

Institut für Ernährungswissenschaft
Fachbereich 09 – Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie
Fachbereich 08 – Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

**Untersuchungen zur nutritiven Prävention
der Neurodegeneration –
Wirkungen von Trauben- und Olivenpolyphenolen
auf die mitochondriale und kognitive Dysfunktion
bei der Gehirnalterung und Alzheimer-Erkrankung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Heike Asseburg

angefertigt am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Gießen 2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Gunter P. Eckert
2. Gutachter: Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn

„The idea is to die young as late as possible.”

Ashley Montagu

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abbildungsverzeichnis	iv
III. Tabellenverzeichnis	vii
IV. Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Gehirnalterung und Neurodegeneration	1
1.1.1 Alterung und Funktionsverluste im Gehirn.....	2
1.1.2 Alzheimer-Erkrankung (AD)	8
1.2 Mitochondriale Funktion als Schlüsselfaktor bei der Alterung und AD	13
1.2.1 Morphologie, Funktion und Dynamik von Mitochondrien	13
1.2.2 Mitochondriale Dysfunktion bei der Alterung und AD	21
1.3 Nutritive Prävention der Gehirnalterung und Neurodegeneration.....	27
1.3.1 Mediterrane Ernährungsweise	27
1.3.2 Strukturen, Vorkommen und Aufnahme von Polyphenolen	29
1.3.3 Traubenzpolyphenole	33
1.3.4 Olivenpolyphenole	36
1.3.5 Metabolismus und Bioverfügbarkeit von Polyphenolen	38
1.3.6 Verfügbarkeit von Polyphenolen im Gehirn	47
1.3.7 Neuroprotektion und Hormesis	54
2 Zielsetzung.....	59
3 Material und Methoden	61
3.1 Materialien	61
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	61
3.1.2 Chemikalien.....	63
3.1.3 Primer für die quantitative real-time PCR.....	66
3.1.4 Puffer, Lösungen, Medien	67
3.1.5 Kits	71
3.1.6 Testsubstanzen.....	71
3.1.7 Zelllinien	72
3.1.8 Mauslinien	73
3.2 Methoden	74
3.2.1 Zellkultur	74
3.2.2 Zellinkubation	76

3.2.3	Zellernte	81
3.2.4	Tierhaltung und -studiendesigns	81
3.2.5	Genotypisierung von Thy-1-APP-transgenen Mäusen	88
3.2.6	Verhaltenstests	89
3.2.7	Environmental Enrichment	95
3.2.8	Isolation von Mitochondrien aus Gehirngewebe	96
3.2.9	Herstellung dissoziierter Hirnzellen	96
3.2.10	Quantitative real-time PCR.....	97
3.2.11	Messung des mitochondrialen Membranpotenzials.....	99
3.2.12	Messung der ATP-Konzentration	99
3.2.13	Respiratorische Messung (Oxygraph-2k)	100
3.2.14	Messung der Citratsynthase-Aktivität	101
3.2.15	Bestimmung des Proteincarbonylgehalts.....	102
3.2.16	Bestimmung des Proteingehalts	103
3.2.17	Statistische Auswertung.....	103
4	Ergebnisse	104
4.1	ExGrape Traubenextrakte und Olivenpolyphenole im Zellmodell	104
4.1.1	ExGrape Acy in PC12 _{neo} - und HepG2-Zellen	104
4.1.2	Hydroxytyrosol und ExGrape Acy-Kombination in PC12 _{neo} -Zellen	109
4.1.3	ExGrape Acy, Res und Hytolive in PC12 _{neo} - und PC12 _{sw} -Zellen.....	114
4.2	ExGrape Acy zur Prävention der Alterung im C57BL/6J-Mausmodell	124
4.2.1	Kurzzeitstudie	124
4.2.2	Langzeitstudie	127
4.2.3	Lebenszeitstudie.....	136
4.3	ExGrape und Olivenpolyphenole zur Prävention der Gehirnalterung	143
4.3.1	ExGrape Acy und Hydroxytyrosol in C57BL/6J-Mäusen.....	143
4.3.2	ExGrape Res, Hytolive und Enrichment in NMRI-Mäusen	148
4.4	ExGrape Traubenextrakt und Olivenpolyphenole zur AD-Prävention	162
4.4.1	ExGrape Res, Hytolive und Enrichment im Thy-1-APP-Modell.....	162
5	Diskussion	171
5.1	Mitochondriale Dysfunktion im Zellmodell PC12	171
5.2	Mitochondriale Dysfunktion im Mausmodell.....	173
5.2.1	C57BL/6J-Mäuse	173
5.2.2	NMRI-Mäuse	178

5.2.3	AD-Modell Thy-1-APP	180
5.3	Kognitive Dysfunktion im Mausmodell	182
5.3.1	Studien zur kognitiven Alterung	182
5.3.2	Studien im AD-Modell Thy-1-APP	185
5.4	Effekte der ExGrape Traubenextrakte auf die Alterung.....	187
5.4.1	Mitochondriale Dysfunktion im Zellmodell PC12.....	188
5.4.2	Genexpression im Mausmodell C57BL/6J.....	193
5.4.3	Mitochondriale Dysfunktion im Mausmodell C57BL/6J.....	198
5.4.4	Gedächtnisleistung und Motorik während der Alterung im Mausmodell C57BL/6J.....	203
5.4.5	Lebensspanne im Mausmodell C57BL/6J.....	208
5.4.6	Übertragung auf den Menschen	212
5.5	Effekte von Olivenpolyphenolen auf die Gehirnalterung.....	214
5.5.1	Mitochondriale Funktionen im Zellmodell PC12	214
5.5.2	Hydroxytyrosol im Mausmodell C57BL/6J	218
5.5.3	Übertragung auf den Menschen	221
5.6	Effekte von Trauben- und Olivenpolyphenolen (TOP) im AD-Modell	222
5.7	Effekte multipler Anregungsansätze bei der Gehirnalterung und AD.....	224
5.7.1	Kombination aus TOP	225
5.7.2	Kombination aus TOP mit zusätzlicher Stimulierung.....	229
5.7.3	Übertragung auf den Menschen	235
5.8	Schlussfolgerungen und Ausblick	237
6	Zusammenfassung	240
7	Summary	243
8	Literaturverzeichnis	246
	Danksagung.....	293
	Veröffentlichte Original- und Übersichtsarbeiten	295
	Erklärung	296

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Primär von der kognitiven Alterung betroffene Bereiche.....	5
Abb. 1.2: Primär von der AD betroffene Bereiche und ihre Progression	9
Abb 1.3: Schematische Darstellung eines Mitochondriums und der oxidativen Phosphorylierung.	16
Abb. 1.4: Postulierte Mechanismen der mitochondrialen Dysfunktion bei der Alterung und Progression zur AD.....	26
Abb. 1.5: Einteilung und Strukturen der Polyphenole.	30
Abb. 1.6: Strukturen der Polyphenole in Trauben und Rotwein.....	34
Abb. 1.7: Phenolstrukturen in Oliven und Olivenöl.	37
Abb. 1.8: Degradation von Anthocyanen bei neutralem pH oder Mikrobiota-Einfluss.	41
Abb. 1.9: Mögliche Abbaumechanismen von Procyanidinen durch die Mikrobiota.....	43
Abb. 1.10: Postulierter Metabolismus von Hydroxytyrosol.	46
Abb. 1.11: Vorgeschlagene Absorptions- und Metabolisierungsvorgänge von TOP.....	48
Abb. 1.12: Postulierte Mechanismen zur Neuroprotektion über Hormesis.	57
Abb. 3.1: Tierstudien-Design der Langzeitstudien.	83
Abb. 3.2: Aufbau der Y-Maze Tests.	90
Abb 3.3:Aufbau des Social Recognition Tests.	91
Abb. 3.4: Aufbau des Passive Avoidance Tests.....	92
Abb. 3.5: Aufbau des Rotarod Tests.	93
Abb 3.6: Bewertungsskala für den Nesting Test.....	94
Abb. 3.7: Environmental Enrichment im Vergleich zur normalen Käfighaltung	95
Abb. 3.8: Beispiel einer respiratorischen Messung (Oxygraph-2k) mit isolierten Hirnmitochondrien.	101
Abb. 4.1: MMP in PC12 _{neo} -Zellen nach Acy-Inkubation.	105
Abb. 4.2: ATP-Konzentration in PC12 _{neo} -Zellen nach Acy-Inkubation.....	106
Abb. 4.3: Zellzahl-normierte mitochondriale Atmung und CS in PC12 _{neo} -Zellen nach Acy-Inkubation.....	107
Abb. 4.4: ATP-Konzentration in HepG2-Zellen nach Acy-Inkubation.....	109
Abb. 4.5: Zellzahl-normierte mitochondriale Atmung und CS in PC12 _{neo} -Zellen nach Hy-Inkubation.....	112
Abb. 4.6: Proteincarbonylgehalt in PC12 _{neo} -Zellen.	114
Abb. 4.7: MMP in PC12 _{neo} -Zellen nach Res-Inkubation.....	115

Abb. 4.8: ATP-Konzentration in PC12 _{neo} -Zellen nach Res-Inkubation.....	116
Abb. 4.9: MMP in PC12 _{sw} -Zellen nach Acy-Inkubation.	118
Abb. 4.10: ATP-Konzentration in PC12 _{sw} -Zellen nach Acy-Inkubation.	119
Abb. 4.11: MMP in PC12 _{sw} -Zellen nach Res-Inkubation.	119
Abb. 4.12: ATP-Konzentration in PC12 _{sw} -Zellen nach Res-Inkubation.....	120
Abb. 4.13. MMP in PC12 _{sw} -Zellen nach Res+Ol-Inkubation.	122
Abb. 4.14: ATP-Konzentration in PC12 _{sw} -Zellen nach Res+Ol-Inkubation.	123
Abb. 4.15: MMP und ATP-Konzentrationen in dissoziierten Hirnzellen der C57BL/6J- Mäuse nach 3-wöchiger Acy-Verabreichung.	125
Abb. 4.16: CS und CS-normierte mitochondriale Atmung isolierter Hirnmitochondrien der C57BL/6J-Mäuse nach 3-wöchiger Acy-Verabreichung.	126
Abb. 4.17: Überlebensraten und Gewichtsverlauf der C57BL/6J-Mäuse über die 6-monatige Fütterung mit Acy und HBE.	128
Abb 4.18.: mRNA-Expression von SIRT1 und SIRT3 im Hirn- und Leberhomogenat der C57BL/6J-Mäuse nach 6-monatiger Acy-Fütterung.	130
Abb. 4.19: MMP und ATP-Konzentrationen in dissoziierten Hirnzellen der C57BL/6J- Mäuse nach 6-monatiger Fütterung mit Acy und HBE.	131
Abb. 4.20: CS und CS-normierte mitochondriale Atmung isolierter Hirnmitochondrien der C57BL/6J-Mäuse nach 6-monatiger Fütterung mit Acy und HBE.	132
Abb. 4.21: Step-through latency im Passive Avoidance Test mit C57BL/6J-Mäusen nach 6-monatiger Fütterung mit Acy und HBE.	135
Abb. 4.22: Gewichtsverlauf der C57BL/6J-Mäuse in der Acy-Lebenszeitstudie.	137
Abb. 4.23: Motorische Leistung (Latency to fall) im Rotarod Test mit C57BL/6J-Mäusen in der Acy-Lebenszeitstudie.	138
Abb. 4.24: Step-through latency im Passive Avoidance Test mit C57BL/6J-Mäusen in der Acy-Lebenszeitstudie.	139
Abb. 4.25: Überlebensraten der C57BL/6J-Mäuse in der Acy-Lebenszeitstudie.	142
Abb. 4.26: Überlebensraten und Gewichtsverlauf der C57BL/6J-Mäuse über die 6- monatige Fütterung mit Hy und Acy+Hy.	144
Abb. 4.27: MMP und ATP-Konzentrationen in dissoziierten Hirnzellen der C57BL/6J- Mäusen nach 6-monatiger Fütterung mit Hy und Acy+Hy.	145
Abb. 4.28: CS und CS-normierte mitochondriale Atmung isolierter Hirnmitochondrien der C57BL/6J-Mäusen nach 6-monatiger Fütterung mit Hy und Acy+Hy.	146

Abb. 4.29: Step-through latency im Passive Avoidance Test mit C57BL/6J-Mäusen nach 6-monatiger Fütterung mit Hy und Acy+Hy.....	148
Abb. 4.30: Überlebensraten der NMRI-Mäuse über die 6-monatige Interventionsperiode mit RO und ROEn.....	150
Abb. 4.31: Gewichtsverlauf der NMRI-Mäuse über die 6-monatige Interventionsperiode mit RO und ROEn.....	150
Abb. 4.32: mRNA-Expression von Komplex I und IV im Hirnhomogenat der NMRI- Mäuse nach 6-monatiger Interventionsperiode mit RO und ROEn.....	151
Abb. 4.33: mRNA-Expression von PGC1 α , CREB, BDNF und Synaptophysin 1 im Hirnhomogenat der NMRI-Mäuse nach 6-monatiger Interventionsperiode mit RO.... und ROEn.....	152
Abb. 4.34: mRNA-Expression Nrf1 und Tfam im Hirnhomogenat der NMRI-Mäuse nach 6-monatiger Interventionsperiode mit RO und ROEn.....	153
Abb. 4.35: mRNA-Expression von AMPK, SIRT1 und SIRT3 im Hirnhomogenat der NMRI-Mäuse nach 6-monatiger Interventionsperiode mit RO und ROEn.....	153
Abb. 4.36: MMP und ATP-Konzentrationen in dissoziierten Hirnzellen der NMRI-Mäuse nach 6-monatiger Interventionsperiode mit RO und ROEn.....	155
Abb. 4.37: Protein-normierte mitochondriale Atmung und CS isolierter Hirnmitochondrien der NMRI-Mäuse nach 6-monatiger Interventionsperiode mit RO und ROEn.....	156
Abb. 4.38: Motorische Leistung von NMRI-Mäusen über die 6-monatige Interventions- periode mit RO und ROEn.....	158
Abb. 4.39: Gedächtnisleistung im Y-Maze mit NMRI-Mäusen über die 6-monatige Interventionsperiode mit RO und ROEn.....	160
Abb. 4.40: Step-through latency im Passive Avoidance Test mit NMRI-Mäusen nach 6-monatiger Interventionsperiode mit RO und ROEn.....	161
Abb. 4.41: Überlebensraten der Thy-1-APP-Mäuse über die 8-wöchige Interventions- periode mit RO und ROEn.....	163
Abb. 4.42: Gewichtsverlauf der Thy-1-APP-Mäuse über die 8-wöchige Interventions- periode mit RO und ROEn.....	164
Abb. 4.43: MMP und ATP-Konzentrationen in dissoziierten Hirnzellen der Thy-1-APP- Mäuse nach 8-wöchiger Intervention mit RO und ROEn.....	165
Abb. 4.44: CS und CS-normierte mitochondriale Atmung isolierter Hirnmitochondrien der Thy-1-APP-Mäuse nach 8-wöchiger Intervention mit RO und ROEn.....	166

Abb. 4.45: Step-through latency im Passive Avoidance Test mit Thy-1-APP-Mäusen	
nach 8-wöchiger Interventionsperiode mit RO und ROEn.	170
Abb. 5.1: Zusammenfassung der Effekte von Acy auf die Genexpression in Gehirn und	
Leber der C57BL/6J-Mäuse.	194
Abb 5.2: Zusammenfassung der Effekte von Acy auf die mitochondriale Funktion im	
Gehirn von C57BL/6J-Mäusen.....	202
Abb. 5.3: Überlegungen zu den Effekten von Acy auf die Gedächtnisleistung und Motorik	
bei C57BL/6J-Mäusen.	208
Abb. 5.4: Überlegungen zu den Effekten von Acy auf die Lebenspanne von	
C57BL/6J-Mäusen.....	212
Abb. 5.5: Zusammenfassung der Effekte von RO und ROEn in gealterten NMRI-Mäusen.	232
Abb. 5.6: Mögliche Ansatzpunkte für weiterführende Studien mit TOP.....	239

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Polyphenolkonzentrationen in Rotwein.	35
Tab. 1.2: Übersicht über detektierte TOP-Metabolite im Gehirn von Versuchstieren.....	51
Tab. 3.1: Polyphenolgehalte der ExGrape Traubenextrakte.....	72
Tab. 3.2: Inkubationsschema für ATP- und MMP-Messungen in Zellkulturversuchen.	78
Tab. 3.3: Inkubationsschema für die Bestimmung des Proteincarbonylgehalts.....	80
Tab. 3.4: Gruppen der Kurzzeitstudie mit Acy in C57BL/6J-Mäusen.....	84
Tab. 3.5: Gruppen der Langzeitstudie mit Acy und HBE in C57BL/6J-Mäusen.....	85
Tab. 3.6: Gruppen der Langzeitstudie mit Acy und Hy in C57BL/6J-Mäusen.....	85
Tab. 3.7: Gruppen der Langzeitstudie mit RO und ROEn in NMRI-Mäusen.....	86
Tab. 3.8: Gruppen der AD-Studie mit RO und ROEn im Mausmodell Thy-1-APP.....	87
Tab. 3.9: Gruppen der Lebenszeitstudie mit Acy in C57BL/6J-Mäusen.	88
Tab. 4.1: MMP und ATP-Konzentrationen in PC12 _{neo} -Zellen nach Syringasäure-	
Inkubation.....	108
Tab. 4.2: MMP und ATP-Konzentrationen in PC12 _{neo} -Zellen nach Hy-, DOPAC- und	
Acy+Hy-Inkubation.	110
Tab. 4.3: Zellzahl-normierte mitochondriale Atmung und CS der PC12 _{neo} -Zellen	
nach DOPAC-Inkubation.	113

Tab. 4.4: MMP und ATP-Konzentrationen in PC12 _{neo} -Zellen nach Ol-, Hy- und Res+Ol-Inkubation.....	117
Tab. 4.5: MMP und ATP-Konzentrationen in PC12 _{sw} -Zellen nach Ol- und Hy-Inkubation.	121
Tab. 4.6: mRNA-Expression in Hirn- und Lebergewebe der C57BL/6J-Mäuse nach 6-monatiger Acy-Fütterung.....	129
Tab. 4.7: Ergebnisse der Verhaltenstests in der Langzeitstudie mit Acy in C57BL/6J-Mäusen.....	134
Tab. 4.8: Ergebnisse der ergänzenden Verhaltenstests in der Acy-Lebenszeitstudie mit C57BL/6J-Mäusen.....	141
Tab. 4.9: Kennzahlen der Acy-Lebenszeitstudie mit C57BL/6J-Mäusen.....	142
Tab. 4.10: Ergebnisse der Verhaltenstests in der Langzeitstudie mit Hy und Acy+Hy in C57BL/6J-Mäusen.....	147
Tab. 4.11: Ergebnisse der Verhaltenstests mit Thy-1-APP-Mäusen bei RO und ROEn-Intervention.....	168
Tab. 5.1: Zusammenfassung der altersbedingten mitochondrialen Dysfunktion in C57BL/6J-Mäusen.....	174
Tab. 5.2: Zusammenfassung der Effekte von ExGrape Traubenextrakten, Syringasäure und DOPAC in PC12 _{neo} -Zellen.....	188
Tab. 5.3: Zusammenfassung mitochondrialer Effekte in der Kurzzeit- und Langzeitstudie mit Acy in C57BL/6J-Mäusen.....	199
Tab. 5.4: Zusammenfassung der Effekte von TOP auf die mitochondriale Funktion.....	225

IV. Abkürzungsverzeichnis

Acy	ExGrape Anthocyanins
AD	Alzheimer-Erkrankung (<i>Alzheimer's Disease</i>)
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Proteinkinase B, PKB
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
AMPK	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
ANT	Adenosin-Nukleotid-Translokator
APOE4	Apolipoprotein E4
APP	<i>Amyloid precursor protein (APP)</i>
A β	β -Amyloid
BBB	Blut-Hirn-Schranke (<i>Blood-brain barrier</i>)
BCA	<i>Bicinchinonic acid</i>
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMKIV	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase IV
CBG	Zytosolische β -Glucosidase
COMT	Catechol- <i>O</i> -Methyltransferase
CREB	cAMP-Reaktionselement-Bindungsprotein
CS	Citratsynthase-Aktivität
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
Cyt c	Cytochrom <i>c</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylethylamin
DOPAL	3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd
DOPET	3,4-Dihydroxyphenylethanol
DTNB	Dithionitobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	Europäischer Behörde für Lebensmittelsicherheit (<i>European Food Safety Authority</i>)
En	<i>Environmental Enrichment</i>

EPIC	<i>European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition</i>
ERR α	<i>Estrogen related receptor α</i>
ETS	Elektronentransfersystem
EVOO	Natives Olivenöl extra (<i>Extra virgin olive oil</i>)
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fötale Kälberserum
FMN	Flavin-Mononukleotid
fMRT	Funktionelle Magnetresonanztomographie
FOXO	<i>Forkhead box proteins</i>
GPx	Glutathion-Peroxidase
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
GSH	Glutathion
GTPasen	Guanosintriphosphatasen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBE	Heidelbeerextrakt Actiplants Bilberry
Hy	Hydroxytyrosol
i.p.	Intraperitoneal
IU	<i>International Units</i>
KAT	Katalase
KG	Körpergewicht
LOAD	<i>Late-onset AD</i>
LPH	Laktat-Phloridzin-Hydrolase
LTP	Langzeitpotenzierung
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCI	Leichte kognitive Störung (<i>Mild cognitive impairment</i>)
MeDi	Traditionelle mediterrane Ernährungsweise (<i>Mediterranean Diet</i>)
MMP	Mitochondriales Membranpotenzial
mPTP	Permeabilitäts-Transitions-Pore (<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>)
mtDNA	Mitochondriale DNA
mTOR	<i>Target of rapamycin</i>
MWM	<i>Morris Water Maze</i>
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NFE2L2	<i>Nuclear factor erythroid-2-related factor 2</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>

NMRI	<i>Naval Medical Reseach Institute</i>
NNT	Nikotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase
NO•	Stickstoffmonoxid
NOAEL	<i>No observed adverse effect level</i>
Nrf	<i>Nuclear respiration factor</i>
O ₂ ^{•-}	Superoxidanion
OH•	Hydroxylradikal
OI	Hytolive
OMWW	<i>Olive oil mill wastewater</i>
Omy	Oligomycin
ONOO ⁻	Peroxynitrit
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
p38 MAPK	<i>p38 Mitogen-activated protein kinase</i>
p53	Tumorsuppressor Protein p53
PET	Positronen-Emmissions-Tomographie
PGC1	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ -Co-Aktivator
PMF	<i>Proton motive force</i>
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PS1	Presenilin-1
PS2	Presenilin-2
Q	Coenzym Q (Ubiquinon)
R 123	Rhodamin 123
RAM	<i>Radial Arm Maze</i>
Res	ExGrape Res
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (<i>Reactive nitrogen species</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive oxygen species</i>)
SAMP8	<i>Senescence-accelerated mouse prone 8</i>
SIRT	Sirtuin
SNP	Natriumnitroprussid
SOD	Superoxiddismutase
SU.VI.MAX	<i>SUplémentation en VItamines et Minéraux AntioXydants</i>
TCA	Trichloressigsäure
Tfam	<i>Mitochondrial transcription factor A</i>
TIM	Translokase der inneren Membran

TMPD	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin-Dihydrochlorid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyrosol	4-Hydroxyphenylethanol
UCP	Entkopplungsprotein (<i>Uncoupling protein</i>)
USDA	<i>US Department of Agriculture</i>
VDAC	<i>Voltage dependent anion channel</i>
VOO	Natives Olivenöl (<i>Virgin olive oil</i>)
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wt	Wildtyp
YY1	<i>Ying yang 1 transcription factor</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Gehirnalterung und Neurodegeneration

Zum ersten Mal in der Geschichte können die meisten Menschen weltweit heutzutage damit rechnen ein Alter von 60 Jahren oder mehr zu erreichen. In den Jahren 2010 bis 2015 konnten 60-Jährige im Durchschnitt 20,2 weiteren Jahren entgegenblicken. Die gesteigerte Lebenserwartung führt in Verbindung mit einem deutlichen Rückgang der Geburtenraten zu einer schnellen und weiter zunehmenden Bevölkerungsalterung (World Health Organization 2015). Laut dem kürzlich veröffentlichten Bericht „*World Population Ageing 2015*“ der Vereinigten Nationen wird sich die Zahl der älteren Menschen, definiert als jene im Alter von 60 oder älter, bis zum Jahr 2050 weltweit mehr als verdoppeln und somit auf fast 2,1 Milliarden steigen. Deutschland war im Jahr 2015, zusammen mit Italien, mit 28 % älteren Menschen nach Japan das Land mit der zweitältesten Bevölkerung (United Nations 2015).

