):619-630.
 204. **Li J, Tewari M, Vidal M, Lee SS** (2007) The 14-3-3 protein FTT-2 regulates DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*. 301(1):82-91.
 205. **Wang Y und Tissenbaum HA** (2006) Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mech Ageing Dev*. 127(1):48-56.
 206. **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.
 207. **Viswanathan M, Kim SK, Berdichevsky A, Guarente L** (2005) A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Dev Cell*. 9(5):605-615.
 208. **Tissenbaum HA und Guarente L** (2001) Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 410(6825):227-230.
 209. **Kirstein-Miles J und 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.
 210. **Heschl MF und Baillie DL** (1989) Characterization of the *hsp70* multigene family of *Caenorhabditis elegans*. *DNA*. 8(4):233-243.

-
211. **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(18):4055-4066.
212. **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.
213. **Bernales S, Soto MM, McCullagh E** (2012) Unfolded protein stress in the endoplasmic reticulum and mitochondria: a role in neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.* doi: 10.3389/fnagi.2012.00005.
214. **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.
215. **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.
216. **Shen X, Ellis RE, Lee K, Liu CY, Yang K, Solomon A, Yoshida H, Morimoto R, Kurnit DM, Mori K, et al.** (2001) Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell.* 107(7):893-903.
217. **Urano F, Calton 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.
218. **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.
219. **Schlesinger MJ und Bond U** (1987) Ubiquitin genes. *Oxf Surv Eukaryot Genes.* 4:77-91.
220. **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.
221. **Piano F, Schetter AJ, Mangone M, Stein L, Kempthues KJ** (2000) RNAi analysis of genes expressed in the ovary of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol.* 10(24):1619-1622.
222. **Gönczy P, Echeverri C, Oegema K, Coulson A, Jones SJ, Copley RR, Duperon J, Oegema J, Brehm M, Cassin E** (2000) Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature.* 408(6810):331-336.
223. **Tijsterman M, Ketting RF, Okihara KL, Sijen T, Plasterk RH** (2002) RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science.* 295(5555):694-697.

-
224. **Kipreos ET** (2005) Ubiquitin-mediated pathways in *C. elegans*. In the *C. elegans* research community (ed). *WormBook*. doi/10.1895/wormbook.1.36.1. <http://www.wormbook.org>.
225. **Coux O** (2003) An interaction map of proteasome subunits. *Biochem Soc Trans*. 31(2):465-469.
226. **Meléndez A und Levine B** (2009) Autophagy in *C. elegans*. In the *C. elegans* research community (Ed.). *WormBook*. doi:10.1895/wormbook.1.147.1. <http://www.wormbook.org>.
227. **Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T** (2001) Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep*. 2(4):330-335.
228. **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.
229. **Florez-McClure ML, Hohsfield LA, Fonte G, Bealor MT, Link CD** (2007) Decreased insulin-receptor signaling promotes the autophagic degradation of beta-amyloid peptide in *C. elegans*. *Autophagy*. 3(6):569-580.
230. **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.
231. **Tommons L, Court DL, Fire A** (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNA can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*. 263:103-112.
232. **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.
233. **Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL** (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 78:761-771.
234. **Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R** (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 286(5440):735-741.
235. **Pereira C, Agostinho P, Moreira PI, Cardoso SM, Oliveira CR** (2005) Alzheimer's disease-associated neurotoxic mechanisms and neuroprotective strategies. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 4(4):383-403.

-
236. **Nath S, Agholme L, Kurudenkandy FR, Granseth B, Marcusson J, Hallbeck M** (2012) Spreading of neurodegenerative pathology via neuron-to-neuron transmission of β -amyloid. *J Neurosci.* 32(26):8767-8777.
237. **Nussbaum JM, Schilling S, Cynis H, Silva A, Swanson E, Wangsanut T, Tayler K, Wiltgen B, Hatami A, Röncke R** (2012) Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β . *Nature.* 485(7400):651-655.
238. **Wirths O, Breyhan H, Cynis H, Schilling S, Demuth HU, Bayer TA** (2009) Intraneuronal pyroglutamate-A β 3-42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathol.* 118(4):487-496.
239. **Becker A, Kohlmann S, Alexandru A, Jagla W, Canneva F, Bäuscher C, Cynis H, Sedlmeier R, Graubner S, Schilling S** (2013) Glutaminyl cyclase-mediated toxicity of pyroglutamate-beta amyloid induces striatal neurodegeneration. *BMC Neurosci.* doi: 10.1186/1471-2202-14-108.
240. **Lublin AL und Link CD** (2013) Alzheimer's disease drug discovery: in vivo screening using *Caenorhabditis elegans* as a model for β -amyloid peptide-induced toxicity. *Drug Discov Today Technol.* 10(1):e115-119.
241. **Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al.** (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 43(8):1467-1472.
242. **Dartigues JF und Letenneur L** (2000) Genetic epidemiology of Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurol.* 13(4):385-389.
243. **Sing CF und Davignon J** (1985) Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet.* 37(2):268-285.
244. **Pappolla MA, Bryant-Thomas TK, Herbert D, Pacheco J, Fabra Garcia M, Manjon M, Girones X, Henry TL, Matsubara E, Zambon D** (2003) Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology.* 61(2):199-205.
245. **Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K** (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(11):6460-6464.
246. **Schneider A, Schulz-Schaeffer W, Hartmann T, Schulz JB, Simons M** (2006) Cholesterol depletion reduces aggregation of amyloid-beta peptide in hippocampal neurons. *Neurobiol Dis.* 23(3):573-577.