Die Chancen, die sich aus einer längeren Lebenszeit ergeben, sind entscheidend von der Gesundheit des älteren Menschen abhängig. Neben einer hohen Lebenserwartung ist der sogenannten *Healthy Life Expectancy*, der Lebenszeit in guter Gesundheit, ohne Erkrankungen und Beeinträchtigungen, eine wichtige Rolle zuzuschreiben. Werden die zusätzlichen Lebensjahre von einer verminderten körperlichen und geistigen Kapazität geprägt, ist dies negativ für den älteren Menschen und die Gesellschaft anzusehen. Die Veränderungen, die mit dem Altern einhergehen sind komplex und auf biologischer Ebene mit einer Reihe von kumulativen molekularen und zellulären Schäden verbunden. Mit der Zeit führt die Anhäufung solcher Schäden zu einer Minderung der physiologischen Reserven, einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Erkrankungen und letztendlich zum Tod (World Health Organization 2015). Das Altern ist der primäre Risikofaktor für die hauptsächlichen Krankheitsbilder des Menschen, zu denen Krebserkrankungen, Diabetes, kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen gehören (Lopez-Otin et al. 2013).

Der im Jahr 2015 von der *World Health Organization* (WHO) veröffentlichte „*World Report on Ageing and Health*“ macht deutlich, dass die Demenz, besonders in den einkommensstarken Ländern, in großem Umfang zur altersbedingten Beeinträchtigung beiträgt. Während aktuell bereits ca. 47 Millionen Menschen weltweit an Demenz leiden, wird sich diese Zahl schätzungsweise bis zum Jahr 2050 verdreifachen. Aktuell gibt es alle drei Sekunden einen neuen Fall von Demenz auf der Welt (Alzheimer’s Disease International 2015). Mit dieser Entwicklung sind

dramatische Konsequenzen nicht nur auf der Ebene des Individuums verbunden, sondern auch auf der sozialen und wirtschaftlichen Ebene. Eine ausreichende körperliche Bewegung und eine adäquate Ernährung sind Lebensstilmaßnahmen mit entscheidender Gesundheitsrelevanz, die vielversprechende Strategien darstellen, um die Beeinträchtigungen und die Mortalität im Alter zu vermindern (World Health Organization 2015).

1.1.1 Alterung und Funktionsverluste im Gehirn

Zellen im zentralen Nervensystem (ZNS) altern in gleichem Maße wie alle Zellen im Körper und die Alterung betrifft sowohl kognitive als auch sensorische und motorische Funktionen. Intraindividuelle Unterschiede führen jedoch zu einer starken Variabilität der betroffenen Funktionen, der Ausprägung und den Kompensationskapazitäten (Mattson and Magnus 2006).

Die Alterung des Gehirns ist der wichtigste prädisponierende Faktor für neurodegenerative Erkrankungen (Yankner et al. 2008). Dieser Grundsatz stellt die Wissenschaft in Bezug auf die Differenzierung zwischen normaler Gehirnalterung und neurodegenerativen Veränderungen vor eine große Herausforderung. Es ist somit nicht auszuschließen, dass die Untersuchungen auf die derzeitigen Hypothesen zur normalen Hirnalterung basieren, durch unentdeckte präklinische Formen der Neurodegeneration verzerrt werden (Draganski et al. 2013).

1.1.1.1 Kognitive Fähigkeiten, Lernen und Gedächtnis

Die Abnahme der kognitiven Fähigkeiten ist einer der bedeutendsten Belastungen, die alternde Menschen neben den Vorzügen einer gesteigerten Lebenserwartung erfahren. Der schwerwiegendste kognitive Verlust tritt bei Menschen mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Erkrankung oder anderen altersabhängigen Demenzen auf. Die andere Extreme stellen Menschen dar, die im Alter eine hohe kognitive Leistung aufrechterhalten können. Eine stetige Abnahme der kognitiven Leistung, die sogenannte normale Alterung des Gehirns oder kognitive Alterung liegt zwischen diesen Extremen und beginnt vermutlich in der 5. Dekade des Lebens (Roberson et al. 2012). Altersbedingte Gedächtnisdefizite sind individuell sehr unterschiedlich und werden von der Genetik, persönlichen Eigenschaften (u. a. Bildungslevel), Umweltfaktoren, Gesundheitsstatus, sozialen und emotionalen Faktoren beeinflusst (Alexander et al. 2012). Das Ausmaß der altersbedingten kognitiven Defizite ist vermutlich auch abhängig von dem Ausgangslevel der kognitiven Leistung (Underwood 2014). Eine positive Beeinflussung der kognitiven Entwicklung während des Erwachsenenalters ist in gewissem Umfang durch das Individuum und die Umweltfaktoren möglich und könnte den Zeitpunkt zu dem die

Grenze der normalen Funktion unterschritten wird, nach hinten verschoben (Lindenberger 2014).

Studien der kognitiven Neurowissenschaften legen nahe, dass das episodische Gedächtnis und das Arbeitsgedächtnis bzw. die exekutiven Funktionen spezifische Bereiche der normalen Gehirnalterung darstellen (Draganski et al. 2013) (Abb. 1.1).

Exekutive Funktionen

Exekutive Funktionen, die vom präfrontalen Kortex getragen werden, können allgemein als Kontroll-oder Planungsmechanismen bezeichnet werden, die zielgerichtetes Verhalten steuern (Bizon et al. 2012). Der präfrontale Kortex gehört zu den Assoziationskortexen, die keine eindeutigen sensorischen, sensiblen oder motorischen Funktionen aufweisen, sondern ein Zusammenwirken zwischen den einzelnen Sinnessystemen und den motorischen Arealen „assoziiieren“ (Birbaumer and Schmidt 2011a). Zu den exekutiven Prozessen gehören Aufmerksamkeitsfunktionen, das Arbeitsgedächtnis, die kognitive Flexibilität und das Treffen von Entscheidungen. Diese Funktionen werden oftmals als kognitive Fähigkeiten höherer Ordnung bezeichnet und aufgrund der höheren Komplexität des präfrontalen Kortex als einzigartig für Primaten gehalten. Es bestehen jedoch auch zahlreiche Hinweise, dass Nagetiere neuroanatomische und funktionale kortikale Homologien aufweisen und diese Tiere eine Reihe von komplexen zielgerichteten Verhaltensweisen aufzeigen (Bizon et al. 2012).

Ein Aspekt der exekutiven Funktionen, der speziesübergreifend sehr sensitiv für altersbedingte Verluste ist, ist das Arbeitsgedächtnis (Bizon et al. 2012). Das Arbeitsgedächtnis ist Teil des Kurzzeitgedächtnisses und umfasst die Fähigkeit Informationen, die nicht länger in der Umwelt verfügbar sind, für einige Zeit zu erhalten, zu organisieren und daraus für das Handeln relevante Aspekte auszuwählen. Dazu gehören Informationen über abstrakte Regeln, kürzliche Ereignisse und zukünftige Ziele (Bizon et al. 2012; Birbaumer and Schmidt 2011b). Speziesübergreifend wird unter dem Begriff Arbeitsgedächtnis eine begrenzte Hirnkapazität zur kurzzeitigen Informationserhaltung verstanden. Beim Menschen ist die zeitliche Begrenzung allgemein auf Sekunden beschränkt. Demgegenüber kann sie bei Nagetieren Sekunden, Minuten oder auch Stunden umfassen. Das Arbeitsgedächtnis kann auch als Unterkomponente von anderen komplexeren kognitiven Prozessen gesehen werden und seine Beeinträchtigungen wurden für eine Reihe von kognitiven Aufgaben wie Langzeiterinnerung, Sprache, Problemlösung und das Treffen von Entscheidungen vorgeschlagen (Bizon et al. 2012).

Lernen und Gedächtnis

Zwei Gedächtnissysteme werden unterschieden – das Verhaltensgedächtnis oder implizites Gedächtnis und das Wissensgedächtnis oder explizites Gedächtnis. Das Verhaltensgedächtnis umfasst impliziertes Lernen oder Gedächtnis, d.h. auch ohne Beteiligung des Bewusstseins. Dazu gehört nicht-assoziatives Lernen wie Gewöhnungen, das Lernen von Fertigkeiten und assoziatives Lernen wie die Konditionierung auf einen positiven oder negativen Reiz (Birbaumer and Schmidt 2011b).

Das Wissensgedächtnis lässt sich in ein episodisches und ein semantisches Gedächtnis unterscheiden, die von der Alterung unterschiedlich betroffen sind. Das semantische Gedächtnis ist ein allgemeiner Wissensspeicher von Wörtern, Konzepten, und Fakten, der über die Lebensspanne relativ stabil bleibt. Dementgegen nimmt das episodische Gedächtnis, das Gedächtnis für spezifische persönliche Ereignisse, das einen räumlichen und zeitlichen Aspekt beinhaltet, mit zunehmendem Alter ab (Alexander et al. 2012). Das kontextabhängige Gedächtnis, also betreffend einer zeitlichen Reihenfolge, räumlichen Lage oder Quelle, scheint stärker betroffen zu sein als die Erinnerung an spezielle Dinge oder Ereignisse (Foster et al. 2012). Ältere Menschen haben Probleme dabei, sich zu erinnern, wo oder wann etwas gehört oder gelesen wurde oder ob etwas wirklich passiert ist oder nur gedacht wurde (Glisky 2007). Verhaltensuntersuchungen an Tieren und Menschen weisen darauf hin, dass die Alterung mit einer verminderten Kapazität für die Unterscheidung von Erlebnissen verbunden ist, die gemeinsame Elemente haben. So könnten Probleme des episodischen Gedächtnisses erklärt werden, wie beispielsweise die falsche Wiedererkennung, von der im Alter berichtet wird (Leal and Yassa 2015).

Das räumliche Gedächtnis d.h. die Erinnerung an räumliche Lagen und die Fähigkeit in der Umwelt zu navigieren, ist eine bedeutende Komponente des episodischen Gedächtnisses, das mit dem Alter über Spezies hinweg abnimmt (Leal and Yassa 2015). Diese Beeinträchtigungen haben einen hohen Einfluss auf die Lebensqualität, da die Aufnahme- und Erinnerungskapazität bezüglich räumlicher Merkmale neuer Orte entscheidend für die Anpassung an die Umwelt und das Leben in Unabhängigkeit ist (Foster et al. 2012). Das räumliche Gedächtnis ist beim Menschen sowie auch bei Tieren besonders anfällig für altersbedingte Beeinträchtigungen. Bei Primaten ist es eines der frühesten Zeichen von kognitiven Verlusten mit dem Alter. Auch bei Nagern tritt es schon im mittleren Alter auf (Foster et al. 2012). Die anatomischen Grundlagen für das räumliche Gedächtnis, der Hippocampus und die angrenzenden kortikalen Hirnregionen, sind bei Tiermodellen und Menschen gleich. Bei Nagern, Primaten und Menschen führen

Schädigungen im Hippocampus zu einer Beeinträchtigung des räumlichen Gedächtnisses und altersbedingte Beeinträchtigungen des Gedächtnisses sind mit einem verminderten Hippocampusvolumen verbunden. Bei Nagern werden räumliche Fähigkeiten in einer Reihe von Labyrinth-Tests untersucht. Für Menschen liegen u.a. computerbasierte virtuelle Umgebungen zur Untersuchung von altersbedingten Veränderungen spezifischer räumlicher Fähigkeiten vor (Foster et al. 2012).

Im Allgemeinen sind die hauptsächlichen Gehirnregionen, die für Gedächtnisdefekte im Alter verantwortlich gemacht werden, der präfrontale Kortex und der mediale Temporallappen. Sie interagieren miteinander und spielen abhängig von der Gedächtnisaufgabe verschiedene Rollen (Alexander et al. 2012). Das Gedächtnissystem des medialen Temporallappens umfasst den Hippocampus an welchen der entorhinale Kortex projiziert sowie benachbarte und assoziierte Kortexareale (Birbaumer and Schmidt 2011b).

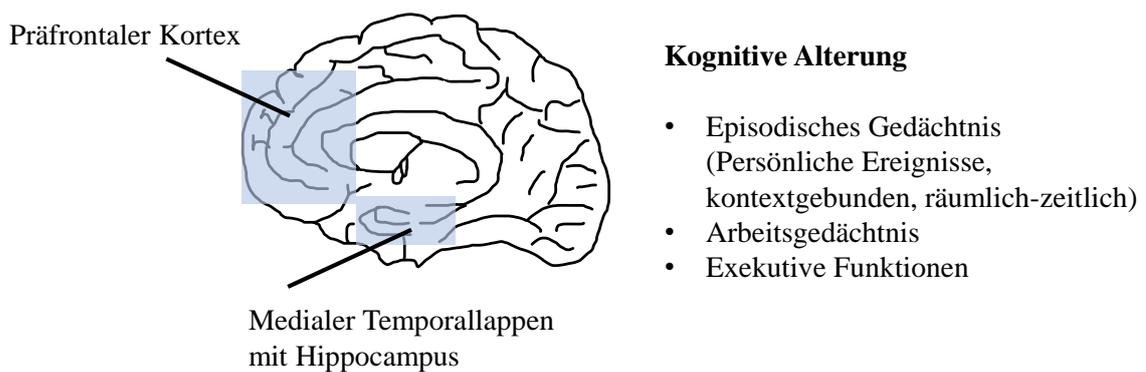


Abb. 1.1: Primär von der kognitiven Alterung betroffene Bereiche

Untersuchungen mittels funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) legen nahe, dass die altersbedingten Gedächtnisveränderungen mit einer veränderten funktionalen Aktivierung des präfrontalen Kortex und dem Hippocampus verbunden sind. Die Veränderungen umfassen sowohl eine verminderte Aktivierung bestimmter Bereiche des präfrontalen Kortex bei exekutiven Aufgaben sowie eine großflächigere Aktivierung und zusätzliche kontralaterale Aktivierung (Verlust der Hemisphärenasymmetrie). Letzteres könnte ein normaler Kompensationsmechanismus im alternden Gehirn sein, der bei neurodegenerativen Prozessen verloren geht. Darüber hinaus kommt es zu einer verminderten Aktivierung des Hippocampus, insbesondere vermutlich dem Gyrus Dentatus (Yankner et al. 2008).

Die genauen Mechanismen für die altersbedingten Funktionsverluste werden fortlaufend erforscht. Generell sind normale altersbedingte kognitive Beeinträchtigungen vermutlich nicht Folge eines Verlusts an kortikalen Nervenzellen, sondern sind mit spezifischen Veränderungen an den Synapsen im Hippocampus und präfrontalen Kortex verbunden (Morrison and Baxter 2012). Synapsen sind die spezifischen Kontaktstellen, welche für die Weitergabe von Informationen in Nervenzellen über Aktionspotenziale verantwortlich sind. Eine verminderte Synapsendichte wurde beispielsweise im frontalen Kortex älterer Menschen und Affen beobachtet, die bei der Ausführung von exekutiven Aufgaben mit der verminderten Aktivierung des präfrontalen Kortex verbunden war (Yankner et al. 2008).

Auch Veränderungen in der synaptischen Plastizität, dem Prozess, bei dem Synapsen ihre Stärke in Abhängigkeit der neuronalen Aktivität ändern, sind mit der Alterung und der Abnahme von kognitiven Funktionen assoziiert (Yankner et al. 2008). Die Langzeitpotenzierung (LTP) stellt eine anhaltende Erhöhung der Erregungsstärke der Synapsen dar und wird nach dem heutigen Kenntnisstand zumindest zum Teil für Lernen und Gedächtnis verantwortlich gemacht (Leal et al. 2015; Smolen et al. 2016). Man geht davon aus, dass eine synaptische Konsolidierung für den Übergang vom Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis notwendig ist. Das Kurzzeitgedächtnis ist sofort verfügbar, dauert wenige Stunden, und benötigt keine Synthese neuer Proteine. Demgegenüber umfasst das relativ stabile Langzeitgedächtnis die Bildung neuer Proteine und Synapsenverbindungen und braucht einige Stunden zur Stabilisierung. Langzeiterinnerungen werden vermutlich über LTP und Langzeitdepression (verminderte synaptische Effizienz) vermittelt (Lynch 2004; Nader and Hardt 2009; Nabavi et al. 2014). Während die Kurzzeitpotenzierung und eine frühe zeitweise LTP vorübergehend sind und nur die Modifikation bestehender Proteine umfasst, dauert die späte LTP für Stunden oder Tage an und ist mit Veränderungen der Genexpression und *de novo* Synthese von Proteinen verbunden (Leal et al. 2015). Eine beeinträchtigte Induktion und Aufrechterhaltung der LTP wurde in einer Reihe von Studien im Hippocampus von Ratten, abhängig von den Subregionen festgestellt (Yankner et al. 2008). Die synaptische Plastizität ist entscheidend von den neuronalen Calciumströmen und den Calcium-vermittelten Signalwegen abhängig. Bei einer LTP an Synapsen mit Glutamat als fungierender Neurotransmitter können erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen zur Aktivierung von Proteinkinasen führen, die den Transkriptionsfaktor cAMP-Reaktionselement-Bindungsprotein (CREB) phosphorylieren und somit aktivieren. CREB reguliert die Transkription vieler Gene wie beispielsweise der Neurotrophine. Somit entstehen Enzyme zur Synthese und zum Abbau von Neurotransmittern, Strukturproteine und Rezeptormoleküle an der postsynaptischen Membran (Birbaumer and Schmidt 2011b; Izquierdo et al.

2016). Folglich kann eine veränderte Calciumhomöostase zu einer veränderten synaptischen Plastizität im gealterten Gehirn beitragen (Yankner et al. 2008; Foster 2007). In der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) von älteren Menschen wurde beispielsweise eine Verminderung des Neurotrophins *Brain derived neurotrophic factor* (BDNF) festgestellt, welche mit einer geringeren Erinnerungsleistung assoziiert war. Eine Verbindung zwischen den geringeren BDNF-Konzentrationen im Hippocampus und altersbedingten Beeinträchtigungen, möglicherweise durch die Reduzierung des LTP, ist denkbar (Leal and Yassa 2015). Weitere altersbedingte Veränderungen in den beeinträchtigten Gehirnbereichen schließen Volumenveränderungen, Integritätsverluste der weißen Masse, eine Verminderung der Produktion des erregenden Neurotransmitters Dopamin und seiner Rezeptoren sowie Amyloid-Ablagerungen ein (Alexander et al. 2012).

1.1.1.2 Motorische Funktionen

Ältere Menschen erfahren nicht nur häufig Beeinträchtigungen ihrer kognitiven Leistung, sondern auch Einschränkungen in den motorischen Fähigkeiten. Zu diesen Veränderungen gehören Schwierigkeiten bei der Koordination, langsamere Bewegungen und Probleme mit dem Gleichgewicht und Gang. Diese Beeinträchtigungen schränken die Betroffenen bei der Ausführung ihrer Alltagsaktivitäten ein. Zudem tragen 20-30 % der älteren Menschen, die aufgrund von Schwierigkeiten beim Gehen oder mit dem Gleichgewicht fallen, mittlere bis schwere Verletzungen davon. Die motorischen Beeinträchtigungen älterer Menschen sind vermutlich auf Fehlfunktionen im zentralen und auch peripheren Nervensystem sowie im neuromuskulären System zurückzuführen (Seidler et al. 2010). Das motorische System liegt in verschiedenen Abschnitten des Nervensystems. Der Bewegungsplan (Entschluss) entsteht im Motorkortex, der nachfolgend zusammen mit dem Kleinhirn, den Basalganglien und dem motorischen Thalamus das Bewegungsprogramm ausarbeitet. Die Ausführung erfolgt über den Motorkortex in Abstimmung mit dem Hirnstamm und dem Rückenmark (Lehmann-Horn 2007). Die Alterungsprozesse des motorischen Systems werden bisher weniger verstanden als kognitive Veränderungen. In Bezug auf die Veränderungen im ZNS werden Veränderungen im Hirnvolumen einschließlich des primären Motorkortex sowie Beeinträchtigungen der Neurotransmittersysteme und speziell des dopaminergen Systems beobachtet. Weiterhin nutzen ältere Menschen für motorische Funktionen weitergefasste Hirnbereiche, was insbesondere für den präfrontalen Kortex und die Basalganglien gilt (Seidler et al. 2010; Bernard and Seidler 2014). Im neuromuskulären System sind die grundlegenden Funktionseinheiten, die motorischen Einheiten, bestehend aus den α -Motoneuronen und den von ihnen innervierten Muskelfasern betroffen. Veränderungen

in der Morphologie und den Eigenschaften der motorischen Einheiten führen dazu, dass Muskeln bei Aufgaben hoher Geschwindigkeit schwächer, langsamer und schneller ermüdbar sind sowie eine geringere und unbeständigere Leistung zeigen. Die motorische Leistung nimmt mit dem Alter ab und diese Abnahme wird ab dem Alter von 80 Jahren nochmals schneller (Hunter et al. 2016). Die Veränderungen in den motorischen Einheiten beeinträchtigen nicht nur Kraft und Leistung, sondern vermutlich auch die Koordination und tragen somit zu schwerwiegenden Folgen der Alterung einschließlich Stürzen und Gebrechlichkeit bei (Hepple and Rice 2016). Eine Verbindung zwischen kognitiver und motorischer Leistung beschreiben Vergheese et al. (2014) kürzlich mit dem motorisch-kognitiven Risiko-Syndrom, welches eine Verbindung zwischen kognitiven Beschwerden von älteren Personen ohne vorliegende Demenz und einem langsamen Gang beschreibt. Das Syndrom wurde in einer Studie mit über 26.000 älteren Menschen (60-114 Jahre) aus 17 Ländern mit einer Prävalenz von 9,7 % identifiziert und war mit einem höheren Risiko für Demenz assoziiert (Vergheese et al. 2014). Kognitive Alterungsprozesse können einen Einfluss auf die motorische Leistung und das Erlernen motorischer Fähigkeiten haben (Ren et al. 2013).

1.1.2 Alzheimer-Erkrankung (AD)

Die Alzheimer-Erkrankung (*Alzheimer's Disease*, AD) wird als häufigste Ursache für eine Demenz angesehen und trägt vermutlich zu ca. 60-70 % zu den Demenzerkrankungen bei (World Health Organization and Alzheimer's Disease International 2012; Wilson et al. 2012). Angesichts der derzeit 47 Millionen Menschen mit Demenz und der prognostizierten Verdreifachung in den nächsten 35 Jahren wird die Krankheit zunehmend zu einem primären Gesundheitsproblem der alternden Gesellschaft (World Health Organization 2015). Basierend auf neuen Feldstudien aus Europa (EuroCoDe-Daten von Alzheimer Europe) litten 2014 schätzungsweise 1,6 Millionen ältere Menschen in Deutschland an Demenzerkrankungen. Die Prävalenzraten steigen mit dem Alter deutlich an und verdoppeln sich ca. alle fünf Altersjahre. Während in der Altersgruppe der 65-69-Jährigen etwas mehr als 1 % von Demenz betroffen sind, steigt der Anteil auf ca. 40 % unter den über 90-Jährigen (Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. 2016; Alzheimer Europe 2013). Das Alter ist der Hauptrisikofaktor für eine AD, sodass ein Zusammenhang zwischen den Mechanismen der Alterung und dem Auftreten und Fortschreiten der AD angenommen wird (Foster et al. 2016).

Die pathologischen Gehirnveränderungen, die der AD vorausgehen, beginnen viele Jahre vor dem Auftreten erster klinischer Symptome (Wilson et al. 2012). Die leichte kognitive Störung

(*Mild cognitive impairment*, MCI) kann als Prodromal- oder Risikosyndrom einer Demenz angesehen werden. Es ist definiert als subjektive und objektivierbare kognitive Einbuße bei erhaltener Alltagskompetenz. Liegen Gedächtnisstörungen als Leitsymptom vor, ist das Risiko für einen Übergang in die AD besonders hoch (Deuschl et al. 2016).

Die AD wurde vor über 100 Jahren von dem Deutschen Arzt Alois Alzheimer beschrieben (Alzheimer et al. 1995; Alzheimer 1906). Sie ist gekennzeichnet durch einen fortschreitenden Gedächtnisverlust und kognitive Beeinträchtigungen. Die Gehirnbereiche die besonders anfällig für die AD sind, gleichen denen der normalen Alterung. Bei der AD weiten sich die Defizite mit der Zeit aus und zerstören die exekutiven Funktionen, das semantische Gedächtnis sowie Sprache und visuospatiale Fähigkeiten (Foster et al. 2016). Die Neurodegeneration beginnt typischerweise im entorhinalen Kortex und breitet sich im Hippocampus und den parietalen Regionen des Neocortex aus (Demetrius and Driver 2015). Das häufigste erste Symptom einer AD ist die zunehmend schlechtere Fähigkeit sich an neue Informationen, wie kürzliche Unterhaltungen, Namen oder Ereignisse zu erinnern. Auch eine Apathie und Depression gehören zu den häufigsten frühen Zeichen einer AD. In späteren Stadien weiten sich die Beeinträchtigungen aus und schließen eine beeinträchtigte Kommunikationsfähigkeit, Desorientierung, Verwirrtheit, ein schlechtes Urteilsvermögen und Verhaltensänderungen ein. Schließlich haben AD-Patienten Probleme beim Sprechen, Schlucken und Gehen (Abb. 1.2). Durch die geringere Mobilität kommt es in Folge einer erhöhten Infektanfälligkeit zu Pneumonien, die häufig zum Tod von AD-Patienten beitragen (Alzheimer's Association 2016).

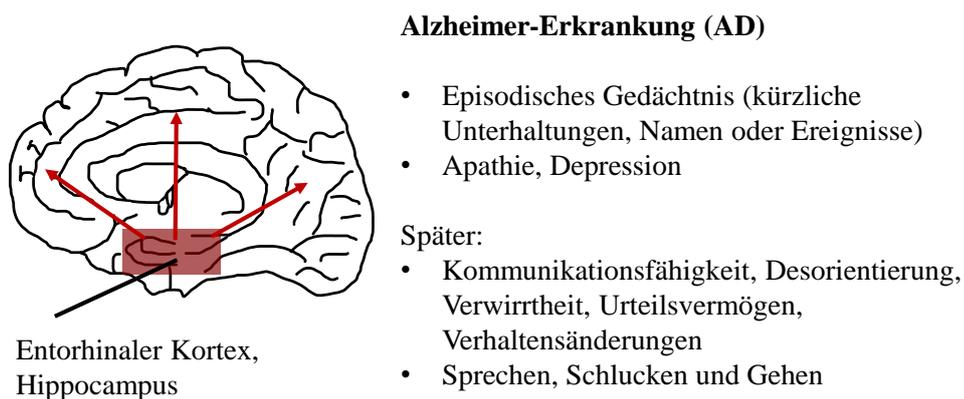


Abb. 1.2: Primär von der AD betroffene Bereiche und ihre Progression

In mehr als 90 % der Fälle ist die AD sporadisch und tritt im Alter von 65 Jahren oder älter auf (*Late-onset AD*, LOAD). Der hauptsächliche genetische Risikofaktor für die Entwicklung einer

LOAD ist die Expression des Apolipoproteins E4 (APOE4), welches möglicherweise die Beseitigung des Peptids β -Amyloid (A β) vermindert. Daneben werden in den letzten Jahren zunehmend weitere genetische Faktoren identifiziert (Reiman 2016; Selkoe and Hardy 2016).

In 5-10 % der AD-Fälle kommt es zu einem früheren Auftreten der Erkrankung (Wirz et al. 2014). Mutationen in den Genen *Amyloid precursor protein* (APP), Presenilin-1 (PS1) und Presenilin-2 (PS2) sind in ca. 1 % der Fälle ursächlich für eine erhöhte Bildung und Ansammlung des schädlichen Peptids A β , die ab der vierten oder fünften Dekade einem fortschreitenden Verlust von kognitiven Funktionen zur Folge haben (Foster et al. 2016). A β entsteht durch den sequenziellen Abbau von APP, der über zwei verschiedene Wege verlaufen kann. Über den nicht-amyloidogen Weg erfolgt der Abbau mittels α -Sekretase und nachfolgend γ -Sekretase. Dementgegen führt der Abbau durch die β -Sekretase und nachfolgend γ -Sekretase zu A β in variablen Längen. Die Genmutationen führen zu einer Verschiebung in Richtung des amyloido-gen Wegs und somit in Richtung längerer und toxischer A β -Formen, die zahlreiche schädigende Effekte auf das Gehirn haben (Canter et al. 2016).

Auf histopathologischer Ebene zeigt die AD einen fortschreitenden und selektiven Verlust von Nervenzellen und Synapsen, eine extrazelluläre Ablagerung von A β -Plaques und die Bildung von intrazellulären Neurofibrillenbündel (*Neurofibrillic tangles*). Diese Merkmale treten vorrangig in Gehirnregionen auf, die an kognitiven Prozessen beteiligt sind, wie temporaler, parietaler und frontaler Kortex, Hippocampus und Amygdala (Wirz et al. 2014). Die genauen Zusammenhänge zwischen den pathologischen Kennzeichen und dem fortschreitenden Gedächtnisverlust sind jedoch nicht hinreichend aufgeklärt. A β -Plaques werden zunächst in neokorticalen Bereichen beobachtet. Neurofibrillenbündel treten erst im entorhinalen Kortex auf und verteilen sich dann auf den lokal angrenzenden Hippocampus. Neurofibrillenbündel und A β -Plaques breiten sich nachfolgend weiter im limbischen System aus, das, einschließlich dem Hippocampus, ein Netzwerk von verschiedenen Hirnregionen darstellt, die Gedächtnis und emotionales Verhalten kontrollieren (Canter et al. 2016).

Auf Grundlage der mutationsbedingt erhöhten A β -Bildung bei der genetischen Form der Erkrankung wurde mit der Amyloid-Hypothese A β als die treibende Kraft der Krankheit vorgeschlagen (Hardy 2017; Hardy and Selkoe 2002). Die Theorie beruht darauf, dass sich die 42-Aminosäurenform von A β (A β 42) in Folge einer Überproduktion oder verminderter Beseitigung im Gehirn zu schädlichen Oligomeren und Fibrillen zusammenlagert. Die entstandenen

A β -Aggregate, die sich außerhalb der Nervenzellen ablagern und auch als senile Plaques oder neuritische Plaques bezeichnet werden, vermitteln eine Kaskade neurobiologischer Prozesse, einschließlich entzündlicher Antworten. Bisher unbekannte Mechanismen resultieren in einer Aggregation, Phosphorylierung und Vermehrung von Tau, einem Protein das mit Mikrotubuli assoziiert ist (Selkoe and Hardy 2016; Reiman 2016). Mikrotubuli verleihen den Nervenzellen als wichtigste Komponenten des Zytoskeletts Struktur und ermöglichen Transportprozesse (Canter et al. 2016). Tau ist die Hauptkomponente von schädlichen Neurofibrillenbündel, die in Nervenzellkörpern akkumulieren und auch als dystrophische Plaques bezeichnet werden. Die Kaskade führt somit zur Bildung von Plaques und Neurofibrillenbündel sowie Dysfunktionen in den betroffenen Nervenzellen und Synapsen, die in Folge sterben und weitere Entzündung vermitteln können. Fortschreitende Dysfunktionen, Degenerationen und Verluste von Nervenzellen und Synapsen sind verbunden mit Symptomen der AD einschließlich kognitiver Beeinträchtigungen. A β -Oligomere beeinträchtigen die Synapsenfunktionen, u.a. das LTP, und die synaptische Struktur (Selkoe and Hardy 2016; Reiman 2016).

Die A β -Hypothese für die Pathogenese der LOAD wird bis heute kontrovers diskutiert (Reiman 2016; Canter et al. 2016; Demetrius and Driver 2015). Argumente, welche gegen die Theorie sprechen könnten, schließen die Tatsachen ein, dass Neurofibrillenbündel stärker mit der kognitiven Funktion korrelieren als A β -Plaques, manche Menschen ohne diagnostizierte Demenz *post mortem* deutliche A β -Ablagerungen zeigen, manche neuropathologische Studien das Auftreten von Neurofibrillenbündel vor Plaques postulieren und verschiedene klinische Studien mit Wirkstoffen, die gegen A β gerichtet sind, nicht erfolgreich waren (Selkoe and Hardy 2016). Es bleibt somit zu klären, ob A β Ursache oder Konsequenz der LOAD ist (Reiman 2016). Bis heute ist ungewiss, wie es bei der späten Form der AD zu einer veränderten A β -Homöostase kommt (Grimm et al. 2016). Zunehmend wird ein multifaktorieller Prozess vorgeschlagen bei dem die mitochondriale Funktion und oxidativer Stress einen wichtigen Platz einnehmen (Kapitel 1.2).

Die klinische Diagnose einer AD erfolgt primär anhand neuropsychologischer Untersuchungen (McKhann et al. 2011). Zur neuropathologischen *post mortem* Diagnose wird die Präsenz von neuritischen Plaques und Neurofibrillenbündel herangezogen (Hyman and Trojanowski 1997). Kürzlich veröffentlichte diagnostische Kriterien nehmen auch Biomarker bei der wissenschaftlich basierten Diagnose mit auf (Dubois et al. 2014). Die frühzeitige Erkennung der AD wird als Schlüssel für die Prävention, das Verlangsamen oder das Aufhalten der Erkrankung angese-

hen. In den letzten Jahren ist die Forschung hinsichtlich AD-Biomarkern deutlich vorangeschritten. So können heute lösliche A β -Monomere und Tau in der CSF nachgewiesen werden, A β Fibrillen über PET sichtbar gemacht werden und der Metabolismus von APP mittels Isotopenmarkierung von A β Peptiden in Gesunden und Erkrankten analysiert werden (Selkoe and Hardy 2016). Dubois et al. schlagen für die Diagnose der AD neben der kognitiven Komponente mit einem fortschreitenden Gedächtnisverlust und einer Beeinträchtigung im Hippocampus-abhängigen episodischen Gedächtnis eine zusätzliche *in vivo* Untersuchung durch CSF Analyse oder PET vor (Dubois et al. 2014).

Die therapeutischen Möglichkeiten für die AD sind bisher ungenügend. So liegen derzeit keine krankheitsmodifizierenden Medikamente vor, die den pathobiologischen Krankheitsverlauf verzögern können. Die in Deutschland aktuell zugelassenen Medikamente zur Behandlung der Kernsymptomatik der AD sind die Acetylcholinesterase-Hemmer und der nicht-kompetitive NMDA-Antagonist Memantin. Weiterhin liegen Hinweise vor, dass der Exktrat Ginkgo Biloba EGb 761 günstige Effekte auf die Kognition bei der AD vermittelt (Deutschl et al. 2016).

Ein großer Teil der Forschungsaktivitäten hinsichtlich innovativer AD-Therapien konzentriert sich auf die gegen A β gerichtete Therapie, die derzeit in einigen Studien an Probanden untersucht wird, die schon Symptome einer AD entwickelt haben oder ein Risiko für AD aufweisen. Bisher konnte jedoch keine dieser Behandlungen in klinischen Studien der Phase III überzeugen. Weitere Therapieansätze umfassen β - und γ -Sekretasehemmer, sowie Immunisierungen und A β -Antikörper (Selkoe and Hardy 2016). Erste Hinweise auf Erfolg liefert eine kleine Phase Ib Studie mit dem monoklonalen Antikörper Aducanumab (Reiman 2016; Sevigny et al. 2016). Weiterhin nimmt der Therapieansatz der sekundären Prävention an Bedeutung zu, der Menschen adressiert, die mittels PET oder CSF-Analyse als Hochrisikogruppen identifiziert wurden (Selkoe and Hardy 2016).

Zu anderen therapeutischen Ansätzen, die auf die Tau-Aggregation mittels Antikörper-basierter Therapie oder auf APOE abzielen, liegen noch keine hinreichenden Daten aus klinischen Studien vor. Auch ein direkter Einfluss auf die Gehirnaktivität beispielsweise durch die tiefe Hirnstimulierung gehört zu neuen therapeutischen Techniken (Canter et al. 2016).

Aktuell erforschte Strategien mit natürlichen Verbindungen setzen bei der im folgenden Kapitel beschriebenen mitochondrialen Dysfunktion an (Eckert et al. 2012c). Diese schließen neben dem genannten Exktrat Ginkgo Biloba EGb 761 (Eckert et al. 2005) u. a. Dimebon (Eckert et al. 2012b), Piracetam (Stockburger et al. 2014), ω -3-Fettsäuren (Eckert et al. 2012a), Reiskleie-Extrakt (Hagl et al. 2016a) sowie polyphenolreiche Extrakte (Schaffer et al. 2012; Asseburg et al. 2014) mit ein.

1.2 Mitochondriale Funktion als Schlüsselfaktor bei der Alterung und AD

Die Mechanismen, die am Alterungsprozess beteiligt sind, bleiben trotz der umfangreichen Forschungsarbeiten in den letzten Jahrzehnten weitgehend ungeklärt. Es wurden verschiedene Theorien zur Alterung aufgestellt, die man versucht, zu einem Bild zu vereinbaren. López-Otín et al. (2013) fassen neun zelluläre und molekulare Kennzeichen des Alterungsprozesses zusammen. Die mitochondriale Dysfunktion ist eine der neun Kennzeichen, zu denen weiterhin genetische Instabilitäten einschließlich Schäden an der mitochondrialen DNA, Telomerverkürzungen, epigenetische Veränderungen, Verluste der Proteinhomöostase, Fehlregulationen von nahrungssensitiven Signalwegen (u.a. Insulin-/*Insulin-like growth factor-1*), zelluläre Seneszenz, Erschöpfung der Stammzellfunktion sowie Veränderungen in der Zellkommunikation (Lopez-Otin et al. 2013) gezählt werden.

Die Beobachtung, dass bei der Alterung und AD die gleichen Gehirnbereiche eine besondere Anfälligkeit für Funktionsverluste zeigen und die Tatsache, dass die Alterung der Hauptrisikofaktor für eine AD ist, legen einen Zusammenhang zwischen den zugrunde liegenden Mechanismen beider Prozesse nahe (Foster et al. 2016). Es wird zunehmend davon ausgegangen, dass die AD als ein multifaktorieller Prozess gesehen werden sollte (Canter et al. 2016), der nicht Abß als initialen Auslöser hat (Grimm et al. 2016). Mitochondriale Dysfunktionen könnten eine Schlüsselrolle bei der Gehirnalterung sowie Entstehung und Progression von AD spielen.

1.2.1 Morphologie, Funktion und Dynamik von Mitochondrien

Nervenzellen brauchen eine große Menge an Energie, die in den Mitochondrien über die oxidative Phosphorylierung produziert wird (Yin et al. 2014). Mitochondrien sind nach der Endosymbionten-Hypothese aus einem α -Proteobakterium entstanden, das zur oxidativen Phosphorylierung fähig war und von einem eukaryotischen Vorläufer durch Endozytose aufgenommen wurde (Archibald 2015; Scheffler 2001). Wie ihr bakterieller Vorfahre verfügen Mitochondrien über eine Doppelmembran und eine zirkuläre DNA. Sie sind ungefähr 1 μm groß und bilden ein dynamisches Netzwerk aus, das ständig in Bewegung ist. Auch wenn Mitochondrien als semiautonome Organellen angesehen werden, haben Milliarden von Jahren der Evolution und der Transfer der meisten ihrer Gene in den Zellkern sie fest in der eukaryotischen Zelle verankert (Vafai and Mootha 2012). Mitochondrien werden als „Kraftwerke der Zellen“ angesehen und die meisten Mechanismen, die neuronale Aktivitäten vermitteln, erhalten ihre Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) aus der oxidativen Phosphorylierung (Giachin et al.

2016). Seit der Entstehung der Mitochondrien hat sich ihre Form und Zusammensetzung deutlich verändert und ihr Funktionsspektrum deutlich erweitert (Friedman and Nunnari 2014). In Nervenzellen spielen Mitochondrien entscheidende Rollen bei der Aufrechterhaltung von Ionengradienten in Membranen der Nervenzellen, Signalweiterleitung, synaptischen Plastizität und Apoptose (Raefsky and Mattson 2017).

1.2.1.1 Aufbau und Struktur von Mitochondrien

Mitochondrien sind komplexe membrangebundene Organellen. Sie bestehen aus zwei Membransystemen – einer inneren und einer äußeren Phospholipid-Doppelmembran. Die äußere mitochondriale Membran umschließt das gesamte Organell. Die innere mitochondriale Membran separiert zwei Kompartimente – den Intermembranraum und die Matrix. Die innere Membran ist zu einer Anzahl an Einstülpungen gefaltet, sogenannte *Cristae*, die der Oberflächenvergrößerung dienen. Begrenzt von der inneren Membran bildet die mitochondriale Matrix das innerste Kompartiment der Mitochondrien (Eckmann et al. 2013; Navarro and Boveris 2007) (Abb 1.3).

Die äußere und innere Membran unterscheiden sich sowohl in der Zusammensetzung als auch Funktion deutlich. Die äußere mitochondriale Membran enthält Phosphatidylcholin als hauptsächliches Phospholipid sowie kleine Mengen an Cholesterin. Weiterhin verfügt sie über zahlreiche integrale Proteine einschließlich Porinen, wie den *Voltage dependent anion channel* (VDAC), die für die hohe Permeabilität der äußeren Membran für alle Moleküle bis zu einer Größe von 5.000 Da verantwortlich sind (Eckmann et al. 2013; Eckert et al. 2012c). Demgegenüber ist die innere mitochondriale Membran sehr dicht und auch undurchlässig für Protonen. Ionen und kleine Moleküle benutzen Transporter, um die Membran zu passieren. Dazu gehören die Translokase der inneren Membran (TIM) und der Adenosin-Nukleotid-Translokator (ANT). In der inneren Membran befinden sich zudem die Proteine des Elektronentransfersystems (ETS), welches für die oxidative Phosphorylierung zuständig ist (Eckmann et al. 2013; Navarro and Boveris 2007). Die Integrität der inneren mitochondrialen Membran ist entscheidend für die Funktion des ETS und die ATP-Produktion. Sie wird durch das Phospholipid Cardiolipin stabilisiert, welches fast ausschließlich in der inneren mitochondrialen Membran vorzufinden ist. Über die Errichtung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (*Mitochondrial permeability transition pore*, mPTP), einem Multiproteinkomplex bestehend aus VDAC, ANT und anderen Komponenten, induziert durch pro-apoptotische Signale, sind Mitochondrien ent-

scheidend an der Apoptose beteiligt. Das Öffnen der Pore durch erhöhte Calciumkonzentrationen oder durch andere Faktoren führt zu einem plötzlichen Anstieg der Permeabilität und letztendlich zur Apoptose (Eckert et al. 2012c; Eckmann et al. 2013; Paradies et al. 2011).

1.2.1.2 Energiemetabolismus in den Mitochondrien

Die primäre Energiequelle des Gehirns ist Glucose, die über die Glycolyse zu Pyruvat abgebaut werden kann. Nachfolgend wird das Pyruvat in der mitochondrialen Matrix mittels oxidativer Decarboxylierung zu Acetyl-CoA abgebaut und geht in den Citratcyclus ein. Eine weitere Quelle für Acetyl-CoA sind Ketonkörper in Folge eines Glucosemangels. Im Citratzyklus werden die Elektronen-Carrier Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂) erzeugt, die in den Prozess der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) eingehen (Yin et al. 2014; Demetrius and Driver 2015). Die OXPHOS ist der finale biochemische Prozess bei dem unter Sauerstoffverbrauch Energie in Form von ATP produziert wird (Eckert et al. 2012c). Das ETS besteht klassischerweise aus vier makromolekularen Komplexen, die den Elektronentransfer von NADH und FADH₂ auf Sauerstoff katalysieren. Die freie Energie wird über die Kopplung des Elektronentransports an die Erzeugung eines Protonengradienten oder *Proton motive force* (PMF) gekoppelt, der über den Transport von Protonen aus der Matrix über die innere mitochondriale Membran in den Intermembranraum geschaffen wird. Der elektrochemische Gradient wird von der ATP-Synthase (Komplex V) genutzt, um die Synthese von ATP zu katalysieren (Abb 1.3).

Das ETS wird typischerweise in einer Reihe, als isoliert arbeitende Kette, dargestellt. Tatsächlich ist es jedoch ein dynamisches System, das die zentrale Stellung im Netzwerk des zellulären Metabolismus einnimmt, Superkomplexe ausbildet und in seiner Anordnung veränderbar ist (Vafai and Mootha 2012; Bratic and Larsson 2013; Friedman and Nunnari 2014).

Komplex I (NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase, NADH-Dehydrogenase) ist der größte Komplex der ETS mit ca. 45 verschiedenen Untereinheiten und einem Beitrag zur PMF von ca. 40 %. Komplex I weist eine L-Form aus einem langen hydrophoben Membranprotein und einem kurzen in die Matrix reichenden Arm auf. Letzterer enthält die Dehydrogenase-Aktivität, in Form des Flavin-Mononukleotid (FMN), das NADH oxidiert.