-
247. **Fischer M, Regitz C, Kull R, Boll M, Wenzel U** (2013) Vitellogenins increase stress resistance of *Caenorhabditis elegans* after *Photobacterium luminescens* infection depending on the steroid-signaling pathway. *Microbes Infect.* 15(8-9): 569-578.
248. **Warren MW, Hynan LS, Weiner MF** (2012) Lipids and adipokines as risk factors for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 29(1):151-157.
249. **Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA** (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis.* 7(4):321-331.
250. **Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM** (2003) Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci.* 6(4):345-351.
251. **Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F** (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha - secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(10):5815-5820.
252. **Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM** (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res.* 74(3):342-352.
253. **Grimm MO, Grimm HS, Tomic I, Beyreuther K, Hartmann T, Bergmann C** (2008) Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J Biol Chem.* 283(17):11302-11311.
254. **Liu WW, Todd S, Coulson DT, Irvine GB, Passmore AP, McGuinness B, McConville M, Craig D, Johnston JA** (2009) A novel reciprocal and biphasic relationship between membrane cholesterol and beta-secretase activity in SH-SY5Y cells and in human platelets. *J Neurochem.* 108(2):341-349.
255. **Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue LF, Beach TG, Sue LI, Wolfe J, Xu H, Stanimirovic DB, et al.** (2008) Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol Dis.* 29(3):422-437.
256. **Racchi M, Baetta R, Salvietti N, Ianna P, Franceschini G, Paoletti R, Fumagalli R, Govoni S, Trabucchi M, Soma M** (1997) Secretory processing of amyloid precursor protein is inhibited by increase in cellular cholesterol content. *Biochem J.* 322(Pt3):893-898.
257. **Galbete JL, Martin TR, Peressini E, Modena P, Bianchi R, Forloni G** (2000) Cholesterol decreases secretion of the secreted form of amyloid precursor protein by interfering with glycosylation in the protein secretory pathway. *Biochem J.* 348(2):307-313.
258. **Osenkowski P, Ye W, Wang R, Wolfe MS, Selkoe DJ** (2008) Direct and potent regulation of gamma-secretase by its lipid microenvironment. *J Biol Chem.* 283(33):22529-22540.

-
259. **Dhurandhar EJ, Allison DB, van Groen T, Kadish I** (2013) Hunger in the absence of caloric restriction improves cognition and attenuates Alzheimer's disease pathology in a mouse model. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0060437.
260. **Morton DG, Shakes DC, Nugent S, Dichoso D, Wang W, Golden A, Kemphues KJ** (2002) The *Caenorhabditis elegans* par-5 gene encodes a 14-3-3 protein required for cellular asymmetry in the early embryo. *Dev Biol*. 241(1):47-58.
261. **Jones DH, Ley S, Aitken A** (1995) Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett*. 368(1):55-58.
262. **Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gambin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC** (1997) The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*. 91(7):961-971.
263. **Obsil T, Ghirlando R, Klein DC, Ganguly S, Dyda F** (2001) Crystal structure of the 14-3-3 ζ :serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell*. 105(2):257-267.
264. **Wang Y, Oh SW, Deplancke B, Luo J, Walhout AJ, Tissenbaum HA** (2006) *C. elegans* 14-3-3 proteins regulate life span and interact with SIR-2.1 and DAF-16/FOXO. *Mech Ageing Dev*. 127(9):741-747.
265. **Berdichevsky A, Viswanathan M, Horvitz HR, Guarente L** (2006) *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell*. 125(6):1165-1177.
266. **Lin SJ, Defossez PA, Guarente L** (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 289(5487):2126-2128.
267. **Rogina B und Helfand SL** (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(45):15998-16003.
268. **Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, et al.** (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*. 303(5666):2011-2015.
269. **Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W** (2001) Negative control of p53 by Sir2 α promotes cell survival under stress. *Cell*. 107(2):137-148.
270. **Cataldo AM, Hamilton DJ, Barnett JL, Paskevich PA, Nixon RA** (1996) Properties of the endosomal-lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 16(1):186-199.