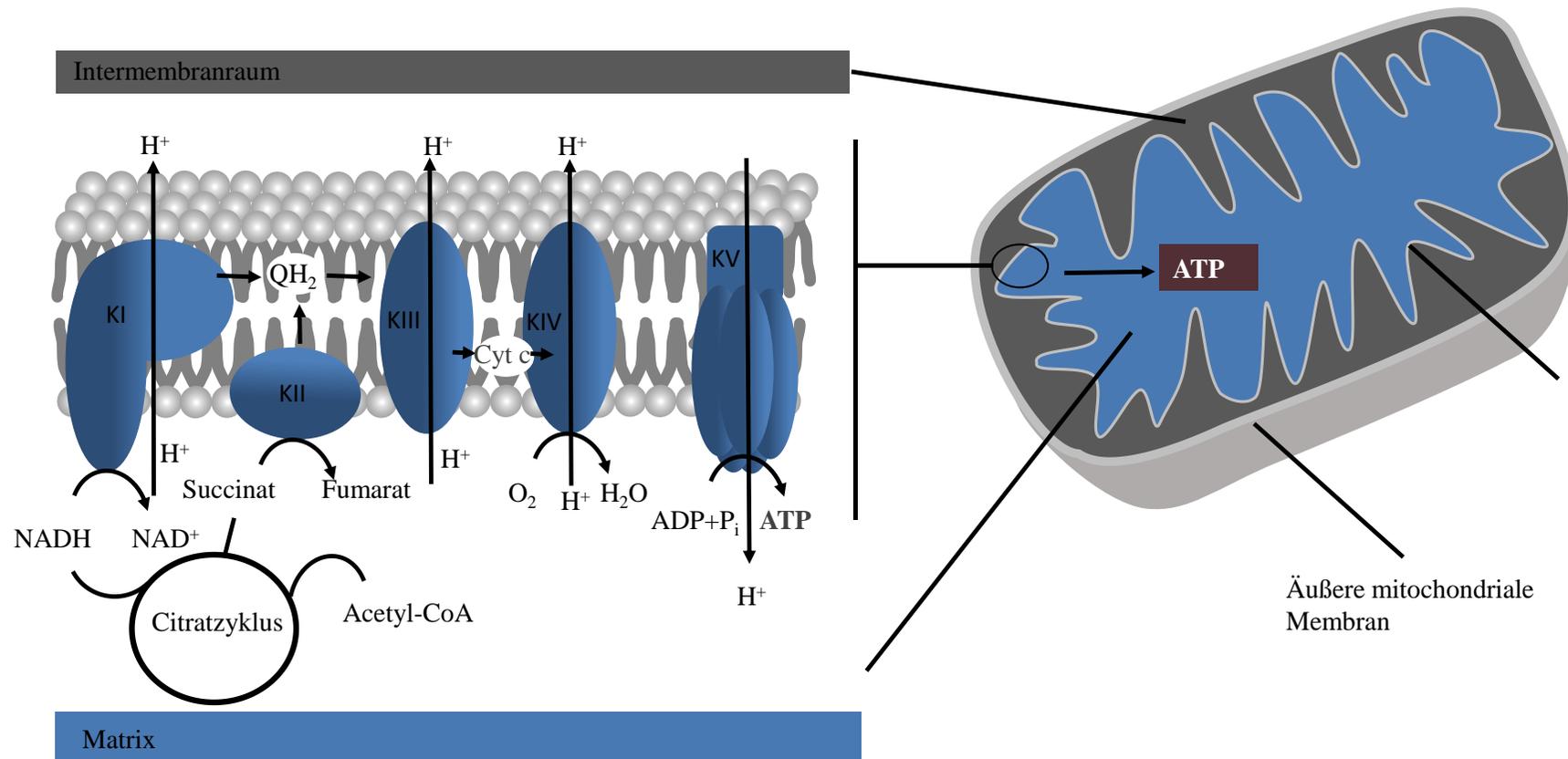


Abb 1.3: Schematische Darstellung eines Mitochondriums und der oxidativen Phosphorylierung. Rechts dargestellt ist der Querschnitt eines Mitochondriums mit der äußeren und inneren mitochondrialen Membran. Über die Aktivität des Elektronentransportsystems (ETS) in der inneren mitochondrialen Membran (links) wird ein elektrochemischer Protonengradient aufgebaut, der von Komplex V zur ATP-Synthese genutzt wird. K: Komplex, QH₂: reduziertes Coenzym Q.

Die zwei dabei freigesetzten Elektronen werden über mehrere Eisen-Schwefel-Cluster transportiert und nachfolgend auf den Elektronen-Carrier Coenzym Q (Q, Ubiquinon) übertragen, der zwei Protonen aus der Matrix aufnimmt (QH₂). Gleichzeitig werden durch den Elektronenfluss, katalysiert über den membranständigen Teil des Komplexes, vier Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum gepumpt (Navarro and Boveris 2007; Giachin et al. 2016; Vafai and Mootha 2012).

Komplex II (Succinat-Dehydrogenase, Succinat-Ubiquinon-Oxidoreduktase) enthält die membrangebundene Komponente des Citratzyklus – die Succinat-Dehydrogenase. FADH₂, welches durch die Succinat-Dehydrogenase gebildet wird, verlässt den Proteinkomplex nicht, überträgt seine Elektronen jedoch über Eisen-Schwefel-Zentren auf Q und es entsteht QH₂ (Berg et al. 2015; Navarro and Boveris 2007).

Im nächsten Schritt des ETS wird das an Komplex I und II entstandene QH₂ an die zweite Protonenpumpe – Komplex III (Ubichinol-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase, Cytochrom-Reduktase) weitergeleitet und die Elektronen auf Cytochrom *c* (Cyt *c*) übertragen. Cytochrome sind elektronenübertragende Proteine, die über ein Häm als prosthetische Gruppe verfügen. Da Cyt *c* nur ein Elektron aufnehmen kann, werden in einem Q-Zyklus zwei QH₂-Moleküle oxidiert und zwei Q-Moleküle gebildet sowie nachfolgend ein Q-Molekül zu QH₂ reduziert. Dadurch werden insgesamt vier Protonen in den Intermembranraum gepumpt und zwei Protonen aus der Matrix entfernt (Vafai and Mootha 2012; Berg et al. 2015).

Komplex IV (Cytochrom-*c*-Oxidase, Cytochrom-*c*-O₂-Oxidoreduktase) ist die letzte Protonenpumpe und katalysiert die Oxidierung von Cyt *c*. Bei Übertragung von vier Elektronen des Cyt *c* auf molekularen Sauerstoff werden vier Protonen aus der Matrix entwendet und zwei Moleküle H₂O gebildet. Gleichzeitig werden zusätzlich vier Protonen von der Matrix in den Intermembranraum gepumpt (Navarro and Boveris 2007; Berg et al. 2015).

Zusammengefasst werden somit an Komplex I, III und IV Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum gepumpt, sodass die Matrix negativ geladen und der Intermembranraum positiv geladen wird. Es entsteht ein mitochondriales Membranpotenzial (MMP). Dieser elektrochemische Protonengradient wird von Komplex V (ATP-Synthase) zur ATP-Produktion aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat genutzt. Die Rate der OXPHOS ist abhängig von der Verfügbarkeit von ADP, welches durch die Translokase ANT in die Matrix transportiert wird. Neben ADP stellt ANT auch ATP für energieabhängige Prozesse im Cytosol zur Verfügung (Navarro and Boveris 2007; Vafai and Mootha 2012). Steht kein ADP bereit, kommt die OXPHOS zum Erliegen und der Protonengradient kann nicht mehr durch Komplex V abgebaut werden. Dieser Zustand wird als *Leak* Status bezeichnet, in

welchem physiologisch trotzdem kleine Mengen an Protonen zurück in die Matrix gelangen. Ein Teil dieses „Leaks“ könnte auf eine Inaktivität von ANT zurückzuführen sein (Divakaruni and Brand 2011). Der Protonengradient kann weiterhin auch durch Entkopplungsproteine (*Uncoupling proteins*, UCPs) unter Abgabe von Wärme abgebaut werden, die durch Fettsäuren aktiviert werden. UCP1 im braunen Fettgewebe reguliert beispielsweise die zitterfreie Thermogenese bei Neugeborenen, Kälteakklimatisierung und winterschlafenden Tieren. Andere UCPs werden auch in Nervenzellen gefunden (Andrews et al. 2005).

1.2.1.3 Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies

Mitochondrien stellen neben der Produktion von ATP eine wichtige Quelle von reaktiven Sauerstoffspezies (*Reactive oxygen species*, ROS) dar. ROS werden durch die Übertragung von einem einzelnen Elektron auf molekularen Sauerstoff gebildet. Dies geschieht in den Mitochondrien, wenn es an zu früher Stelle der ETS zu einer Elektronenübertragung kommt, sodass Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) entsteht (Shadel and Horvath 2015). Diese falsche Elektronenübertragung ist für schätzungsweise 2-3 % des Sauerstoffverbrauchs in Form von $O_2^{\cdot-}$ und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) verantwortlich (Yin et al. 2014). $O_2^{\cdot-}$ wird spontan sowie enzymatisch zu H_2O_2 umgewandelt, welches weiter zu dem starken Oxidanz Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) reduziert werden kann. Weiterhin ist für $O_2^{\cdot-}$ auch eine Reaktion mit Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}) zu Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$) möglich, ein starkes Oxidanz, das zu den reaktiven Stickstoffspezies (*Reactive nitrogen species*, RNS) gehört (Turrens 2003; Bratic and Larsson 2013). Komplex I und III werden als die hauptsächlichen Quellen für mitochondrial gebildete ROS angesehen. Neue Studien weisen auf mindestens zehn andere Enzyme, einschließlich Komplex II hin, die einen Beitrag zur mitochondrialen ROS-Produktion leisten (Shadel and Horvath 2015). Hohe Mengen an $O_2^{\cdot-}$ werden gebildet, wenn der NADH-Pool durch eine Verlangsamung des ETS beispielsweise in Folge der Inhibierung von Komplex IV durch NO^{\cdot} oder Apoptose erhöht ist. In dieser Situation kommt es zu einer Reduzierung von FMN an Komplex I. Weiterhin wird viel $O_2^{\cdot-}$ produziert, wenn die ATP-Produktion zum Erliegen kommt und somit ein hoher elektrochemischer Gradient vorliegt sowie erhöhte Verhältnisse von Q zu QH_2 vorherrschen (Murphy 2009). Entsteht $O_2^{\cdot-}$ an Komplex I, liegt es in der Matrix vor und kann nach Umwandlung in H_2O_2 in das Cytosol gelangen. An Komplex III gebildetes $O_2^{\cdot-}$ kann über VDAC aus dem Intermembranraum in das Cytosol transportiert werden (Eckert et al. 2012c). H_2O_2 und NO^{\cdot} aus den Mitochondrien sind *Second Messenger*, die in wichtige zelluläre Signalwege involviert sind (Yin et al. 2014; Shadel and Horvath 2015).

Oxidativer Stress resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen der Produktion von ROS und/oder RNS und dem Abbau durch antioxidative Abwehrmechanismen (Müller et al. 2010; Turrens 2003). Mitochondrien verfügen über eine Reihe von Mechanismen, die sie vor oxidativem Stress schützen. Superoxiddismutasen (SOD) (manganhaltige SOD2 in der Matrix; Kupfer-/Zink-SOD im Intermembranraum) wandeln $O_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 um, welches durch die Glutathion-Peroxidase (GPx) weiter zu H_2O verarbeitet wird. GPx ist die Peroxidase, die im Cytosol und in den Mitochondrien am weitesten verbreitet ist (Bratic and Larsson 2013; Yin et al. 2014). Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid mit einer Sulfhydrylgruppe, das im Cytosol aus Glycin, Glutamat und Cystein gebildet und nachfolgend über einen Carrier in die Mitochondrien transportiert wird. GSH schützt vor oxidativem Stress als Cofaktor u.a. von GPx, Glutathion-S-Transferasen und Glutaredoxinen. Oxidiertes GSH wird durch die Glutathionreduktase unter NADPH-Verbrauch regeneriert.

In Mitochondrien des Gehirns wird H_2O_2 hauptsächlich über das GSH-basierte und das Thio-redoxin-basierte System abgebaut. Beide Systeme agieren über Sulfhydrylgruppen und benötigen NADPH. Quellen für NADPH in den Mitochondrien sind die Isocitratdehydrogenase-2, das Malatenzym und die Nikotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase (NNT). NNT ist ein nukleär-kodiertes Protein in der inneren Mitochondrienmembran und katalysiert die reversible Reduktion von $NADP^+$ zu NADPH, gekoppelt an die Oxidierung von NADH zu NAD^+ . Der Protonengradient der inneren mitochondrialen Membran fördert die Bildung von NADPH, welches zu mehr als 50 % zum mitochondrialen NADPH-Pool beiträgt (Navarro and Boveris 2010; Yin et al. 2014).

1.2.1.4 Biogenese, Dynamik und Autophagie von Mitochondrien

Die konstante Erneuerung von Mitochondrien ist essentiell für die Aufrechterhaltung einer adäquaten Funktion und beinhaltet zwei aufeinander abgestimmte Prozesse – die Biogenese und den selektiven Abbau (Autophagie) von Mitochondrien. Mitochondrien können nicht neu gebildet werden, sondern entstammen aus vorher bestehenden Organellen über einen komplexen Prozess (Ploumi et al. 2017; Seo et al. 2010; Ryan and Hoogenraad 2007).

Mitochondrien haben einem dualen Ursprung. Sie sind neben dem Zellkern die einzigen Organellen mit eigener DNA – einem kleinen (etwa 16 kB), zirkulären Genom, der mitochondrialen DNA (mtDNA). Sie wird maternal vererbt und kodiert nur für 13 Proteine der Komplexe I, III, IV und der ATP-Synthase, sowie die für die 22tRNA und zwei ribosomale RNAs (Vafai and Mootha 2012; Friedman and Nunnari 2014). Der Großteil des mitochondrialen Genoms wird

jedoch im Zellkern kodiert, an Ribosomen im Zytosol translatiert und abhängig vom elektrochemischen Gradienten aktiv in die Mitochondrien transportiert. Die mitochondriale Biogenese hängt somit von der aufeinander abgestimmten Synthese der mitochondrial- und nukleär-kodierten Proteine ab (Wenz 2013; Ryan and Hoogenraad 2007).

Die Transkription der mtDNA wird primär durch den *Mitochondrial transcription factor A* (Tfam) kontrolliert. Demgegenüber sind in der Expression der nukleär-kodierten mitochondrialen Proteine eine Reihe von Transkriptionsfaktoren einschließlich *Nuclear respiration factors* (Nrfs) wie Nrf1 und Nrf2, CREB und *Estrogen related receptor α* (ERR α) und *Ying yang 1 transcription factor* (YY1) involviert. Die transkriptionelle Regulation erfolgt über Co-Aktivatoren der Familie der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor γ -Co-Aktivatoren 1 (PGC1), die auf Änderungen des Energiestatus wie die Verhältnisse von NAD⁺/NADH und AMP/ATP sowie Umweltfaktoren reagieren. PGC1 α ist der am besten charakterisierte Co-Aktivator. Im Zellkern lokalisiert, reguliert er zudem die Transkription der mtDNA durch die Co-Aktivierung von Nrf1 am Tfam-Promotor. PGC1 α wird deshalb auch als Masterregulator der mitochondrialen Biogenese bezeichnet (Friedman and Nunnari 2014; Yin et al. 2014; Wenz 2013). Aufgrund seiner zentralen Stellung wird PGC1 α auf verschiedensten Ebenen reguliert. Die PGC1 α -Genexpression wird u.a. durch Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR) γ und CREB reguliert. Auch die post-translationale Modifikation nimmt bei der Regulation von PGC1 α eine wichtige Rolle ein. PGC1 α -modifizierende Enzyme sind zelluläre Stresssensoren und involvieren PGC1 α somit in die zelluläre Stressantwort. *Adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK), Proteinkinase B (PKB oder Akt) und p38 *Mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK) phosphorylieren und aktivieren PGC1 α . Die Aktivierung von PGC1 α kann auch über eine Deacetylierung beispielsweise durch das Sirtuin (SIRT)-1 erfolgen (Yin et al. 2014; Wenz 2013). Auch ROS können PGC1 α induzieren (Raefsky and Mattson 2017).

Von großer Bedeutung bei der Biogenese und Funktion von Mitochondrien ist ihre Dynamik. Die Beobachtung von Mitochondrien in lebenden Zellen macht klar, dass die mitochondriale Morphologie keinesfalls statisch ist. Vielmehr sind Mitochondrien dynamische Organellen, die kontinuierlich miteinander verschmelzen (*Fusion*) und sich teilen (*Fission*). Beide Prozesse sind über Guanosintriphosphatasen (GTPasen) der Dynamin-Familie vermittelt, welche die innere und äußere mitochondriale Membran über komplexe Prozesse zusammenführen und teilen. Die *Fission* ist erforderlich für die Bildung neuer Mitochondrien, erleichtert aber auch die Qualitätskontrolle. Geschädigte oder dysfunktionale Mitochondrien, die andernfalls zu starker

ROS-Bildung oder Freisetzung von pro-apoptotischen Signalen führen würden, werden so abgetrennt und können mittels Autophagie beseitigt werden. Der Prozess der Autophagie bei Mitochondrien wird auch als Mitophagie bezeichnet und führt zum Abbau der mitochondrialen Komponenten in Lysosomen. Kleine Schäden von Mitochondrien können durch die *Fusion* in Form einer Komplementierung über den Austausch und die Verteilung mitochondrialer Inhalte ausgeglichen werden. Eine ausgeglichene Balance zwischen *Fusion* und *Fission* ist daher entscheidend für die Funktionalität der Mitochondrien (Seo et al. 2010; Youle and van der Bliek 2012; Friedman and Nunnari 2014; Raefsky and Mattson 2017).

1.2.2 Mitochondriale Dysfunktion bei der Alterung und AD

Eine entscheidende Theorie der Alterung, die von Denham Harman in den 1950er Jahren aufgestellt wurde, ist, dass die Produktion von intrazellulärem ROS und deren Schäden für die begrenzte Lebensspanne verantwortlich ist (*Free Radical Theory of Aging*) (Harman 1956; Harman 1983). Auf Grundlage der Tatsache, dass Mitochondrien einen bedeutenden Teil der ROS produzieren, wurden später Mitochondrien und deren Schäden in den Mittelpunkt der Theorie gesetzt (Harman 1983). Ein Kreislauf aus ROS-induzierten mitochondrialen Schäden und der daraus resultierenden erhöhten ROS-Produktion könnte somit für die Alterung verantwortlich sein (Lagouge and Larsson 2013; Seo et al. 2010).

Abgesehen von ROS, die enzymatisch durch die NADPH-Oxidase, Cytochrom-P450 Oxygenasen und Xanthin-Dehydrogenasen gebildet werden, stellen Mitochondrien die Hauptquelle für ROS in der Zelle dar. Mitochondrien werden somit oftmals als erste Quelle und erster Angriffspunkt für ROS gesehen (Schaffer et al. 2012). Die langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren der mitochondrialen Membran sind besonders oxidationsempfindlich, sodass es in Folge von oxidativem Stress zu einer Membrandepolarisierung und sukzessiven mitochondrialen Beeinträchtigungen kommen kann (Grimm et al. 2016; Schaffer et al. 2012; Paradies et al. 2014). Ein weiteres Ziel von ROS ist die mtDNA, die aufgrund ihrer Nähe zu ROS, dem Fehlen schützender Histone und geringeren Reparaturmechanismen anfälliger ist als die nukleäre DNA (Müller et al. 2010). Da die mtDNA für Proteine der mitochondrialen Komplexe kodiert (Scheffler 2001), könnten Schädigungen zu defekten Untereinheiten der OXPHOS führen und somit Dysfunktionen der mitochondrialen Atmung mit erhöhter ROS-Produktion herbeiführen (Grimm et al. 2016; Raefsky and Mattson 2017).

Welcher der beiden Faktoren – ROS oder die mitochondriale Dysfunktion – das erste Glied der Kette darstellt, bleibt jedoch ungewiss (Grimm et al. 2016). Die einseitige Sichtweise, dass ROS ungewollte Nebenprodukte des aeroben Metabolismus darstellen, die zur Alterung führen,

wird heute kontrovers beurteilt (Hekimi et al. 2011; Lagouge and Larsson 2013). Der Zusammenhang von ROS und der Lebensspanne konnte in einigen Spezies nicht bestätigt werden und man geht davon aus, dass ein Großteil der Mutationen der mtDNA nicht durch ROS entstehen, sondern durch Fehler in der mtDNA-Replikation im Laufe des Lebens verursacht werden (Lagouge and Larsson 2013; Hekimi et al. 2011; Lopez-Otin et al. 2013). In physiologischen Mengen können ROS als Signalmoleküle agieren und sind bei der Immunantwort, Entzündung sowie synaptischen Plastizität, Lernen und Gedächtnis beteiligt. Wenn ROS in hohen Mengen produziert werden, könnten sie zu oxidativem Stress führen und Proteine und DNA schädigen sowie Lipidperoxidation induzieren (Grimm et al. 2016; Shadel and Horvath 2015).

Im alternden Gehirn lassen sich sowohl Verminderungen im bioenergetischen Stoffwechsel als auch Veränderung in der Redox-Homöostase feststellen (Yin et al. 2014). Das Gehirn ist für ca. 20 % des Sauerstoffverbrauchs verantwortlich, stellt jedoch nur weniger als 2 % der Körpermasse dar (Schmitt-Schillig et al. 2005). Nervenzellen haben einen besonders hohen Energiebedarf, beispielsweise für die Generierung von Aktionspotenzialen und Erregungsübertragungen (Yin et al. 2014). Es werden jedoch nur ca. 10 % des ATP durch Glycolyse gewonnen, sodass der hohe Energiebedarf hauptsächlich über die Produktion von ATP über die OXPHOS von Energiesubstraten gedeckt wird (Raefsky and Mattson 2017).

Unter normalen physiologischen Bedingungen ist das Gehirn fast ausschließlich auf Glucose als Energiesubstrat angewiesen. Störungen des Glucosemetabolismus sind eng mit Fehlfunktionen der Synapsen verbunden und eine Hypometabolisierung wird sowohl im Alter als auch bei der AD beobachtet (Mosconi 2013). Mittels PET-Bildgebung konnte bei gesunden Menschen im Alter von 20-67 Jahren in fast allen Bereichen des Gehirns eine ausgedehnte altersbedingte Abnahme der Glucoseverwertung detektiert werden (Petit-Taboue et al. 1998). Bei der AD wird ein noch ausgeprägter Hypometabolismus charakteristischer Gehirnregionen festgestellt (Mosconi 2013).

Verminderungen in der mitochondrialen Funktion werden sowohl bei der Alterung im Allgemeinen beobachtet, als auch speziell im Gehirn (Mattson and Magnus 2006). Die mitochondriale Dysfunktion hat mit zunehmendem Alter eine verminderte Produktion von Energieträgern wie ATP zur Folge und kann somit zu einem Energiedefizit der Gehirnzellen führen (Stranahan and Mattson 2012). Besonders betroffen von der Abnahme der mitochondrialen Atmung sind die Komplexe I, III, und IV des ETS. Zudem erfährt die ATP-Synthase eine altersbedingte Abnahme (Yin et al. 2014). In isolierten Gehirnmitochondrien gealterter Nagetiere finden sich im Besonderen verminderte Aktivitäten der Komplexe I und IV und diese Beobachtung scheint

ausgeprägter in Gehirnregionen zu sein, die besonders von der Alterung betroffen sind. Geringere Raten der ETS-Aktivitäten und der ATP-Produktion finden sich zudem in Verbindung mit Oxidationsprodukten von Phospholipiden und Proteinen (Navarro and Boveris 2010). Ein Zusammenhang zwischen Veränderungen im Energiehaushalt und dem Redox-Status ist somit wahrscheinlich (Yin et al. 2014). Der hohe Sauerstoffverbrauch in Folge des ausgeprägten Energiebedarfs und die hohe Dichte an oxidationsempfindlichen, ungesättigten Fettsäuren machen das Gehirn besonders empfindlich für oxidative Schäden. Proteinoxidierungen und -modifizierungen durch Produkte der Lipidperoxidation und Peroxynitrit nehmen mit dem Alter fortschreitend zu (Stranahan and Mattson 2012). *Post mortem* wird eine weitgreifende Oxidierung von Makromolekülen des menschlichen Gehirns identifiziert. Auch AD-charakteristische Hirnbereiche wie der Hippocampus sind besonders von oxidativem Stress geprägt (Chu et al. 2015).