-
271. **Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK** (2006) Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci.* 26(35):9057-9068.
272. **Viana RJ, Nunes AF, Rodrigues CM** (2012) Endoplasmic reticulum enrollment in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 46(2):522-534.
273. **Virok DP, Simon D, Bozsó Z, Rajkó R, Datki Z, Bálint É, Szegedi V, Janáky T, Penke B, Fülöp L** (2011) Protein array based interactome analysis of amyloid- β indicates an inhibition of protein translation. *J Proteome Res.* 10(4):1538-1547.
274. **Arduino DM, Esteves AR, Silva DF, Martins-Branco D, Santos D, Pimentel DF, Cardoso SM** (2011) Therapeutic intervention at cellular quality control systems in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Curr Pharm Des.* 17(31):3446-3459.
275. **Cohen E, Du D, Joyce D, Kapernick EA, Volovik Y, Kelly JW, Dillin A** (2010) Temporal requirements of insulin/IGF-1 signaling for proteotoxicity protection. *Aging Cell.* 9(2):126-134.
276. **Alavez S, Vantipalli MC, Zucker DJ, Klang IM, Lithgow GJ** (2011) Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan. *Nature.* 472(7342):226-229.
277. **Di Carlo M** (2010) Beta amyloid peptide: from different aggregation forms to the activation of different biochemical pathways. *Eur Biophys J.* 39(6):877-888.
278. **Dobson CM** (2003) Protein folding and misfolding. *Nature.* 426(6968):884-890.
279. **Evans CG, Wisén S, Gestwicki JE** (2006) Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1-42) aggregation in vitro. *J Biol Chem.* 281(44):33182-33191.
280. **Imaizumi K, Miyoshi K, Katayama T, Yoneda T, Taniguchi M, Kudo T, Tohyama M** (2001) The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1536(2-3):85-96.
281. **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.
282. **Harding HP, Calfon M, Urano F, Novoa I, Ron D** (2002) Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:575-599.
283. **Brodsky JL und Skach WR** (2011) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Curr Opin Cell Biol.* 23(4):464-475.

-
284. **Dennissen FJ, Kholod N, van Leeuwen FW** (2012) The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: culprit, accomplice or victim? *Prog Neurobiol.* 96(2):190-207.
285. **Huang Q, Wang H, Perry SW, Figueiredo-Pereira ME** (2013) Negative regulation of 26S proteasome stability via calpain-mediated cleavage of Rpn10 subunit upon mitochondrial dysfunction in neurons. *J Biol Chem.* 288(17):12161-12174.
286. **Klionsky DJ** (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(11):931-937.
287. **Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ** (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 451(7182):1069-1075.
288. **Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO** (2005) Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol.* 171(1):87-98.
289. **Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, Nixon RA** (2008) Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 28(27):6926-6937.
290. **Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P** (2008) Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie.* 90(2):313-323.
291. **Rubinsztein DC, DiFiglia M, Heintz N, Nixon RA, Qin ZH, Ravikumar B, Stefanis L, Tolkovsky A** (2005) Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy.* 1(11):11-22.
292. **Jaeger PA, Pickford F, Sun CH, Lucin KM, Masliah E, Wyss-Coray T** (2010) Regulation of amyloid precursor protein processing by the Beclin 1 complex. *PLoS One.* doi:0.1371/journal.pone.0011102.
293. **Virmani A, Pinto L, Binienda Z, Ali S** (2013) Food, nutrigenomics, and neurodegeneration--neuroprotection by what you eat! *Mol Neurobiol.* 48(2):353-362.
294. **Pasinetti GM, Wang J, Porter S, Ho L** (2011) Caloric intake, dietary lifestyles, macronutrient composition, and alzheimer' disease dementia. *Int J Alzheimers Dis.* doi:10.4061/2011/806293.
295. **Paganga G, Miller N, Rice-Evans CA** (1999) The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free Radic Res.* 30(2):153-162.