Mausmodelle der AD, die eine Überexpression von APP aufweisen, zeigen eine Verminderung der ATP-Produktion, ein beeinträchtigtes MMP und eine verminderte Komplex IV-Aktivität, die von erhöhten Mengen an ROS begleitet werden. Diese mitochondrialen Dysfunktionen treten zusammen mit einer Akkumulation von löslichem A β auf und konnten vor der Präsenz von A β -Ablagerungen und kognitiven Dysfunktionen detektiert werden (Grimm et al. 2016; Hauptmann et al. 2009; Blanchard et al. 2003). Zellkulturstudien weisen zudem daraufhin, dass die erhöhte mitochondriale Bildung von ROS, die zumindest zum Teil aus einer Beeinträchtigung von Komplex I bei der Alterung resultiert, A β -Level erhöht und sukzessive mitochondriale Funktionen beeinträchtigt und einen Kreislauf von oxidativem Stress in Gang setzt (Grimm et al. 2016; Stockburger et al. 2014; Leuner et al. 2012). Es liegen weiterhin Hinweise vor, dass A β und hyperphosphoryliertes Tau-Protein auf synergistische Weise die mitochondriale Dysfunktion bei der AD herbeiführen könnten. Mäuse mit einer Mutation, die zu einer abnormal erhöhten Produktion von hyperphosphoryliertem Tau-Protein führt, zeigten ebenfalls eine altersbedingte mitochondriale Dysfunktion einschließlich einer verminderten Komplex I-Aktivität, geringer mitochondrialer Atmung und reduzierter ATP-Konzentrationen sowie erhöhter ROS-Produktion. Darüber hinaus konnte in einem AD-Modell mit dreifacher Mutation eine Verminderung von Komplex I detektiert werden, die auf ein abnormales Tau zurückzuführen war, sowie eine Verminderung von Komplex IV, die von A β abhängig war (Rhein et al. 2009). Die dargelegten Beobachtungen legen eine zentrale Rolle der mitochondrialen Dysfunktion bei der Alterung und Pathogenese von AD nahe. Mitochondrien stehen im Fokus neuer Theorien zur Entstehung der LOAD.

Nach der Theorie der *Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis*, die zuerst 2004 von Swerdlow und Khan aufgestellt wurde, wird die LOAD nicht von A β initiiert, sondern von Dysfunktionen der Mitochondrien, die im Laufe des Lebens auftreten und von einer erhöhten Menge an ROS begleitet werden. Veränderungen in der A β -Homöostase sind vielmehr Kennzeichen einer normalen Alterung. Die histopathologischen Kennzeichen der AD treten auf, wenn eine bestimmte Grenze an MD überschritten wird und könnten möglicherweise zu einer weiteren Beeinflussung der mitochondrialen Funktion führen. Im Gegensatz zu der A β -Hypothese, postuliert diese Theorie, dass eine therapeutische Reduktion von A β weder den Verlauf der Alterung noch der AD im (prä-)klinischen Stadium beeinflusst (Swerdlow et al. 2013; Swerdlow and Khan 2004).

Demetrius et al. stellten kürzlich die *Inverse Warburg Hypothesis* auf (Demetrius and Simon 2012). Nach dieser Theorie hat die Entstehung der LOAD zwei entscheidende Faktoren – das Alter und den Energiehaushalt – die den metabolischen Prozess in Gang setzen, der zu Nervenzellverlusten und den histopathologischen Kennzeichen der AD führt. Die Entstehung der AD ist danach ein nichtlinearer, altersabhängiger Prozess, der möglicherweise durch eine mitochondriale Dysfunktion ausgelöst wird. Eine verminderte Effizienz der Produktion von ATP könnte eine Kaskade aus der Hochregulierung der OXPHOS in Nervenzellen, oxidativem Stress und weiteren Schäden der Mitochondrien, Substratmangel, Nervenzellverlust und Demenz induzieren. In diesem Prozess kommt es zunächst zu einer kompensatorischen Hochregulation der OXPHOS sowie erhöhten ROS-Produktion in bestimmten Nervenzellen, die beispielsweise durch akkumulierte Schäden in den energieproduzierenden Zellkomponenten eine verminderte Energieproduktion aufweisen. Nervenzellen können eine erhöhte Energieproduktion nur durch die Erhöhung der OXPHOS und nicht der Glycolyse erreichen. Dies kann zunächst zu einer stabilen Energieproduktion führen, die durch einen Wettbewerb um Glucose und Laktat (aus den Astrozyten) geprägt ist. Ausgetragen wird der Wettbewerb zwischen den intakten Nervenzellen mit normaler OXPHOS-Aktivität und den beeinträchtigten Nervenzellen mit hoher kompensatorischer Aktivität. Die hochregulierte OXPHOS benötigt für die gleiche Energiemenge mehr Substrate und führt zu einem Substratmangel, besonders in den Zellen ohne Hochregulierung. Nervenzellen, die dem Wettbewerb nicht standhalten und nicht genug Energie produzieren, erfahren Beeinträchtigungen oder sterben und führen so zu Demenz. Das Zusammenbrechen der zeitweisen stabilen Energieproduktion, welche die normale Alterung mit milden kognitiven Beeinträchtigungen abbildet, wird vermutlich durch endogene und exogene Reize gefördert. Adaptationsmechanismen wie antioxidative Enzyme, Signaltransduk-

tionsenzyme und neuroprotektive Gene können dem Stress nicht mehr standhalten. Faktoren, wie Veränderungen der vaskulären Gesundheit, Lebensstil, Trauma und Stress können die pathologische Alterung einleiten, die sich durch einen unkontrollierten Kreislauf aus Beeinträchtigungen, Nervenzellverlust und Demenz auszeichnet (Demetrius and Driver 2015; Demetrius et al. 2014; Demetrius and Simon 2012).

Die reduzierte bioenergetische Effizienz von Mitochondrien mit dem Alter kann verschiedene Ursachen haben. Es kommt vermutlich zu einer Kombination aus erhöhten Schädigungen und einem reduzierten Umsatz von Mitochondrien, durch eine geringere Biogenese und verminderter Abbau von Mitochondrien (Lopez-Otin et al. 2013). Die verminderte Biogenese der Mitochondrien mit dem Alter wird als wichtiger Faktor bei der Alterung angesehen (Seo et al. 2010). Eine mögliche Erklärung dafür sind verminderte PGC1 α -Level, welche beispielsweise durch Telomerverkürzungen eintreten könnten (Sahin and DePinho 2012). Eine Veränderung des Verhältnisses von *Fusion* und *Fission* kann weiterhin die mitochondriale Funktion beeinträchtigen sowie zur Anhäufung von geschädigten Mitochondrien in Folge einer verminderten Biogenese und mitochondrialen Autophagie führen (Seo et al. 2010). Weitere Adaptationsmechanismen gegen zellulären Stress wie DNA-Reparaturmechanismen, antioxidative Enzyme und die Signalgebung durch Neurotrophine wie BDNF weisen mit dem Alter Beeinträchtigungen auf (Raefsky and Mattson 2017). BDNF nimmt eine wichtige bioenergetische Rolle in den Nervenzellen ein und führt u.a. zur Induktion der PGC1 α -Expression (Marosi and Mattson 2014).

Nach Grimm et. al (2016) ist die Alterung durch einen sukzessiven Anstieg von oxidativem Stress und daraus resultierenden Schäden, beispielsweise der mtDNA, gekennzeichnet. Mitochondriale Dysfunktionen können in ihrer Entstehung oder auch Konsequenz von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren beeinflusst werden und führen vermutlich zu Beeinträchtigungen der mitochondrialen Bioenergetik und Dynamik. Der daraus resultierende Kreislauf aus ROS und mitochondrialer Dysfunktion wird weiterhin möglicherweise durch die Bildung von A β , hyperphosphoryliertem Tau und Mikroglia-Aktivierung unterstützt. Wird eine individuell bestimmte Grenze überschritten, resultiert ein Zusammenbruch der Energieproduktion und Neurodegeneration (Grimm et al. 2016).

Die postulierten Mechanismen, die zum Alterungsprozess und weiterer Progression zur AD führen, sind in Abb. 1.4 zusammengefasst.

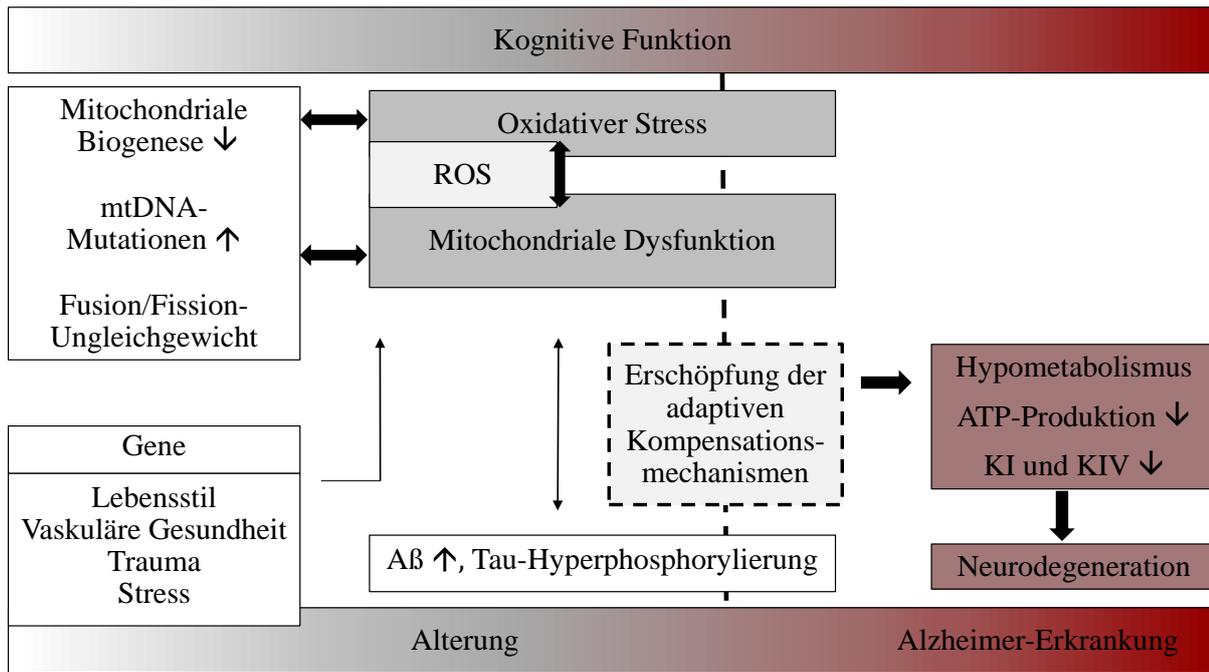


Abb. 1.4: Postulierte Mechanismen der mitochondrialen Dysfunktion bei der Alterung und Progression zur AD. Aβ: β-Amyloid; K: Komplex; mtDNA: mitochondriale DNA; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies

1.3 Nutritive Prävention der Gehirnalterung und Neurodegeneration

Vor dem Hintergrund der steigenden Anzahl alternder Menschen mit Einschränkungen der kognitiven Leistung und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer AD ohne erfolgversprechende Therapie erlangt die Prävention oder Verlangsamung altersabhängiger Veränderungen durch Lebensstilfaktoren enorme Bedeutung (Vauzour 2014; Caruana et al. 2016; Berti et al. 2015; Schaffer et al. 2012). Hinsichtlich der nutritiven Strategien kommt der traditionellen mediterranen Ernährungsweise (*Mediterranean Diet*, MeDi) besondere Bedeutung zu (Caruana et al. 2016). Natives Olivenöl extra (*Extra virgin olive oil*, EVOO) und Traubenprodukte (Rotwein) sind zwei typische Komponenten der MeDi und den enthaltenen Polyphenolen wird eine Schlüsselrolle bei den gesundheitsfördernden Effekten zugesprochen (Vasto et al. 2014; Caruana et al. 2016). Polyphenole verfügen aufgrund ihrer Struktur mit einer oder mehreren Phenolgruppen über weitreichend dokumentierte antioxidative Eigenschaften. Ihnen werden auf dieser Grundlage gesundheitsprotektive Eigenschaften hinsichtlich Krebserkrankungen, Typ-2-Diabetes, Osteoporose, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen zugesprochen (Scalbert et al. 2005). Das neuroprotektive Potenzial von Polyphenolen wurde in den letzten zehn Jahren in einer Reihe von Forschungsarbeiten beschrieben und gelangt zunehmend in den Blickpunkt der Forschung.

1.3.1 Mediterrane Ernährungsweise

Der Begriff der MeDi wurde durch die wegweisenden Arbeiten von Keys und Kollegen geprägt, die in der *Seven Countries* Studie einen Zusammenhang zwischen einer mediterranen Ernährungsweise und einer verminderten Inzidenz von koronaren Herzkrankheiten fanden (Keys 1995; Kromhout et al. 1989; Keys 1966). Es existiert keine genaue Definition der MeDi, sie umfasst aber einheitliche Hauptkomponenten: 1. eine hohe Aufnahme von EVOO, Gemüse einschließlich grünem Blattgemüse, Obst, Getreide, Nüssen, Hülsenfrüchten, 2. eine moderate Aufnahme von Fisch und Geflügel, Milchprodukten und Rotwein sowie 3. eine geringe Aufnahme von Eiern, rotem Fleisch und Süßigkeiten (Davis et al. 2015). Diese typische Ernährungsweise fand man in den 1970er Jahren in Süditalien und Griechenland (besonders Kreta), die Teil der *Seven Countries* Studie waren. Später wurden die gesundheitsförderlichen Effekte in Bezug darauf untersucht, wie stark die Ernährung einer MeDi folgt. Letzteres kann anhand von *MeDi Scores* beurteilt und für Untersuchungen in Regionen außerhalb des mediterranen Raumes genutzt werden (Hoffman and Gerber 2013).

In Bezug auf die neuroprotektiven Eigenschaften konnten Ernährungsweisen, die sich stark an der MeDi orientieren in Kohortenstudien mit einem verlangsamtem altersbedingtem Rückgang der kognitiven Leistung (Tangney et al. 2011; Trichopoulou et al. 2015), einem reduzierten Risiko der Entwicklung einer AD bei bestehender MCI (Scarmeas et al. 2009a), sowie einem reduziertem Risiko für die Neuentwicklung einer AD assoziiert werden (Scarmeas et al. 2006). Wenn auch nicht alle unternommenen Untersuchungen einen solchen Effekt nachweisen konnten, kommen aktuelle systematische Reviews zu dem Schluss, dass eine starke Orientierung an der MeDi ein vielversprechendes Potenzial besitzt, kognitive Funktionen bzw. kognitive Verluste zu verbessern, und das Risiko einer Entwicklung von MCI zu AD zu reduzieren (Singh et al. 2014; Hardman et al. 2016; Selmin et al. 2016).

Neben den epidemiologischen Studien liegen derzeit kaum Daten zu den Effekten der MeDi in gesunden älteren Menschen aus klinischen Studien vor (Knight et al. 2016; Hardman et al. 2016). Bisher untersuchten zwei randomisiert-kontrollierte Studien, die aus der spanischen PREDIMED Studie hervorgegangen sind, den Effekt einer MeDi auf altersbedingte kognitive Verluste. In diesen Untersuchungen an älteren Menschen mit hohem kardiovaskulärem Risiko konnte im Vergleich zu einer fettreduzierten Diät eine Verbesserung der kognitiven Funktion durch eine MeDi supplementiert mit EVOO oder Nüssen festgestellt werden (Martinez-Lapiscina et al. 2013; Valls-Pedret et al. 2015). Weiterhin wurde das Abschneiden in einem der Gedächtnistests mit einer hohen Polyphenolexkretion im Urin assoziiert (Valls-Pedret et al. 2012), die zur Beurteilung der Effekte der Polyphenolaufnahme auf chronische Erkrankungen in epidemiologischen Studien zunehmend Bedeutung erlangt (Zamora-Ros et al.; Zamora-Ros et al. 2014). Diese Daten liefern Hinweise darauf, dass die günstigen Effekte der MeDi zumindest zum Teil auf das reiche Vorkommen von Polyphenolen zurückzuführen sein könnten.

Oliven bzw. Olivenöle verfügen über ein einzigartiges Polyphenolprofil (u.a. Hydroxytyrosol) dessen gesundheitsprotektive Eigenschaften in den letzten Jahren zunehmend in den Blickpunkt der Forschung gelangte (Schaffer et al. 2012; Tapsell 2014; Tresserra-Rimbau et al. 2013). Neben der Evidenz hinsichtlich der positiven Effekte auf die Plasmalipidlevel und oxidative Schäden von Olivenpolyphenolen auf Grundlage dessen von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*, EFSA) ein *Health Claim* erlassen wurde (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies 2011), liegen zunehmend Daten hinsichtlich der Prävention altersbedingter kognitiver Einschränkungen vor.

Die MeDi zeichnet sich zudem durch eine hohe Aufnahme von Obst und Gemüse aus. Prospektive Studien liefern Hinweise, dass die Aufnahme von Gemüse (und in geringerem Umfang Obst) mit einer verbesserten kognitiven Leistung und einem verminderten Risiko für das Auftreten von altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert ist (Commenges et al. 2000; Letenneur et al. 2007; Kang et al. 2005; Barberger-Gateau et al. 2007; Polidori et al. 2009; Vauzour 2014; Dai et al. 2006; Morris et al. 2006; Loef and Walach 2012). Den in Obst und Gemüse weitverbreiteten Polyphenolen wird bei diesen günstigen Beobachtungen eine wichtige Rolle zugesprochen (Barberger-Gateau et al. 2007; Commenges et al. 2000; Letenneur et al. 2007; Kesse-Guyot et al. 2012; Vauzour 2014). In einer kürzlich durchgeführten randomisiert-kontrollierten Studie konnte eine 18-wöchige Intervention mit einer erhöhten Aufnahme von Obst und Gemüse die kognitive Funktion der 26-75-Jährigen nur in der Gruppe verbessern, deren Obst und Gemüse reich an Polyphenolen (> 15 mg Flavonoide/100 g) war. Die verbesserte kognitive Leistung ging mit einer erhöhten BDNF-Serumkonzentration einher, die als möglicher Biomarker für die kognitive Leistung vorgeschlagen wird (Neshatdoust et al. 2016). In einer französischen Kohorte der PAQUID Studie mit Teilnehmern im Alter von ≥ 65 Jahren wurde eine hohe Aufnahme von Polyphenolen (hier Flavonoiden) mit einem verminderten Risiko an einer Demenz zu erkranken sowie einer besseren kognitiven Leistung assoziiert (Commenges et al. 2000; Letenneur et al. 2007).

Eine Untersuchung in der *SUpplementation en Vitamines et Minéraux AntioXydants* (SU.VI.MAX) Kohorte, welche verschiedene kognitive Funktionen bei 45-60-Jährigen 13 Jahre nach der Ernährungserhebung untersuchte, konnte die positiven Effekte einer hohen Polyphenolaufnahme generell bestätigen. Eine detailliertere Analyse deckte jedoch neben positiven Assoziationen einer hohen Aufnahme einzelner Polyphenolgruppen mit der kognitiven Funktion auch negative Assoziationen auf (Kesse-Guyot et al. 2012). Dies macht die Bedeutung der Analyse von Effekten spezifischer Polyphenole deutlich. In Traubenprodukten wie Rotwein findet sich ein komplexes Polyphenolmuster aus Anthocyanen, Flavanolen, Resveratrol und Gallussäure. Die moderate Aufnahme von Rotwein als weitere Komponente der MeDi, wird mit neuroprotektiven Effekten verbunden, die zum Teil den enthaltenen Polyphenolen zugesprochen werden (Solfrizzi et al. 2011; Gerber 2016).

1.3.2 Strukturen, Vorkommen und Aufnahme von Polyphenolen

Polyphenole umfassen mit > 500 verschiedenen Verbindungen, die in der menschlichen Nahrung identifiziert wurden, eine große und sehr heterogene Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe (Perez-Jimenez et al. 2010). In Nahrungsmitteln pflanzlichen Ursprungs wie Tee, Kaffee,

Wein, Obst und Gemüse, Vollkorngetreide sowie Kakao sind sie weit verbreitet. Polyphenole lassen sich, basierend auf der Anzahl an Phenolringen und der strukturellen Elemente, die diese verbinden, in verschiedene Gruppen unterteilen (Manach et al. 2004) (Abb. 1.5).

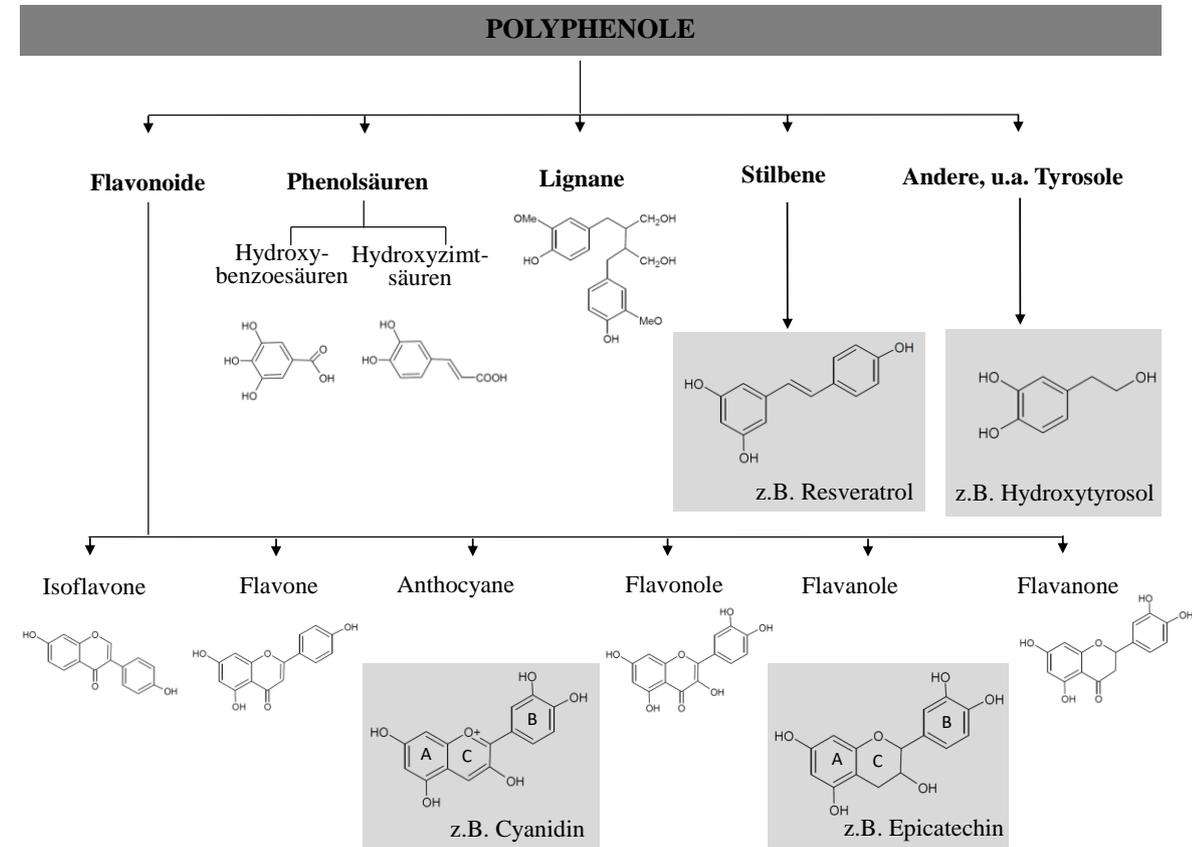


Abb. 1.5: Einteilung und Strukturen der Polyphenole. Grau hinterlegte Verbindungen sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit, modifiziert nach Spencer et al. (2008); Perez-Jimenez et al. (2011).

Die vier Hauptgruppen schließen Phenolsäuren, Flavonoide, Stilbene und Lignane ein. Polyphenole, die nicht diesen Gruppen angehören, werden durch die Gruppe anderer Polyphenole zusammengefasst (Perez-Jimenez et al. 2010). Flavonoide lassen sich ihrerseits in sechs weitere Unterklassen einteilen. Ihre Grundstruktur besteht aus zwei aromatischen Ringen (A und B), welche durch drei C-Atome verbunden sind, die gemeinsam einen Sauerstoff angereicherten heterozyklischen Ring bilden (C). Basierend auf der Struktur des C-Rings werden Flavonole, Flavone, Isoflavone, Flavanone, Anthocyanidine und Flavanole bestehend aus Catechinen und Proanthocyanidinen unterschieden (Manach et al. 2004).

Polyphenole weisen ein sehr unterschiedliches Hydroxylierungsmuster auf. Zu dieser Diversität kommen Polyphenole natürlicherweise bis auf wenige Ausnahmen (Phenolsäuren, Flavanole) als Glycoside vor, können an organische Säuren gebunden oder miteinander verbunden sein.

Ihre Strukturen reichen von simplen Verbindungen wie Phenolsäuren bis hin zu sehr umfangreichen Strukturen, wie die Proanthocyanidin-Polymere (Perez-Jimenez et al. 2010; Zamora-Ros et al. 2016).

Rotwein stellt zusammen mit nativem Olivenöl die Polyphenolquelle dar, deren Polyphenolprofil am meisten untersucht wurde (Perez-Jimenez et al. 2010). Proanthocyanidine sind durch die Bildung von Komplexen mit Speichelproteinen für die adstringierenden Eigenschaften von Früchten und Getränken wie Rotwein verantwortlich. Proanthocyanidine gehören zu den Flavanolinen, welche als monomere Form (Catechine) vorliegen können oder als Dimere, Oligomere oder Polymere von Catechinen (Proanthocyanidine). Für oligomere und polymere Proanthocyanidine liegen momentan noch keine vollständigen Daten vor, sodass ihr Gehalt in den Nahrungsmitteln nicht komplett berechnet werden kann und somit derzeit unterschätzt wird (Perez-Jimenez et al. 2010). Entgegen dieser weitverbreiteten Polyphenole sind beispielsweise die Unterklassen der Anthocyane und Stilbene auf eine geringere Anzahl an Nahrungsmitteln begrenzt. Anthocyane sind Pflanzenpigmente, die vielen pflanzlichen Nahrungsmitteln ihre rote, blaue und violette Farbe verleihen (Manach et al. 2004). Besonders reich an Anthocyanen sind rote bis dunkle Beeren und schwarze Oliven. Auch blaue Trauben und Rotwein enthalten nennenswerte Mengen an Anthocyanen. In Rotwein enthalten sind auch geringe Mengen des Stilbens Resveratrol (Perez-Jimenez et al. 2010). Unter der Gruppe der anderen Polyphenole befinden sich u.a. die Tyrosole. Diese finden sich hauptsächlich in Oliven und Olivenöl mit Konzentrationen von 226 mg/100 g in schwarzen Oliven und 60 mg/100 g in EVOO. Die Hauptkomponenten sind Oleuropein und sein Aglycon, Polyphenole, welche ausschließlich in Olivengewächsen vorkommen und in Abschnitt 1.3.4 näher beschrieben werden.

Diese Diversität und die Abhängigkeit der Gehalte von den eingesetzten analytischen Methoden und der Variation innerhalb eines Lebensmittels erschweren die Erfassung der Polyphenolaufnahme bei der Erforschung der gesundheitsfördernden Effekte (Singh et al. 2008). Die Polyphenolaufnahme ist abhängig von der geographischen Lage und der Nahrungsgewohnheiten, wie dem Konsum von Tee, Kaffee und Wein (Singh et al. 2008).

Die tägliche Aufnahme von Polyphenolen in Europa wurde kürzlich in der *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC) Kohorte erhoben (Zamora-Ros et al. 2016). Die Studie schloss die Länder Dänemark, Frankreich, Deutschland, Griechenland, Italien, Norwegen, Spanien, Schweden, die Niederlande und das Vereinigte Königreich ein und nutzte die Datenbank Phenol-Explorer. Die Berechnung der Polyphenolaufnahme wurde in vielen Studien mittels der Datenbank des *US Department of Agriculture* (USDA) durchgeführt, welche jedoch

hauptsächlich Daten zu Flavonoid-Aglyconen beinhaltet. Seit einigen Jahren existiert mit Phenol-Explorer eine umfangreichere Datenbank, mit 502 verschiedenen Polyphenolen in 452 Nahrungsmitteln (Neveu et al. 2010). Phenol-Explorer wurde weiterhin kürzlich um weitere Daten zu den Effekten der Lebensmittelverarbeitung (Rothwell et al. 2013) sowie zu Pharmakokinetik und Metabolismus (Rothwell et al. 2012) erweitert. In der EPIC Kohorte war die mittlere Polyphenolgesamtaufnahme in Dänemark (1786 mg/Tag [Männer], 1626 mg/Tag [Frauen]) am höchsten und in Griechenland (744 mg/Tag [Männer], 584 mg/Tag [Frauen]) am niedrigsten. Bei der Unterteilung der Kohorte in drei Regionen wurde die höchste Polyphenolaufnahme im Vereinigten Königreich, gefolgt von den nicht-mediterranen Ländern erfasst. Die geringste Polyphenolaufnahme wurde für die mediterranen Länder ermittelt. Hydroxyzimtsäuren (u.a. in Kaffee) und Flavanole (u.a. in Früchten, Tee, Wein) waren die am stärksten aufgenommenen Polyphenole. In mediterranen Ländern waren die Hauptquellen für Polyphenole Kaffee (36 %), Früchte (25 %) und Wein (10 %), in nicht mediterranen Ländern Kaffee (41 %), Tee (17 %) und Früchte (13 %) sowie in der Kohorte des Vereinigten Königreichs Tee (41 %), Kaffee (21 %) und Früchte (9 %) (Zamora-Ros et al. 2016). Hinsichtlich der Gesamtaufnahme an Flavonoiden unterschieden sich die mediterranen Länder von den nicht-mediterranen Ländern nur leicht. Das Vereinigte Königreich hatte hingegen eine fast zweifach höhere Flavonidaufnahme. Dies ist hauptsächlich auf den hohen Anteil an monomeren Flavanolen über den Teekonsum zurückzuführen. Im Gegensatz dazu wurden in den mediterranen Ländern vermehrt Flavonoidklassen aufgenommen, die besonders in Früchten und Fruchtprodukten vorkommen wie Proanthocyanidine und Anthocyane. Weiterhin wurde nur in mediterranen Ländern (bei Männern) eine hohe Aufnahme von Oleuropein (3,3 mg/Tag) nachgewiesen. Eine Beobachtung, die auf dem ausschließlichen Vorkommen von Oleuropein in Oliven- und Olivenöl zurückgeführt werden kann (Zamora-Ros et al. 2016).

In einer früheren Schätzung der Polyphenolaufnahme in der französischen SU.VI.MAX-Kohorte, die auch auf Basis der Phenol-Explorer-Datenbank vollzogen wurde, lag die Gesamtpolyphenolaufnahme bei 1193 ± 510 mg/Tag. Ähnliche Werte wurden auch in dem französischen Kollektiv der EPIC-Studie gefunden. Nach Hydroxyzimtsäuren, stellte in der SU.VI.MAX-Kohorte die Gruppe der Proanthocyanidine mit 227 mg/Tag die zweitgrößte Quelle dar. Olivenpolyphenole stellten in Hinblick auf ihre Aufnahmemenge keine nennenswerte Rolle dar (Perez-Jimenez et al. 2011).

Dies steht im Gegensatz zu einer ersten Erhebung zur Aufnahme von Polyphenolen in Spanien aus einer Kohorte mit hohem kardiovaskulärem Risiko (PREDIMED) (Tresserra-Rimbau et al. 2013). In der spanischen Kohorte machten Polyphenolen aus Oliven und Olivenöl mit 90,4 mg

bei einer Gesamtpolyphenolaufnahme von 820 ± 323 mg einen Anteil von 11 % aus. Auch in dieser Studie wurden Hydroxyzimtsäuren als wichtigste Polyphenolgruppe identifiziert, gefolgt von Flavanonen und Proanthocyanidinen (Rotwein und Äpfel). Hauptquellen waren Kaffee (18 %), Orangen (16 %), Äpfel (12 %), Oliven und Olivenöl (11 %) und Rotwein (6 %) (Tresserra-Rimbau et al. 2013).

Mediterrane Länder zeigen somit gegenüber nicht-mediterranen Ländern keine höhere, sondern eine niedrigere Gesamtpolyphenolaufnahme. Das Polyphenolprofil und die Nahrungsquellen unterscheiden sich jedoch, wie z.B. der Anteil an Trauben- und Olivenpolyphenolen (TOP). Diese Beobachtung liefert weitere Hinweise auf den möglichen Beitrag von diesen spezifischen Polyphenolen hinsichtlich der gesundheitsförderlichen Eigenschaften der MeDi.

1.3.3 Traubenpolyphenole

Nach der Beschreibung des „Französischen Paradox“ – der Beobachtung einer geringeren Mortalität in Folge einer koronaren Herzkrankheit in Frankreich trotz hoher Aufnahme von gesättigten Fettsäuren – die auf den moderaten Weinkonsum zurückgeführt wurde (Renaud and Lorgeil 1992), ist das Forschungsinteresse in Bezug auf die gesundheitsprotektiven Effekte von Wein und dessen Inhaltsstoffen stark angestiegen. Ein günstiger Einfluss von Wein und besonders Rotwein wird im Zusammenhang mit einer Vielzahl von Erkrankungen einschließlich neurodegenerativer Erkrankungen angenommen. Zurückgeführt werden diese Effekte, neben dem Alkohol, auf die enthaltenen Polyphenole (Guilford and Pezzuto 2011).

Rotwein enthält im Vergleich zu Weißwein eine größere Menge und Variation an Polyphenolen. Bei der Herstellung von Rotwein wird im Gegensatz zu Weißwein der Saft der Trauben zusammen mit der Schale und den Kernen fermentiert. Dadurch erlangt der Rotwein nicht nur seine charakteristische Farbe und sein Aroma, sondern auch die meisten seiner Polyphenole, die hauptsächlich in den Schalen und Kernen vorliegen (Sumpio et al. 2016; Waterhouse 2002). Die Hauptvertreter der Polyphenole in Trauben und Wein sind die Flavanole, Flavonole und Anthocyane (Abb. 1.6).

Am meisten tragen die Flavanole zum Gesamtpolyphenolgehalt bei, die in der Schale und den Kernen von Trauben vorliegen. Als monomere Formen finden sich hauptsächlich Catechin und Epicatechin (Waterhouse 2002). Flavanole liegen nicht wie andere Flavonoide als Glycoside vor, können aber mit Gallussäure verestert sein. Hauptsächlich sind jedoch oligomere und polymere Formen der Flavanole vertreten, welche aus mehreren kovalent aneinander gebundenen Flavanol-Einheiten bestehen. Vorwiegend enthalten sind Einheiten von Epicatechin gefolgt von

Catechin (Waterhouse 2002). B-Typ Proanthocyanidine sind über eine Verbindung des oberen Monomers an der Position C-4 mit der nächsten Einheit an C-6 oder C-8 gekennzeichnet. Proanthocyanidine, die nur aus (Epi-)Catechin-Einheiten bestehen, werden als Procyanidine bezeichnet (Clifford and Rio 2012). Die oligomeren und polymeren Formen der Flavanole machen 25-50 % des Phenolgehalts in frischen Weinen, und noch mehr in gereiften Weinen, aus. Der Gehalt in Rotwein liegt bei ca. 0,5-1,5 g/l, in Weißwein bei ca. 10-50 mg/l. Flavanole haben einen adstringierenden Effekt, Catechine schmecken zusätzlich bitter (Waterhouse 2002).

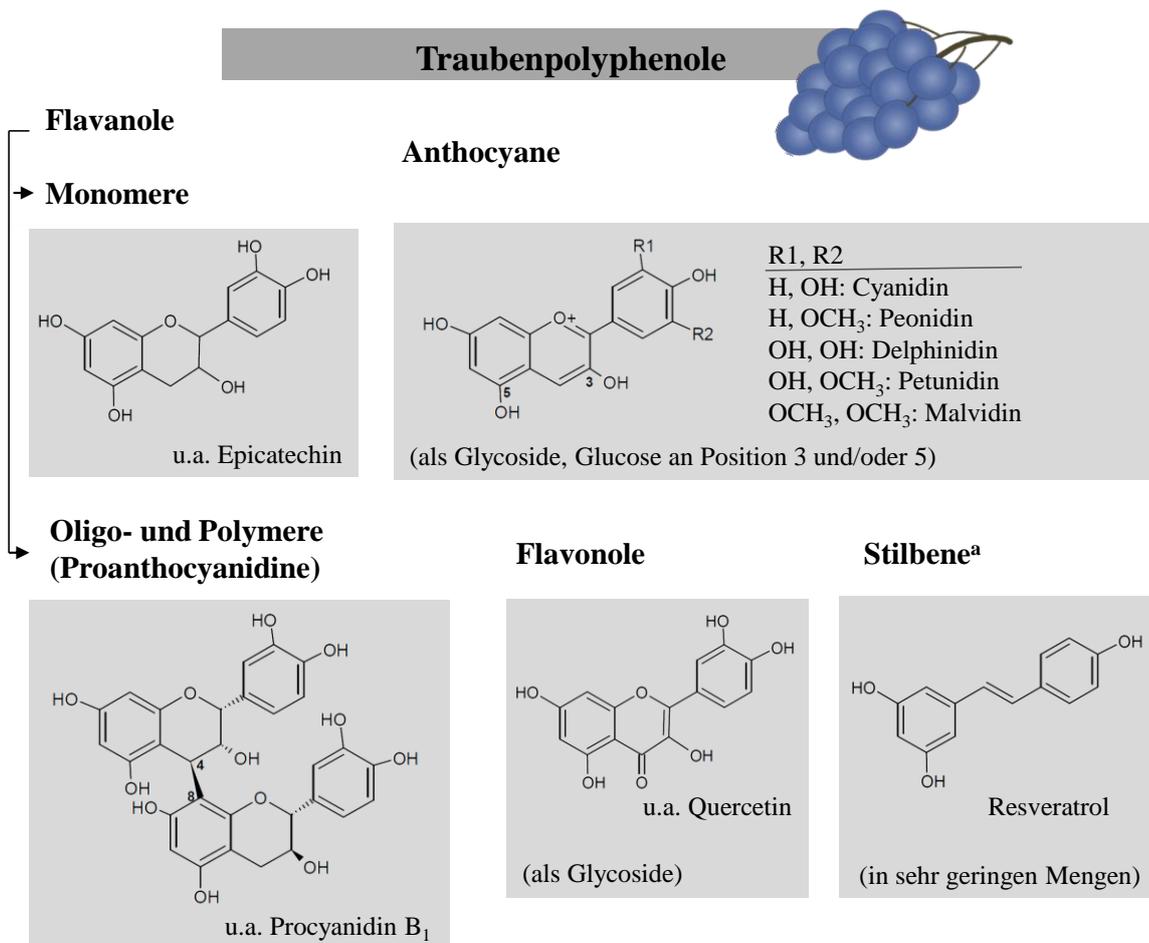


Abb. 1.6: Strukturen der Polyphenole in Trauben und Rotwein. Die Hauptvertreter der Polyphenole in Trauben und Rotwein sind die Flavanole, Flavonole und Anthocyane. Flavanole liegen als Monomere sowie hauptsächlich als Oligo- und Polymere (Proanthocyanidine) vor. ^aStilbene sind nur in sehr geringen Mengen vorhanden, werden hier jedoch aufgrund ihres charakteristischen Vorkommens in Rotwein mit aufgeführt.

Aus der Gruppe der Flavonole befinden sich verschiedene Glycoside von Quercetin, Myricetin und Kämpferol in der Schale der Trauben. Für die roten und blauen Farben der Traubenschalen sind Anthocyane verantwortlich, die auch dem Rotwein seine Farbe verleihen. Ihre Grundstruktur und somit das Aglycon bezeichnet man als Anthocyanidin. Fünf Anthocyanidine liegen in Rotwein vor: Cyanidin, Peonidin, Delphinidin, Petunidin und Malvidin. Anthocyane sind als

Aglycone jedoch instabil und liegen als Glycoside gebunden vor. In *Vitis vinifera* findet sich das einfache 3-Glucosid, in amerikanischen Spezies und Hybriden das 3,5 Diglucosid. Anthocyane können weiterhin mit Acetyl-, Cumaryl- und Caffeylresten verbunden sein (Waterhouse 2002).

Auch Resveratrol ist in geringer Konzentration in Trauben und deutlich höheren Konzentrationen in Rotwein anzutreffen, der mit Abstand die wichtigste Nahrungsquelle für Resveratrol darstellt (Zamora-Ros et al. 2009). Resveratrol ist in der Traubenschale, besonders als 3-O-Glucosid in der *cis*- oder *trans*-Form enthalten. Im Wein kann der Resveratrolgehalt in Abhängigkeit von seiner Konzentration in der Traube und dem Weinherstellungsprozess außerordentlich variieren (Vitaglione et al. 2012). Die Urinexkretion von Resveratrol wurde auf Grundlage einer Untersuchung in der PREDIMED-Kohorte als geeigneter Biomarker für die Rotweinaufnahme vorgeschlagen (Zamora-Ros et al. 2009). Die geringen Mengen an Resveratrol, die über die Aufnahme von Rotwein aufgenommen werden, sind jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit nicht ausreichend, um den vielfach postulierten protektiven Effekt von Rotwein durch das enthaltene Resveratrol zu stützen. Die in Tierstudien beobachteten günstigen Effekte von Resveratrol wurden durch Mengen erreicht, die eine Aufnahme von > 60 l Rotwein erfordern würden (Vitaglione et al. 2012; Corder et al. 2003; Del Rio et al. 2013). In Tab. 1.1 sind die Polyphenolkonzentrationen und die hauptsächlichen Verbindungen in Rotwein aufgeführt.

Tab. 1.1: Polyphenolkonzentrationen in Rotwein. Basierend auf den Daten der Phenol-Explorer-Datenbank (Boto-Ordonez et al. 2014).

	Konzentration (mg/100 ml)	Spannweite (mg/100 ml)	Hauptsächliche Verbindungen
Flavanole	40,1	31 - 87	Proanthocyanidin Oligomere > (+)-Catechin > (-)-Epicatechin
Anthocyane	22,3	1 - 77	Malvidin-3-O-Glucosid > Malvidin-3-O-(6''-Acetyl-Glucosid) > Malvidin-3-O-(6-p-Cumaryl-Glucosid)
Flavonole	6,9	2 - 15	Quercetin-3-O-Rhamnosid > Quercetin-3-O-Glucoside > Quercetin
Dihydroflavonole	5,4	4 - 6	Dihydromyricetin 3-O-Rhamnosid
Hydroxycinnamonsäuren	10,0	1 - 22	Caffeoylweinsäure > 2,5-Di-S-Glutathionyl-Caftarsäure
Hydroxybenzoesäuren	7,01	1 - 4	Gallussäure
Stilbene	3,41	0,6 - 14	Piceatannol-3-O-Glucosid > d-Viniferin > Resveratrol-3-O-Glucosid
Tyrosole	3,65	1 - 5	Tyrosol

Eine Reihe von Studien an Ratten und Mäusen liefern Hinweise darauf, dass die Aufnahme von polyphenolreichen Fruchtprodukten, im Besonderen von Blaubeeren, ein vielversprechendes neuroprotektives Potenzial aufweist (Schaffer et al. 2012; Asseburg et al. 2014; Pasinetti et al.

2015). In den letzten Jahren werden zudem zunehmend günstige Effekte von Traubenprodukten veröffentlicht, die in Nagetiermodellen mit induziertem oxidativem Stress (Allam et al. 2013; Cardozo et al. 2013, 2013), an gealterten Tieren (Patki et al. 2015; Pervin et al. 2014) oder in Modellen der AD (Wang et al. 2008; Ho et al. 2009; Pasinetti et al. 2015) durchgeführt wurden. Gestärkt werden diese Hinweise von ersten Pilotstudien am Menschen, die eine Verminderung von altersbedingten kognitiven Defiziten (Krikorian et al. 2012; Krikorian et al. 2010; Lee et al. 2017) zeigen konnten sowie eine Verminderung von oxidativem Stress (Ghanim et al. 2011). Traubenpolyphenole könnten somit einen Einfluss auf die mitochondriale Dysfunktion bei der Alterung haben und so vor altersbedingten Funktionsverlusten und Neurodegeneration schützen.

1.3.4 Olivenpolyphenole

Natives Olivenöl (*Virgin olive oil*, VOO) stellt die wichtigste Quelle für Fett in der MeDi dar und verfügt neben den einfach ungesättigten Fettsäuren über ein einzigartiges Polyphenolprofil mit gesundheitsfördernden Eigenschaften, die in den letzten Jahren zunehmend in den Blickpunkt der Forschung gelangten (Schaffer et al. 2012; Tapsell 2014; Tresserra-Rimbau et al. 2013). Besonders hervorzuheben sind die vielfach berichteten günstigen Effekte von Olivenpolyphenolen auf die Plasmalipidlevel und oxidative Schäden. Auf Grundlage der Evidenz wurde von der EFSA ein *Health Claim* erlassen (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies 2011). Oliven enthalten sogenannte Secoiridoide, welche nur in Pflanzen vorkommen, die zur Familie der Ölbaumgewächse (*Oleaceae*), einschließlich dem Olivenbaum (*Olea europaea* L.) gehören. Secoiridoide sind typischerweise an Glycoside gebunden und stellen den Hauptteil der Phenolfraktion in Ölgewächsen da. Charakterisiert werden Secoiridoide durch das Vorkommen der Elonischen Säure in ihrer glycosylierten oder Aglycon-Form (Preedy 2010). Oliven enthalten hauptsächlich die Glycoside Oleuropein und Ligstrosid (Vissers et al. 2004), deren Strukturen in Abb. 1.7 dargestellt sind. Die polaren Verbindungen stellen die Ester von Elonischer Säure mit einem Phenylethylalkohol dar. Im Fall von Oleuropein erfolgt die Veresterung mit 3,4-Dihydroxyphenylethanol (Hydroxytyrosol), im Fall von Ligstrosid mit 4-Hydroxyphenylethanol (Tyrosol). Das Phenolprofil in der Olivenfrucht ist jedoch nicht vergleichbar mit den Phenolen, die in VOO vorkommen (Vissers et al. 2004; Preedy 2010).