-
296. **Potapovich AI, Lulli D, Fidanza P, Kostyuk VA, De Luca C, Pastore S, Korkina LG** (2011) Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NF κ B and AhR and EGFR-ERK pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 255(2):138-149.
297. **Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB** (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res.* 22(4):375-383.
298. **Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R** (2007) Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med.* 43(5):658-677.
299. **Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF** (1994) Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 36(5):747-751.
300. **Heo HJ und Lee CY** (2004) Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *J Agric Food Chem.* 52(25):7514-7517.
301. **Buettner GR** (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys.* 300(2):535-543.
302. **Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, et al.** (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 425(6954):191-196.
303. **Pietsch K, Saul N, Menzel R, Stürzenbaum SR, Steinberg CE** (2009) Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology.* 10(5):565-578.
304. **Murakami A** (2013) Modulation of protein quality control systems by food phytochemicals. *J Clin Biochem Nutr.* 52(3):215-227.
305. **Hosokawa N, Hirayoshi K, Nakai A, Hosokawa Y, Marui N, Yoshida M, Sakai T, Nishino H, Aoike A, Kawai K, et al.** (1990) Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct Funct.* 15(6):393-401.
306. **Schaffer S, Asseburg H, Kuntz S, Muller WE, Eckert GP** (2012) Effects of polyphenols on brain ageing and Alzheimer's disease: focus on mitochondria. *Mol Neurobiol.* 46(1):161-178.
307. **Lu J, Wu DM, Zheng YL, Hu B, Cheng W, Zhang ZF** (2012) Purple sweet potato color attenuates domoic acid-induced cognitive deficits by promoting estrogen receptor- α -mediated mitochondrial biogenesis signaling in mice. *Free Radic Biol Med.* 52(3):646-659.

-
308. **Rebrin I, Zicker S, Wedekind KJ, Paetau-Robinson I, Packer L, Sohal RS** (2005) Effect of antioxidant-enriched diets on glutathione redox status in tissue homogenates and mitochondria of the senescence-accelerated mouse. *Free Radic Biol Med.* 39(4):549-557.
309. **Sun X, Huo X, Luo T, Li M, Yin Y, Jiang Y** (2011) The anticancer flavonoid chrysin induces the unfolded protein response in hepatoma cells. *J Cell Mol Med.* 15(11):2389-2398.
310. **Liu BQ, Gao YY, Niu XF, Xie JS, Meng X, Guan Y, Wang HQ** (2009) Implication of unfolded protein response in resveratrol-induced inhibition of K562 cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 391(1):778-782.
311. **Giorgi C, De Stefani D, Bononi A, Rizzuto R, Pinton P** (2009) Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(10):1817-1827.
312. **Beller M, Thiel K, Thul PJ, Jäckle H** (2010) Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. *FEBS Lett.* 584(11):2176-21-2182.
313. **Franzini-Armstrong C** (2007) ER-mitochondria communication. How privileged? *Physiology.* 22:261-268.
314. **Hori O, Ichinoda F, Tamatani T, Yamaguchi A, Sato N, Ozawa K, Kitao Y, Miyazaki M, Harding HP, Ron D, et al.** (2002) Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease. *J Cell Biol.* 157(7):1151-1160.
315. **Sun FC, Wei S, Li CW, Chang YS, Chao CC, Lai YK** (2006) Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response. *Biochem J.* 396(1):31-39.
316. **Yoshida H** (2007) ER stress and diseases. *FEBS J.* 274(3):630-658.
317. **Burkart A, Shi X, Chouinard M, Corvera S** (2011) Adenylate kinase 2 links mitochondrial energy metabolism to the induction of the unfolded protein response. *J Biol Chem.* 286(6):4081-4089.
318. **Koh EH, Park JY, Park HS, Jeon MJ, Ryu JW, Kim M, Kim SY, Kim MS, Kim SW, Park IS, et al.** (2007) Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes.* 56(12):2973-2981.
319. **Queen BL und Tollefsbol TO** (2010) Polyphenols and aging. *Curr Aging Sci.* 3(1):34-42.
320. **Shukla Y** (2007) Tea and cancer chemoprevention: a comprehensive review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 8(2):155-166.
321. **Shen M, Chan TH, Dou QP** (2012) Targeting tumor ubiquitin-proteasome pathway with polyphenols for chemosensitization. *Anticancer Agents Med Chem.* 12(8):891-901.

-
322. **Zhang H, Smolen GA, Palmer R, Christoforou A, van den Heuvel S, Haber DA** (2004) SUMO modification is required for in vivo Hox gene regulation by the *Caenorhabditis elegans* Polycomb group protein SOP-2. *Nat Genet.* 36(5):507-511.
323. **Jones D, Crowe E, Stevens TA, Candido EP** (2002) Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: ubiquitin-conjugating enzymes, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins. *Genome Biol.* 3(1):RESEARCH0002.
324. **Jeong JH, An JY, Kwon YT, Li LY, Lee YJ** (2008) Quercetin-induced ubiquitination and down-regulation of Her-2/neu. *J Cell Biochem.* 105(2):585-595.
325. **Dilova I, Easlon E, Lin SJ** (2007) Calorie restriction and the nutrient sensing signaling pathways. *Cell Mol Life Sci.* 64(6):752-767.
326. **Sengupta A, Molkentin JD, Yutzey KE** (2009) FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 284(41):28319-28331.
327. **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.
328. **Psahoulia FH, Moumtzi 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.
329. **Oeste CL, Seco E, Patton WF, Boya P, Pérez-Sala D** (2013) Interactions between autophagic and endo-lysosomal markers in endothelial cells. *Histochem Cell Biol.* 139(5):659-670.
330. **Wenzel U und Daniel H** (2004) Early and late apoptosis events in human transformed and non-transformed colonocytes are independent on intracellular acidification. *Cell Physiol Biochem.* 14(1-2):65-76.
331. **Trincheri NF, Nicotra G, Follo C, Castino R, Isidoro C** (2007) Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D. *Carcinogenesis.* 28(5):922-931.
332. **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.
333. **Takiff HE, Chen SM, Court DL** (1989) Genetic analysis of the rnc operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 171(5):2581-2590.