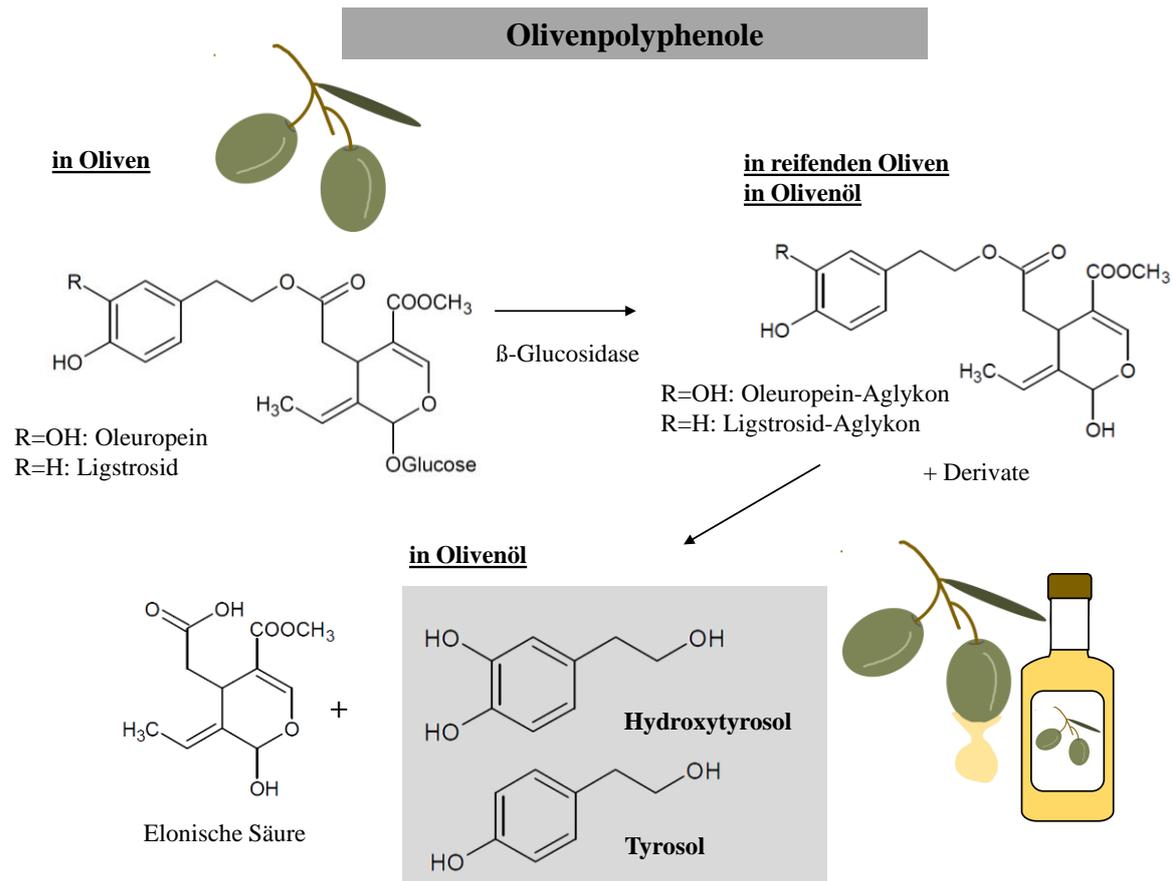


Abb. 1.7: Phenolstrukturen in Oliven und Olivenöl. Oliven enthalten hauptsächlich die Secoiridoid-Glycoside Oleuropein und Ligstroside, welche während Reifungs- und Verarbeitungsprozessen zu ihren Aglyconen und einer Reihe von Derivaten abgebaut werden. Durch Hydrolyse der Aglycone entstehen die Phenolalkohole Hydroxytyrosol und Tyrosol, modifiziert nach Vissers et al. (2004).

Die Glycoside werden während des Reifungsprozesses der Olive und während des Herstellungsprozesses des VOO durch endogene β -Glucosidasen zu ihren Aglyconen und einer Reihe von Derivaten abgebaut, welche die phenolischen Hauptkomponenten in Olivenöl darstellen (Vissers et al. 2004). Veresterungen der Dialdehydform der Elonischen Säure mit Hydroxytyrosol oder Tyrosol, ein Isomer des Oleuropein-Aglycons, und das Ligstroside-Aglycon sind die am stärksten vertretenen Secoiridoide in VOO, die zum ersten Mal von Montedoro et al. identifiziert wurden (Montedoro et al. 1992; Montedoro et al. 1993; Piroddi et al. 2017; Preedy 2010). Die Secoiridoid-Aglycone können durch Hydrolyse der Aglycone weiter zu Hydroxytyrosol und Tyrosol abgebaut werden (Vissers et al. 2004). Die Konzentration von Hydroxytyrosol und Tyrosol ist generell in frischen Ölen niedrig, steigt jedoch mit der Lagerungszeit (Servili et al. 2004). Secoiridoide werden mit der bitteren und scharfen Note von Olivenöl in Zusammenhang gebracht (Servili et al. 2009). Die mittlere Hydroxytyrosol-Konzentration wird in der

Phenol-Explorer Datenbank mit 0,77 mg/100 g in EVOO und 56 mg bzw. 66 mg/100 g in grünen bzw. schwarzen Oliven angegeben (Phenol-Explorer 2017). Abb. 1.7 zeigt die beschriebenen Abbauprozesse und entstehenden Strukturen in Oliven und Olivenöl.

Im Gegensatz zu der begrenzten Menge an freiem Hydroxytyrosol, das mit Oliven und Olivenöl aufgenommen wird, finden sich hohe Mengen an freiem Hydroxytyrosol in den Abfällen der Olivenölherstellung (Fernández-Bolaños et al. 2002; Allouche et al. 2004; Marco et al. 2007). Während nur ca. 2 % der Olivenphenole in der späteren Ölphase wiederzufinden sind, befinden sich 53 % der Olivenphenole im Abfallwasser (*Olive oil mill wastewater*, OMWW) und ca. 45 % im Trester. OMWW wird zunehmend als Quelle für Olivenphenole herangezogen, die in Nahrungsergänzungsmitteln, Nahrungsmitteln, Getränken, Kosmetika und pharmazeutischen Produkten Anwendung finden. Neben OMWW können Olivenpolyphenole aus einer Reihe von olivenbasierten Ausgangsmaterialien einschließlich der Olivenfrucht und Olivenblättern hergestellt werden. In den meisten dieser Extrakte befindet sich Hydroxytyrosol als aktive Hauptkomponente (Ciriminna et al. 2016; Preedy 2010).

Das neuroprotektive Potenzial von Olivenpolyphenolen gelangt zunehmend in den Blickpunkt der Forschung. In Mausmodellen konnte die Nahrungsanreicherung mit polyphenolreichem EVOO altersbedingte kognitive und motorische Beeinträchtigungen verbessern und vor oxidativem Stress schützen (Farr et al. 2012; Pitozzi et al. 2012). OMWW-Extrakte zeigten Effekte auf die mitochondriale Funktion, oxidativen Stress und AD-bedingte kognitive Beeinträchtigungen (Schaffer et al. 2007). In dem neuronenhähnlichen Zellmodell PC12 zeigte OMWW-Extrakt zellprotektive Eigenschaften, die auf Grundlage von Korrelationsanalysen vermutlich dem enthaltenen Hydroxytyrosol zuzusprechen sind (Schaffer et al. 2010). Auch Hydroxytyrosol als Reinsubstanz konnte in Mausmodellen vor mitochondrialen Dysfunktionen beim metabolischen Syndrom und der AD schützen (Cao et al. 2014; Peng et al. 2016a). Hydroxytyrosol könnte somit im Hinblick auf die frühe Prävention von altersbedingter mitochondrialer Dysfunktion und Neurodegeneration eine potente Verbindung darstellen.

1.3.5 Metabolismus und Bioverfügbarkeit von Polyphenolen

Voraussetzung für die Bioaktivität von Polyphenolen ist, mit Ausnahme von direkten Effekten im Gastrointestinaltrakt, deren Absorption und Transport zum Zielort. Eine Verbesserung der Gesundheit durch die Aufnahme von Polyphenolen mit der Nahrung ist somit abhängig von der Bioverfügbarkeit der Polyphenole. In den letzten 15 Jahren wurden daher eine Vielzahl von

Untersuchungen, nicht nur hinsichtlich der Bioaktivität und dem Vorkommen von Polyphenolen unternommen, sondern auch hinsichtlich ihres Metabolismus und ihrer Bioverfügbarkeit. Im menschlichen Körper befindliche Polyphenole sind vermutlich nicht die gleichen, die auch in der Nahrung vorliegen (Rothwell et al. 2016; Manach et al. 2004). Die gesundheitsfördernden Effekte der Polyphenole könnten somit zum Großteil über ihre Metabolite vermittelt werden (Aura 2012).

Die Absorption von Polyphenolen hängt von ihrer Struktur (Glycosylierung, Molekulargewicht, Veresterung) ab (Aura 2012; Kay et al. 2009). Es verstärken sich die Hinweise, dass ein Großteil der Polyphenole unabsorbiert den Dickdarm erreicht und hier umfangreichen mikrobiellen Prozessen ausgesetzt ist. Zudem werden Polyphenole im menschlichen Körper als Xenobiotika behandelt und unterliegen folglich dem Phase-II-Stoffwechsel. Nach der Aufnahme sind Polyphenole somit Phase-II Enzymen einschließlich Sulfotransferasen, Uridin-5'-Diphosphatglucuronosyltransferasen und Catechol-*O*-Methyltransferasen im Darm, der Leber, der Niere und den Geweben ausgesetzt, durch welche Sulfat-, Glucuronid- und/oder Methylmetabolite entstehen (Boto-Ordonez et al. 2013); (Del Rio et al. 2013; Clifford and Rio 2012). Dieser Prozess begünstigt ihre Ausscheidung über die Galle und den Urin durch die Steigerung der Hydrophilität (Manach et al. 2004). Hepatische Metabolite können zudem über den enterohepatischen Kreislauf nach Dekonjugation im Dickdarm wieder absorbiert werden (Aura 2012). In Hinblick auf die Vermittlung von direkten neuroprotektiven Effekten ist weiterhin das Erreichen des Gehirns von essentieller Bedeutung. Der aktuelle Kenntnisstand zur Absorption, dem Metabolismus und der Bioverfügbarkeit von TOP ist im Folgenden näher dargestellt und wird ergänzend zum Ende des Kapitels visuell zusammengefasst.

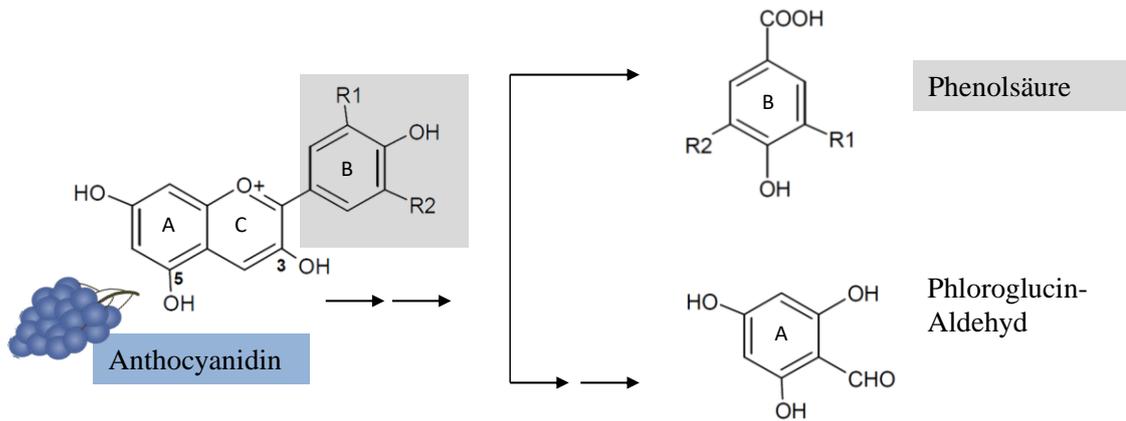
1.3.5.1 Absorption von Traubenvpolyphenolen in Magen und Dünndarm

Die Absorption von Traubenvpolyphenolen ist anhängig von der zugehörigen Polyphenolklasse und deren Eigenschaften. Eine direkte Absorption im oberen Gastrointestinaltrakt ist generell für weniger komplexe Polyphenole, die nicht an Zucker gebunden sind, möglich (Boto-Ordonez et al. 2013; Manach et al. 2004). Dies ist für *trans*-Resveratrol beschrieben, welches im Magen und Dünndarm aufgenommen werden kann und nachfolgend umfangreich über den Phase-II-Stoffwechsel metabolisiert wird (Vitaglione et al. 2012). Hauptsächlich werden Resveratrol-Glucuronide und -Sulfate in Plasma und Urin detektiert (Rotches-Ribalta et al. 2012b; Cottart et al. 2010; Boocock et al. 2007; Patel et al. 2010). Die Konzentrationen, die sich im Körper nach Aufnahme physiologischer Mengen (≤ 25 mg) über beispielsweise Rotwein- oder Traubensaft wiederfinden lassen, sind jedoch äußerst gering, sodass die Vermittlung von gesund-

heitsfördernden Effekten von Resveratrol kontrovers diskutiert wird (Corder et al. 2003; Vitaglione et al. 2012; Vitaglione et al. 2005; Ortuño et al. 2010). Effekte höherer systemischer Level nach oraler Einnahme pharmakologischer Dosen werden vorgeschlagen (Patel et al. 2010; Vitaglione et al. 2012; Cottart et al. 2010).

Für glycolysierte Traubenpolyphenole wie Anthocyane, Flavonol- und Resveratrol-Glycoside wird eine Hydrolyse zu ihrer Aglyconform im Dünndarm beschrieben, sodass diese als Folge ihrer erhöhten Lipophilie durch passive Diffusion absorbiert werden. Die Deglycosylierung könnte an der Bürstensaummembran über die Laktat-Phloridzin-Hydrolase (LPH) erfolgen (Day et al. 2000), oder alternativ durch die zytosolische β -Glucosidase (CBG), die einen vorgeschalteten Transport in die Epithelzelle über Glucosetransporter voraussetzt (Del Rio et al. 2013; Gee et al. 2000; Nemeth et al. 2003).

Anthocyane entgehen dieser Deglycosylierung zu einem beträchtlichen Anteil und gelangen unverändert in den Kreislauf (Rothwell et al. 2016), vermutlich über Bilitranslokase-Membranproteine (Rothwell et al. 2016; Passamonti et al. 2009). Der Anteil absorbierter Anthocyane wird jedoch sehr gering eingeschätzt. Ein großer Anteil der Anthocyane zerfällt vermutlich nach Aufnahme in den Gastrointestinaltrakt durch die Instabilität bei neutralem pH-Wert zu charakteristischen Hydroxybenzoesäuren des B-Rings (Kay et al. 2009), wie in Abb. 1.8 dargestellt ist. Gleiches kann für Anthocyane erfolgen, die intakt in den Dickdarm gelangen und von der Mikrobiota abgebaut werden (Aura 2012; Aura et al. 2005). Aus dem in Rotwein und Trauben vorrangig zu findenden Malvidin entsteht beispielsweise Syringasäure (4-Hydroxy-3,5-Dimethoxybenzoesäure) (Fleischhut et al. 2006; Aura 2012). Die aus Cyanidin entstehende Phenolsäure Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure) wurde als Hauptmetabolit im Blutkreislauf von Probanden detektiert, die zuvor hauptsächlich Cyanidin-3-Glucosid über 1 l Blutorangensaft aufnahmen (Vitaglione et al. 2007). Weiterhin hängt die Absorption und der Metabolismus der Anthocyane vermutlich wesentlich von der Aglyconstruktur und dem gebundenen Zucker ab (Prior 2012; Talavera et al. 2004; Prior and Wu 2006). Nach Aufnahme von Concord-Traubensaft gelangten abhängig von der Struktur 13-34 % der Anthocyane in den Dickdarm und 0,16 % der Anthocyane (als 3-Glycoside oder Glucuronide) wurden mit dem Urin ausgeschieden. Maximale Plasmakonzentrationen variierten zwischen 1-2 nmol/l (Stalmach et al. 2012).



Anthocyanidin	Korrespondierende Phenolsäure	R1	R2
Pelargonidin	4-Hydroxybenzoesäure	H	H
Cyanidin	Protocatechusäure	OH	H
Delphinidin	Gallussäure	OH	OH
Peonidin	Vanillinsäure	OCH ₃	OH
Malvidin	Syringasäure	OCH ₃	OCH ₃

Abb. 1.8: Degradation von Anthocyanen bei neutralem pH oder Mikrobiota-Einfluss. Modifiziert nach Kern et al. (2007); Fleschhut et al. (2006).

Anders als die meisten anderen Traubenflavonoide liegen Flavanole nicht an Zucker gebunden vor, sondern direkt als Aglycone. Monomere (Epi-)Catechine können somit im Dünndarm aufgenommen werden und unterliegen einem umfangreichen Phase-II-Metabolismus. Ihre Exkretionsraten variieren in Studien zwischen 1-55 % (Wiese et al. 2015). Auch geringere Anteile an dimeren Traubenflavanolen können vermutlich absorbiert werden. Humanstudien mit proanthocyanreichem Traubenkernextrakt (Sano et al. 2003) und purem Proanthocyanidin B1 (Wiese et al. 2015) weisen auf eine Absorption von B1-Dimeren hin, jedoch mit einer 100-fach niedrigeren Bioverfügbarkeit gegenüber Monomeren. Eine Absorption von oligomeren Flavanolen mit einem Polymerisationsgrad von > 3 sowie von polymeren Formen kann vermutlich nicht erfolgen (Munoz-Gonzalez et al. 2013; Clifford and Rio 2012; Del Rio et al. 2013; Monagas et al. 2010).

1.3.5.2 Metabolismus von Traubenpolyphenolen durch die Mikrobiota im Dickdarm

Nicht absorbierte Polyphenole, wie Proanthocyanidine, gelangen in den Dickdarm und unterliegen einem umfangreichen Abbau durch die vorliegende Mikrobiota. Die Darmbakterien kön-

nen Polyphenole durch Hydrolyse, Ringöffnung, Decarboxylierung, Demethylierung, Reduktion und Dehydroxylierung zu einer Vielzahl neuer Verbindungen metabolisieren, welche wiederum absorbiert und nachfolgend dem Phase-II-Stoffwechsel unterliegen können (Boto-Ordonez et al. 2013).

Proanthocyanidine unterliegen im Dickdarm vermutlich einem extensiven mikrobiellen Abbau, der bisher nur zum Teil aufgeklärt ist (Del Rio et al. 2013). Nach der Gabe von ^{14}C -markiertem Procyanidin B2 Dimer wurde bei Ratten ca. 60 % der Radioaktivität über 96 h im Urin ausgeschieden. Es wurden hauptsächlich Formen nachgewiesen, die durch mikrobielle Prozesse entstanden sind (Stoupi et al. 2010). B-Typ Procyanidine werden vermutlich über einen komplexen Prozess einschließlich Laktonisierungs-, Decarboxylierungs-, Dehydroxylierungs- und Oxidationsreaktionen abgebaut. Es liegen eine Reihe von Hinweisen aus *in vitro* Fermentationsexperimenten und *in vivo* Studien vor, aus denen mögliche Abbauprozesse von monomeren und dimeren Strukturen der Proanthocyanidine konstruiert werden können (Monagas et al. 2010). Die Abbauprozesse sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt und Abb. 1.9 zeigt einen Überblick über die grundlegenden postulierten Abbauprozesse von Procyanidin-Dimeren.

Zum kleinen Anteil können Procyanidine vermutlich von der Mikrobiota durch das Aufbrechen der Interflavan-Bindung zu Catechin und Epicatechin gespalten werden und gemeinsam mit den mit der Nahrung aufgenommenen Monomeren über eine Ringöffnung abgebaut werden (Boto-Ordonez et al. 2013). Ein hoher Anteil der mikrobiellen Abbauprozesse verlaufen vermutlich jedoch ohne einem Flavanol-Monomer als Zwischenprodukt (Clifford and Rio 2012; Stoupi et al. 2010; Monagas et al. 2010). Appeldorn et al. postulieren zum einen eine Öffnung des C-Rings der oberen Einheit des B-Typs, die zur Bildung von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) führt, zum anderen die Bildung von 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton aus der unteren Einheit (Appeldoorn et al. 2009). Über den Abbau des Hydroxyphenylvalerolaktons könnte wiederum DOPAC entstehen (Monagas et al. 2010). Die Bildung des charakteristischen 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolaktons und die sukzessiven Abbauprozesse werden für monomere und dimere Flavanole gleichermaßen beschrieben. Durch die Öffnung des Laktonrings entstehen im Folgenden verschieden hydroxylierte Phenylvaleriansäuren, die im Weiteren zu Phenylpropionsäuren und Hydroxybenzoesäuren abgebaut werden können (Wiese et al. 2015; Monagas et al. 2010).

Einleitung

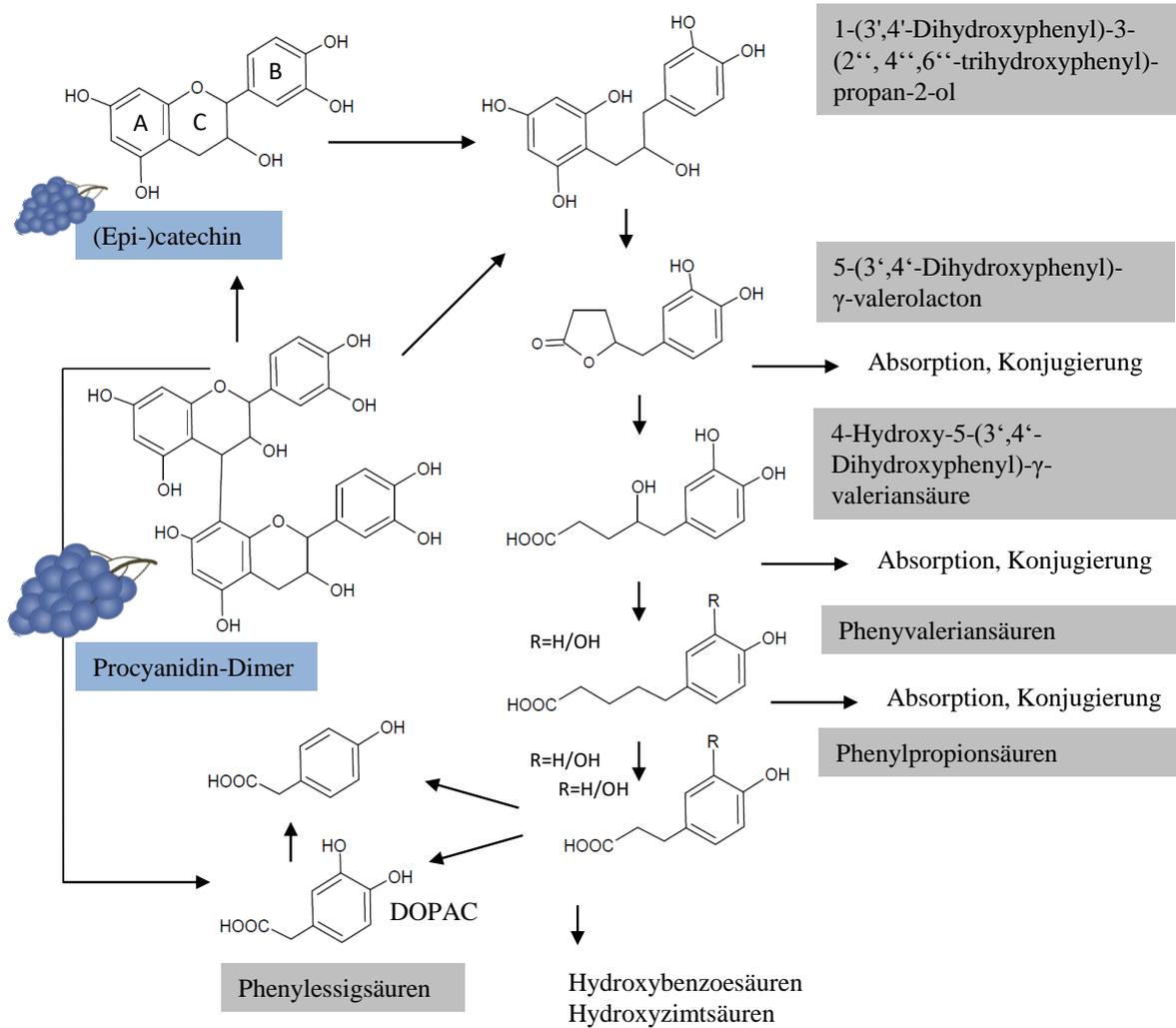


Abb. 1.9: Mögliche Abbaumechanismen von Procyanidinen durch die Mikrobiota. Basierend auf Monagas et al. (2010); Wiese et al. (2015).