9 ANHANG: MATERIAL UND METHODEN

9.1 Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 9-1 aufgelistet und wurden von Duran Group GmbH (Werthheim/Main, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Brand GmbH (Werthheim, Deutschland), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland), Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA), Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland) und Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland) bezogen.

Tabelle 9-1 Verbrauchsmaterialien mit Hersteller

Materialien	Hersteller
Bechergläser	Duran
Deckel für 2 ml Schraubdeckelgefäße	Carl Roth
Deckgläser (24x50 mm)	Carl Roth
Edelstahlskalpell	Carl Roth
Erlenmeyerkolben	Duran
Impföse	Carl Roth
Laborflaschen mit Schraubverschluss	Duran
Messzylinder	Brand
Mikortiterplatten (96 Well, 384 Well)	Greiner Bio-One
Multi-Well-Platten (24 Well, 96 Well)	Greiner Bio-One
Objektträger (25x75 mm)	Carl Roth
Parafilm® M	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten (150 mm)	Carl Roth
Petrischalen	Carl Roth
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Precellys Keramik-Kügelchen 1,44 mm	Peqlab
Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Rotilabo®-Aluminiumfolie	Carl Roth
Rotilabo®-Cryoboxen	Carl Roth
Rotilabo®-Einmalküvetten Halbmikro (1,5 ml)	Carl Roth
Schraubdeckelgefäße (2 ml)	Peqlab
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt
Zahnstocher	Carl Roth

Zellkulturröhrchen	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt

9.2 Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Geräte mit Hersteller sind in Tabelle 9-2 aufgeführt.

Tabelle 9-2 Verwendete Geräte mit Hersteller

Geräte	Hersteller
Autoclav Systec DB23	Systec (Wettenberg, D)
Biophotometer Plus	Eppendorf (Hamburg, D)
Fluoreszenzmikroskop EVOS fl Colour	AMG (Bothell, USA)
Fluoroskan Ascent FL	Thermo Scientific (Bornheim, D)
Inkubator	WTB Binder (Tuttlingen, D)
Kaltlichtquelle KL200	Schott AG (Mainz, D)
Kühlzentrifuge Universal 320 R	Hettich (Tuttlingen, D)
pH-Meter	Schott Instruments (Mainz, D)
Pipettus®	Hirschmann (Eberstadt, D)
Präzisionswaage	Kern & Sohn (Balingen, D)
Schüttler unimax 1010	Heidolph (Hamburg, D)
Seriodosierer 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)
Thermoschrank	Lovibond (Dortmund, D)
Zentrifuge Universal 320R	Hettich (Tuttlingen, D)
Überkopfschüttler (intelli-mixer)	neoLab (Heidelberg, D)
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin electronic (Berlin, D)
Vakuumpumpe	neoLab (Heidelberg, D)
Variopipetten 2, 10, 20, 100, 200, 100 µl	Gilson (Bad Camberg, D)
Vortexer mixer REAX control	Heidolph Instruments (Schwabach, D)
Wasserbad	Lauda (Lauda-Königshofen, D)
Zentrifuge Mikro 120	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, D)

9.3 RNAi-Klone

Des Weiteren sind in Tabelle 9-3 die verwendeten RNAi-Klone genannt. Sie wurden von Source BioScience – Lifesciences, UK und Thermo Fischer Scientific bezogen. *Abu-11* wurde wie beschrieben hergestellt [332].

Tabelle 9-3 Verwendete RNAi-Klone

Bezeichnung	Cosmidname	Beschreibung
<i>abu-1</i>	AC3.3	<i>activated in blocked unfolded protein response</i>
<i>abu-11*</i>	T01D1.6	<i>activated in blocked unfolded protein response</i>
<i>bec-1</i>	T19E7.3	<i>Beclin (human autophagy) homolog</i>
<i>daf-9</i>	T13C5.1	<i>abnormal dauer formation</i>
<i>daf-12</i>	F11A1.3	<i>abnormal dauer formation</i>
<i>daf-16</i>	R13H8.1	<i>abnormal dauer formation</i>
<i>dve-1</i>	ZK1193.5	<i>defective proventriculus in Drosophila homolog</i>
<i>ftt-2</i>	F52D10.3	<i>Fourteen-Three-Three family</i>
<i>hsp-6</i>	C37H5.8	<i>heat shock protein</i>
<i>hsp-60</i>	Y22D7AL.5	<i>heat shock protein</i>
<i>lmp-2</i>	C05D9.2	<i>LAMP (lysosome-associated membrane rotein) homolog</i>
<i>par-5</i>	M117.2	<i>abnormal embryonic PARtitioning of cytoplasm</i>
<i>sir-2.1</i>	R11A8.4	<i>yeast SIR related</i>
<i>uba-1</i>	C47E12.5	<i>human ubiquitin related</i>
<i>ubl-5</i>	F46F11.4	<i>ubiquitin-like family</i>
<i>ubq-1</i>	F25B5.4	<i>UBiQuitin</i>
<i>unc-46</i>	C04F5.3	<i>UNCoordinated</i>
<i>vit-6</i>	K07H8.6	<i>VITellogenin structural genes (yolk protein genes)</i>
<i>xbp-1</i>	R74.3	<i>x-box binding protein homolog</i>

9.4 Software

Die in dieser Arbeit eingesetzte Software mit Hersteller ist in Tabelle 9-4 aufgeführt.

Tabelle 9-4 Verwendete Software mit Hersteller

Software	Hersteller
Ascent Software für Fluoroskan 2.6	Thermo Labsystems (Bornheim, D)
GraphPad Prism 5	Graph Pad Software (San Diego, USA)
Image J 1.41	National Institute of Health (Bethesda, USA)

9.5 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien sowie deren Hersteller und die Bestellnummer sind in Tabelle 9-5 aufgeführt.

Tabelle 9-5 Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Bestellnummer und Hersteller

Produkt	Bestell Nr.	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	6908.2	Carl Roth
2x YT-Medium	X966.2	Carl Roth
Adenosin-5-triphosphat Dinatriumsalz (ATP)	HN38.2	Carl Roth
Agar Agar SERVA Kobe I	11392	Serva Electrophoresis
Albumin aus Rinderserum (BSA)	A2153	Sigma-Aldrich
Ampicillin Natriumsalz	K029.1	Carl Roth
L(+)-Ascorbinsäure	3525.1	Carl Roth
Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat	500-0006	Bio-Rad
Calciumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	5239.2	Carl Roth
Carbenicillin Dinatriumsalz	A1491	AppliChem
Chloroquin Diphosphat	C6628	Sigma
Cholesterol	C8667	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid, DMSO ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)	4720.2	Carl Roth
di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	P749.2	Carl Roth
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	P030.1	Carl Roth
Ethanol (> 99.5%)	5054.3	Carl Roth
Ethanol 70% vergällt	T913.3	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	CN06.1	Carl Roth
Glycerin	3783.1	Carl Roth
HEPES	9105.3	Carl Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	2316.4	Carl Roth

Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	3904.1	Carl Roth
Levamisol Hydrochlorid	31742	Fluka
LysoTracker® Red DND-99	S7020	Life Technologies
Magnesiumchloride Hexahydrat (MgCl ₂ · 6 H ₂ O)	2189.2	Carl Roth
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ · 7 H ₂ O)	P027.2	Carl Roth
MG-132	474790	Calbiochem
MitoTracker® Red CM-H ₂ XRos	M7513	Life Technologies
Natriumchlorid (NaCl)	3957.1	Carl Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	6771.1	Carl Roth
Natriumhypochlorid-Lösung (NaClO in H ₂ O, 12% Cl)	9062.3	Carl Roth
Nystatin Suspension	N1638	Sigma
Pepton aus Casein	111931	Merck
ProteoStat® Protein Aggregation Assay	ENZ-51023-KP002	Enzo Life Sciences
Quercetin Dihydrat	Q0125	Sigma-Aldrich
Resveratrol	R5010	Sigma-Aldrich
Suc-LLVY-AMC	S6510	Sigma-Aldrich
Tetracyclin Hydrochlorid	T7660	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	4855.2	Carl Roth
TRIS-Hydrochlorid (TRIS-HCL)	9090.3	Carl Roth
TWEEN®20	P1379	Sigma-Aldrich

9.6 *C. elegans* Stämme

Die in dieser Arbeit herangezogenen *C. elegans* Stämme wurden vom *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC, *University of Minnesota*, St. Paul, MN, USA) bezogen und sind in Tabelle 9-6 aufgeführt.

Tabelle 9-6 Verwendete *C. elegans* Stämme mit Genotyp und Referenz

Stamm	Genotyp / Phänotyp	Referenz
N2	Wildtyp	(170)
CL2006	<i>dvIs2[pCL12(unc-54/human Abeta peptide 1-42 minigene) + pRF4]</i> <i>Adult onset paralysis and egg-laying deficiency when raised at 20°C</i>	(188)

9.7 Bakterienstämme

In Tabelle 9-7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgelistet. Der als RNAi-negativ Kontrolle verwendete *E. coli* HT115 Klon wurde von Source BioScience – Lifesciences, UK bezogen. Die zur Kultivierung dienenden OP50 von CGC (*University of Minnesota*, St. Paul, MN, USA).

Tabelle 9-7 Verwendete *E. coli* Stämme mit Genotyp und Referenz

Stamm	Genotyp	Referenz
OP50	ura-	[170]
<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>	[333]

9.8 Puffer und Lösungen

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Puffer und Lösungen mit ihren Bestandteilen und der entsprechenden Mengenangabe aufgelistet.

Tabelle 9-8 NaCl-Pepton

NaCl-Pepton	
Pepton	2,5 g
NaCl	3 g
H ₂ O	ad 1 l
→ autoklavieren	

Die NaCl-Pepton Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 9-9 M9-Puffer

M9-Puffer	
KH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 999 ml
→ autoklavieren, abkühlen auf 60°C	
MgSO ₄ (1 M)	1 ml

Der fertige M9-Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 9-10 M9:Tween®20 Puffer

M9: TWEEN® 20 Puffer	
M9-Puffer	990 ml
TWEEN® 20	10 ml

Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 9-11 Bleichlösung

Bleichlösung	
NaOH (5 N)	5 ml
NaClO (12 % Cl)	5 ml
H ₂ O	5 ml

Die Bleichlösung wurde vor jedem Egg-Prep immer Frisch angesetzt.

Tabelle 9-12 Ethanol: TWEEN® 20

Ethanol: TWEEN® 20	
Ethanol	92 ml
Tween® 20	8 ml

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

Tabelle 9-13 Einfrierpuffer A

Einfrierpuffer A	
K ₂ HPO ₄	8,7 g
KH ₂ PO ₄	6,8 g
NaCl	2,9 g
H ₂ O	ad 500 ml
→ pH 5,95	
→ autoklavieren	

Nach dem Autoklavieren wurde der Puffer bei 4°C gelagert.

Tabelle 9-14 Einfrierpuffer B

Einfrierpuffer B	
Einfrierpuffer A	700 ml
Glycerol	300 ml

Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

Tabelle 9-15 Lysispuffer

Lysispuffer	
HEPES (pH 7,4)	12 g
NaCl	9 g
EDTA	1,5 g
DTT	0,3 g
H ₂ O	ad 1 l

Der Lysispuffer wurde bei 4 °C gelagert.

Tabelle 9-16 Proteasomaktivitäts-Messpuffer

Proteasomaktivitäts-Messpuffer	
HEPES (pH 7,4)	12 g
NaCl	9 g
EDTA	1,5 g
ATP	2,8 g
H ₂ O	ad 1 l

Der Puffer für die Proteasomaktivitäts-Messung wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 9-17 Stammlösungen

Stammlösungen	Konzentration	Lösungsmittel
Ampicillin [†]	100 mg/ml	50% Ethanol
L(+)-Ascorbinsäure [†]	1 M	M9 Puffer
CaCl ₂ [#]	0,1 M	H ₂ O
CaCl ₂ [#]	1 M	H ₂ O
Carbenicillin [†]	25 mg/ml	50% Ethanol
Chloroquin [†]	10 mM	M9 Puffer
Cholesterol [†]	5 mg/ ml	Ethanol
IPTG [†]	1 M	50% Ethanol
Kanamycin [#]	25 mg/ml	H ₂ O
KH ₂ PO ₄ [#]	1 M	H ₂ O
KOH [#]	5 N	H ₂ O
Levamisol [#]	2 mM	M9 Puffer
LysoTracker® Red DND-99 [†]	1 mM	DMSO
MG-132 [†]	1 mM	DMSO
MgSO ₄ [#]	0,1 M	H ₂ O
MgSO ₄ [#]	1 M	H ₂ O
MitoTracker® Red CM-H ₂ XRos [†]	30 µM	DMSO

NaOH*	5 N	H ₂ O
Quercetin Dihydrat [†]	10 mM	Ethanol:TWEEN ® 20
Resveratrol [†]	10 mM	Ethanol:TWEEN ® 20
Suc-LLVY-AMC [†]	14 mM	DMSO
Tetracyclin [†]	25 mg/ ml	50% Ethanol

Die Stammlösungen wurden bei Raumtemperatur *, bei 4°C [#] oder -20°C [†] gelagert.

9.9 Medien

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Medien mit ihren Bestandteilen und der entsprechenden Mengenangabe aufgelistet.

Tabelle 9-18 2xYT-Agar

2xYT-Agar	
2xYT-Medium	6,2 g
Agar	3 g
H ₂ O	ad 200 ml
→ autoklavieren	
→ Für HT115 Kultivierung:	
Ampicillin (100 mg/ml)	200 µl
Tetracyclin (25 mg/ml)	200 µl

2xYT-Agar Platten wurden für die Kultivierung von OP50 (ohne Antibiotikum) und HT115 *E. coli* Bakterien verwendet. Nach dem Abkühlen des Agar auf unter 60°C wurden die Platten steril gegossen und konnten bei 4°C gelagert werden.

Tabelle 9-19 2xYT-Medium

2xYT-Medium	
2xYT-Medium	31 g
H ₂ O	ad 1 l
→ pH 7,0	
→ autoklavieren	

2xYT-Medium wurde für die Kultivierung von Bakterienkulturen in Flüssigmedium verwendet. Fertiges 2xYT-Medium wurde nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 9-20 *Nematode Growth Medium* (NGM) Agar

<i>Nematode Growth Medium</i> (NGM) Agar	
Agar	17 g
Pepton	2.5 g
NaCl	3 g
H ₂ O	947 ml
→ autoklavieren, abkühlen auf 60°C	
CaCl ₂ (0,1 M)	1 ml
Carbenicillin (25 mg / ml Ethanol)	1 ml
Cholesterol (5 mg / ml Ethanol)	1 ml
KH ₂ PO ₄ (1 M, pH 6,0)	25 ml
MgSO ₄ (0,1 M)	1 ml
Nystatinsuspension	25 ml

NGM-Agar wurde für die Kultivierung der *C. elegans* Stämme verwendet. Die Platten wurden unter sterilen Bedingungen gegossen und bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 9-21 Flüssig-NGM

Flüssig-NGM	
CaCl ₂ (0,1 M)	10 µl
Cholesterol (5 mg/ml)	10 µl
KH ₂ PO ₄ (1 M, pH 6,0)	250 µl
MgSO ₄ (0,1 M)	10 µl
NaCl-Pepton	9.71 ml
Carbenicillin (25 mg/ml)	10 µl
→ für RNAi Experimente	
Kanamycin (25 mg/ml) anstatt Carbenicillin	20 µl

Flüssig-NGM wurde für die Durchführung von *C. elegans* Versuchen verwendet. Für RNAi-Versuche wurde anstatt des Carbenicillins Kanamycin eingesetzt um die entsprechenden *E. coli* Bakterien zu inaktivieren. Das NGM wurde vor jedem Versuchsansatz frisch zubereitet.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die durch ihre Unterstützung diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Uwe Wenzel für die Übertragung des spannenden Themas sowie die Bereitstellung der ausgezeichneten Forschungsmöglichkeiten. Seine fachliche Unterstützung ebenso wie die jederzeit konstruktiven Gespräche und Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein Dank geht an alle Mitarbeiter des Lehrstuhls für Molekulare Ernährungsforschung für vier unvergessliche Jahre, die mich nicht nur fachlich, sondern vor allem menschlich geprägt haben. Ein großer Dank geht an Dorothe Deusing, ohne die diese Arbeit voller falsch gesetzter Kommas wäre und die mir darüber hinaus immer mit einem offenen Ohr und voller guter Taten zur Seite stand. Ich bedanke mich bei Dr. Elena Fitzenberger für die Durchsicht der Manuskripte vorallem aber für die außerordentliche fachliche und freundschaftliche Unterstützung. Ebenfalls danke ich Stefanie Grünwald dafür, dass sie in den letzten drei Jahren alle Höhen und Tiefen, die eine Doktorarbeit mit sich bringt, mit mir durchschritten ist. Ein großer Dank gilt Eva Czynski für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die tatkräftige Unterstützung im Labor. Weiterhin danke ich meinen fleißigen Studentinnen Lisa Dußling und Friederike Mahn.

Ebenso danke ich meinen Freunden für die mutmachenden Gespräche, die Ablenkungen und das entgegengebrachte Verständnis. Ein ganz besonderer Dank geht an Mareike Kahl für die Korrektur dieser Arbeit, aber eigentlich dafür, dass sie in jeder Lebenslage für mich da ist, mich immer unterstützt und einfach immer die richtigen Worte findet.

Der größte Dank geht an meine Familie, für den uneingeschränkten Rückhalt und die moralische Unterstützung. Ohne euch wäre ich heute nicht die, die ich bin und wäre nicht da wo ich bin! Danke!

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Textstellen 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, 30.01.2014

Unterschrift: _____