Eine kürzlich durchgeführte Humanstudie von Wiese et al. (2015) detektierte 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton in hoher Konzentration in Plasma und Urin und somit als hauptsächlichen Metabolit nach Aufnahme von purem Epicatechin oder Procyanidin B1. Demgegenüber konnte nur in zwei von sieben Probanden eine erhöhte Plasma- und Urinkonzentration des Laktons nach Aufnahme von polymeren Procyanidinen, die aus Kakao isoliert wurden, detektiert werden. Dies verstärkt die Vermutung der erschwerten Aufnahme von polymeren Procyanidinen (Wiese et al. 2015).

Auch Polyphenole, die generell im Dünndarm absorbiert werden können, wie beispielsweise Anthocyane oder monomere Flavanole, gelangen vermutlich zum großen Anteil in den Dickdarm und werden mikrobiell abgebaut (Del Rio et al. 2013). Bei Ileostomie-Patienten wurden nach Aufnahme von Concord-Traubensaft 40 % der (Poly-)phenole in der ilealen Flüssigkeit wiedergefunden (Stalmach et al. 2012).

Für Traubenpolyphenole werden somit generell strukturelle Transformationen und Abbauprozesse durch die Mikrobiota beschrieben, die eine Vielzahl von Abbauprodukten zur Folge haben. Die hauptsächlichen Metabolite, die in Human- und Tierstudien identifiziert wurden, sind Hydroxybenzoesäuren, Hydroxyzimtsäuren und Flavanole (Boto-Ordonez et al. 2014). Für Resveratrol wird eine mikrobielle Transformation zu Dehydroresveratrol beschrieben (Vitaglione et al. 2012; Rotches-Ribalta et al. 2014; Rotches-Ribalta et al. 2012a).

Boto-Ordonez et al. lieferten kürzlich umfangreiche Informationen zu den möglichen *in vivo* Metaboliten von Traubenpolyphenolen anhand der pharmakokinetischen Daten aus der Phenol-Explorer Datenbank (Boto-Ordonez et al. 2014) sowie einer Humanstudie, in der die Urinexkretion nach 4-wöchiger Aufnahme von 272 ml entalkoholisiertem Rotwein analysiert wurde (Boto-Ordonez et al. 2013). Stalmach et al. untersuchten weiterhin die Abbauprozesse der Polyphenole aus Concord-Traubensaft durch eine *in vitro* Fermentation mit humanen Stuhlproben und verglichen diese mit Metaboliten, die nach Aufnahme des Safts im Urin ausgeschieden wurden (Stalmach et al. 2013). Neben der Detektion von konjugiertem (Epi-)Catechin konnte eine signifikante Steigerung der Urinexkretion mikrobieller Metabolite einschließlich (konjugierter) Hydroxyphenylvalerolactonen, (konjugierter) Hydroxyphenylpropionsäuren, Hydroxyzimtsäuren, Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyphenylelessigsäuren identifiziert werden (Boto-Ordonez et al. 2013; Stalmach et al. 2013). Die aus dem Abbau von Proanthocyanidinen entstehenden Hydroxyphenylvalerolactone, zusammen mit den in Traubenprodukten befindlichen Flavonolen und Hydroxyzimtsäuren werden vermutlich zu Phenylpropionsäuren umgesetzt. Letztere können weiter zu Hydroxybenzoesäuren verarbeitet werden (Stalmach et al. 2013; Boto-Ordonez et al. 2014). Darüber hinaus ist der Abbau von Quercetin und Anthocyanen eine wichtige Quelle für Hydroxybenzoesäuren. Die am stärksten exkretierte Hydroxybenzoesäure in der Studie von Boto-Ordonez et al. war Syringasäure, die das vornehmliche Abbauprodukt von Malvivin-3-Glucosid, dem Hauptanthocyan in Trauben und Wein, darstellt. Syringasäure kann zu Gallussäure umgeformt werden, einem originären Traubenpolyphenol, welches weiter zu Pyrogallol metabolisiert werden kann (Boto-Ordonez et al. 2014).

Weiterhin wurden nach Rotwein und Traubensaftaufnahme signifikante Mengen an Hydroxyphenylelessigsäuren einschließlich DOPAC detektiert (Boto-Ordonez et al. 2014; Boto-Ordonez et al. 2013). Hydroxyphenylelessigsäuren können aus dem Abbau von Proanthocyanidinen (Abb. 1.9) oder generell aus dem Umsatz von Hydroxyphenylpropionsäuren oder Quercetin hervorgehen. Ein weiterer Ursprung für Hydroxyphenylelessigsäuren sind Tyrosol und Hydroxytyrosol (Kapitel 1.3.5.3), die in kleinen Mengen in Wein vorhanden sind (Boto-Ordonez et al. 2013;

Boto-Ordóñez et al. 2014). Jacobs et al. (2012) detektieren nach viertägiger Aufnahme von einem Mix aus Rotwein- und Traubenextrakt Syringasäure, Pyrogallol, 3-Hydroxyphenylacessigsäure, 3-Hydroxyphenylpropionsäure und 3-Hydroxyhippursäure als Hauptmetaboliten im Urin. (Hydroxy)hippursäuren sind die primären Endprodukte einer Reihe verschiedener Flavonoide. Zudem liegen viele potenzielle Abbauprodukte auch originär in Wein und Trauben vor (Jacobs et al. 2012).

Die beschriebenen Abbauprozesse machen die Komplexität der strukturellen Transformation der Traubenvpolyphenole im menschlichen Organismus deutlich. Die mikrobiell entstehenden Phenolsäuren können ihren Ursprung in einer Vielfalt von Polyphenolen haben (Rothwell et al. 2016).

1.3.5.3 Absorption und Metabolismus von Olivenpolyphenolen

Visioli et al. waren die Ersten, die in einer Humanstudie Hydroxytyrosol und Tyrosol im Urin detektierten und nach Aufnahme von Olivenöl mit verschieden hoch konzentrierter Olivenphenolextraktanreicherung eine dosisabhängige Absorption feststellten (Visioli et al. 2000).

Hinsichtlich der Aufnahme von komplexeren Secoiridoiden wird vermutlich unter den sauren Bedingungen des Magens weiteres Hydroxytyrosol nach Freisetzung aus Secoiridoid-Aglyconen wie Oleuropein-Aglycon für die nachfolgende Absorption verfügbar (Corona et al. 2009; Vissers et al. 2002b). Die Detektion von intakten Secoiridoid-Aglyconen im Plasma zeigt zudem eine mögliche Absorption dieser Verbindungen (Suárez et al. 2011). Hydroxytyrosol aus Secoiridoid-Glycosiden kann vermutlich durch die Mikrobiota im Kolon nach Abspaltung des Zuckers freigesetzt werden (Corona et al. 2009; Vissers et al. 2002a; Corona et al. 2006; Vissers et al. 2004; Vissers et al. 2002b, 2002a, 2002a).

Als weniger komplexe Olivenphenole, die keine gebundenen Zucker haben, werden Hydroxytyrosol und Tyrosol hauptsächlich im Dünndarm absorbiert, sind aber aufgrund ihres umfangreichen Phase-II-Metabolismus zu Glucuroniden und Sulfokonjugaten nach Aufnahme physiologischer Mengen von Olivenöl in nur sehr geringer Konzentration zu detektieren (Vissers et al. 2002a; Corona et al. 2009; Pastor et al. 2016). Zudem finden vermutlich weitere enzymatische Transformationen statt, die neben der Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT), durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) und Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) vermittelt werden. D'Angelo et al. konnten bei Ratten über 90 % von oral aufgenommenem ¹⁴C-markiertem Hydroxytyrosol im Urin detektieren und postulierten Homovanillinalkohol, Homovanillinsäure, 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd (DOPAL) und DOPAC sowie Sulfatkonjugate als mögliche Metabolite von Hydroxytyrosol (D'Angelo et al. 2001). Die Entstehung von DOPAC

ist auch aus dem endogenen Dopaminstoffwechsel bekannt, bei dem die Monoaminoxidase die Umwandlung von Dopamin zu DOPAL katalysiert, welches wiederum nachfolgend durch die ALDH zu DOPAC oxidiert wird. Ein kleiner Teil wird zudem durch die Aldehydreduktase zur endogenen Form von Hydroxytyrosol, bekannt als 3,4-Dihydroxyphenylethanol (DOPET), umgebaut (Rodriguez-Morato et al. 2015). Der vorgeschlagene enzymatische Metabolismus von Hydroxytyrosol ist in Abb. 1.10 dargestellt.

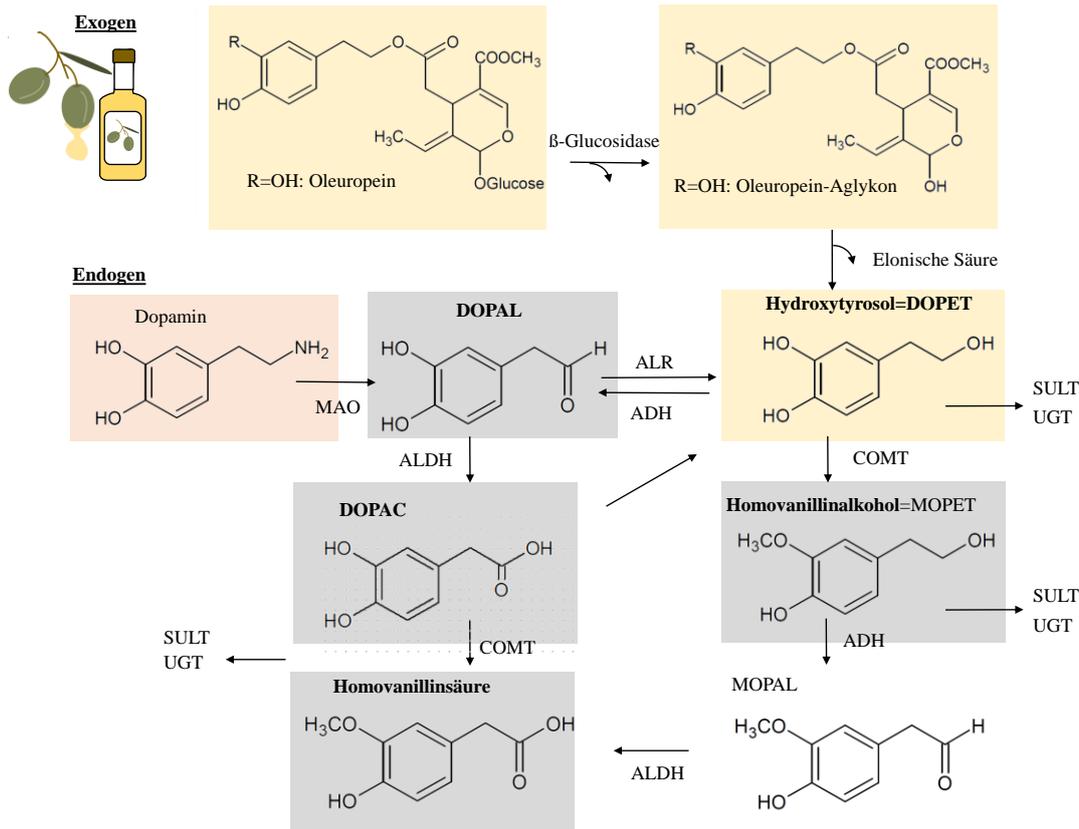


Abb. 1.10: Postulierter Metabolismus von Hydroxytyrosol. ADH: Alkoholdehydrogenase; ALDH: Aldehyd-Dehydrogenase; ALR: Aldehydreduktase; DOPAC: 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd; DOPAL: 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd; DOPET: 3,4-Dihydroxyphenylethanol; MAO: Monoaminoxidase; MOPAL: 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylacetaldehyd; MOPET: 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylethanol; erstellt basierend auf D'Angelo et al. (2001); Rodriguez-Morato et al. (2015); Suárez et al. (2011).

Hydroxytyrosol-Metabolite des postulierten Stoffwechsels konnten in verschiedenen Humanstudien nach Aufnahme von polyphenolreichem Olivenöl in Urin und Plasma, hauptsächlich in konjugierter Form detektiert werden (Suárez et al. 2011; Rubió et al. 2014; Miro-Casas et al. 2003). Zwei Humanstudien untersuchten zudem die Absorption von isoliertem Hydroxytyrosol bzw. einem Supplement. Nach der Aufnahme von reinem Hydroxytyrosol (175 g/70 kg Körpergewicht [KG]), isoliert aus einem OMWW-Extrakt, wurden 5 % der aufgenommenen Menge als freies oder konjugiertes Hydroxytyrosol detektiert. Die primären Metabolite waren

Homovanillinsäure mit 31 % und glucuronidiertes DOPAC mit 22,7 % der aufgenommenen Hydroxytyrosol-Menge. Die Gesamtheit an freiem und konjugiertem DOPAC umfasste zudem in der Studie 40 % der Gesamtmenge an detektierten Hydroxytyrosol-Metaboliten im Urin. Auch Homovanillinalkohol wurde im Urin detektiert. Insgesamt lagen die Metabolite zu 44 % als freie Formen, zu 34,4 % als Glucuronide und zu 21,2 % als Sulfokonjugate vor (Gonzalez-Santiago et al. 2010).

Nach Aufnahme eines hydroxytyrosolreichen OMWW-Extrakts mit 10 % Hydroxytyrosol (Aufnahme von 5 mg bzw. 25 mg Hydroxytyrosol) wurden 21-28 % der aufgenommenen Hydroxytyrosol-Menge primär als Hydroxytyrosol-Sulfate sowie -Glucuronide im Urin detektiert. Hydroxytyrosol-Sulfat wurde auch in der Kontroll-Gruppe nachgewiesen und könnte auf die endogene Hydroxytyrosol-Synthese hinweisen (Khymenets et al. 2016).

Abb. 1.11 bildet eine Zusammenfassung der komplexen und noch nicht vollständig aufgeklärten Absorptions- und Metabolisierungsprozesse, denen TOP nach oraler Aufnahme vermutlich unterliegen.

1.3.6 Verfügbarkeit von Polyphenolen im Gehirn

Die Präsenz von TOP im Plasma zeigt, dass diese generell für Zellen in der Peripherie bioverfügbar sind, jedoch nicht, dass diese auch in das Gehirn gelangen. Die Vermittlung direkter neuroprotektiver Effekte setzt den Transport über die Blut-Hirn-Schranke (*Blood-brain barrier*, BBB) voraus, die eine Grenze zwischen dem Blut und dem Gehirn darstellt (Faria et al. 2012). Die BBB ist eine biologische Membran bestehend aus Endothelzellen der Mikrogefäße des Gehirns, die mit Astrozyten und Perizyten assoziiert sind. Der Transport über diese Membran kann generell für einige Moleküle (lipophil, klein, ungeladen) über passive Diffusion erfolgen oder über Transporter (Influx/Efflux) und Transportprozesse (Endozytose) stattfinden. Das Gehirnendothelium verfügt über komplexe *Tight junctions*, eine geringe Dichte an pinozytotischen Vesikeln (für den Transport von Flüssigkeiten und darin gelöste Substanzen über Endozytose) und spezifische Transporter einschließlich Effluxtransportern, die den Transport aus den Zellen zurück in das Blut vermitteln. Diese Charakteristika der BBB ermöglichen eine strenge Kontrolle über die transendotheliale Passage. Die BBB begrenzt so den Übertritt der meisten kleinen polaren Moleküle und Makromoleküle von der zerebralen Zirkulation in das Gehirn (Youdim et al. 2004; Faria et al. 2012). In welchem Umfang und über welche Mechanismen Polyphenole

die BBB passieren können ist noch nicht hinreichend aufgeklärt. *In vitro* Experimente an zellulären BBB-Modellen sowie Tierstudien, die Polyphenole im Gehirn detektieren, weisen auf eine mögliche Bioverfügbarkeit von Polyphenolen im Gehirn hin.

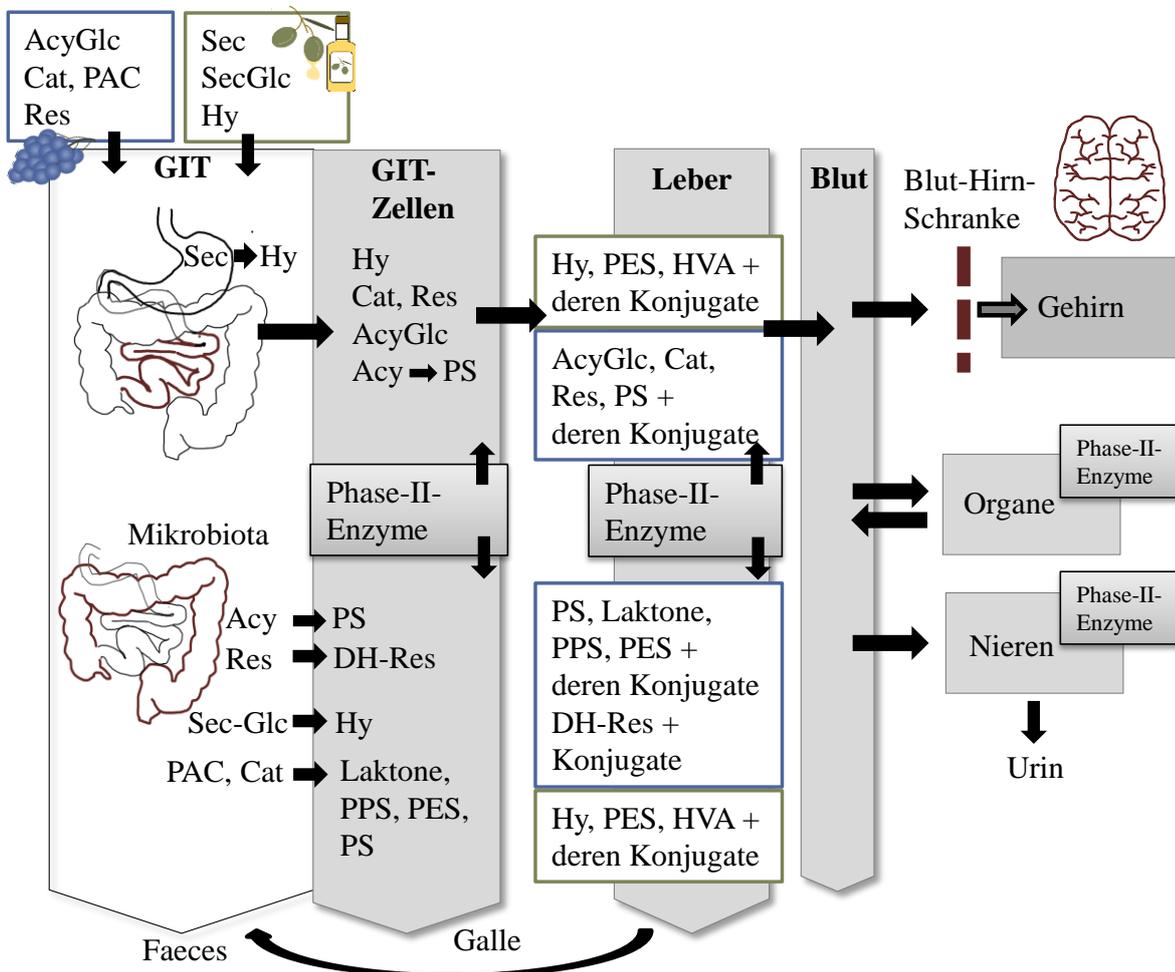


Abb. 1.11: Vorgeschlagene Absorptions- und Metabolisierungsvorgänge von TOP. PS: Phenolsäuren, PPS: Phenylpropionsäuren, PES: Phenylessigsäuren, Acy: Anthocyan-Aglycon, Acy-Glc: Anthocyan-Glycosid, Hy: Hydroxytyrosol, Tyr: Tyrosol, Sec: Secoiridoide, Cat: monomere Flavanole, PAC: oligomere und polymere Proanthocyanidine, Res: *trans* Resveratrol, DH-Res: Dehydroresveratrol, GIT: Gastrointestinaltrakt, HVA: Homovanillinalkohol; HVS: Homovanillinsäure; DOPAC: 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure

Die Fähigkeit von Polyphenolen, die BBB zu passieren, hängt vermutlich von ihrer Lipophilität ab, sodass weniger polare Verbindungen und Metabolite wie methylierte Formen besser aufgenommen werden als stärker polare Verbindungen und Metabolite wie Sulfat-Konjugate und Glucuronide (Corona et al. 2014). Auch die Interaktion mit Effluxtransportern muss bei der Passage von Polyphenolen in das Gehirn in Betracht gezogen werden. P-Glycoprotein, *Multidrug resistance-associated proteins* (MRPs) und das *Breast cancer resistance protein* (BCRP) sind Effluxtransporter, die den Übertritt von Medikamenten in das ZNS begrenzen (Faria et al.

2010; Youdim et al. 2004) Faria et al. haben in einer Reihe von *in vitro* Experimenten die mögliche Passage von Polyphenolen über die BBB an zellulären Modellen untersucht, in dem sie den Transport von der apikalen Seite zur basalen Seite der Zellen (Transporteffizienz) ermittelt haben. Catechin, Quercetin und Cyanidin-3-Glucosid wurden im basalen Kompartiment des BBB-Modells mit immortalisierten zerebralen Kapillarendothelzellen von Ratten (RBE4-Zellen) jeweils zu 18 %, 14 % und über 20 % ihrer apikalen Ausgangskonzentration wiedergefunden. Der gebundene Zucker im Fall von Cyanidin-3-Glucosid legt einen Transport über Glucosetransporter wie GLUT1 nahe (Faria et al. 2010; Youdim et al. 2004). Zudem konnte für Epicatechin in weiteren Versuchen eine höhere Transporteffizienz (27,5 %) gegenüber Catechin (15,4 %) beschrieben werden. Die Verwendung der immortalisierten hCMEC/D3 Zelllinie als humanes BBB-Modell, bestehend aus humanen zerebralen Kapillarendothelzellen, brachte ähnliche Ergebnisse für Catechin und Epicatechin hervor (Faria et al. 2011). In einer kürzlichen Studie schlossen Faria et al. (2014) in ihre Untersuchungen am hCMEC/D3 Modell auch Metaboliten mit ein. Für die Methylkonjugate von Epicatechin und Catechin wurde eine höhere Transportkapazität (über 30 %) ermittelt als für Epicatechin und Catechin (ca. 25 % und 18 %) selbst. Weiterhin deuten die Daten darauf hin, dass neben der passiven Diffusion auch ein Übertritt durch Transporter eine Rolle gespielt hat. Wie bei den Flavanolen konnte auch bei Anthocyanen, die als Glycoside vorliegen, eine zusätzliche Methylgruppe die Absorption positiv beeinflussen. Die Transporteffizienzen nahmen von Delphinidin-3-Glucosid (12 %) über Cyanidin-3-Glucosid (16 %) bis hin zu Malvidin-3-Glucosid (20 %) zu. Darüber hinaus konnten Methylkonjugate von Delphinidin und Cyanidin-3-Glucosid mit 18 % und 19 % besser aufgenommen werden als ihre native Form. Auch für das 3-*O*-Glucuronid von Quercetin wurde eine höhere Transporteffizienz gegenüber seiner unkonjugierten Form gefunden, die nur bei ca. 8 % lag (Faria et al. 2014). Signifikant erhöhte Transporteffizienzen von Quercetin nach der spezifischen Hemmung von P-Glycoprotein und BCRP weisen darauf hin, dass Quercetin zum Teil einem Effluxtransport unterliegt (Faria et al. 2014). Demgegenüber verhinderte die Glucuronidierung von Epicatechin seine Aufnahme in kortikale Mausneuronen (Spencer 2001). Es wird generell angenommen, dass hydrophile Flavonoid-Glucuronide die BBB nicht überqueren, sondern im Gehirn gebildet werden. Weiterhin könnte auch eine Dekonjugierung und spätere Rekonjugierung an der BBB erfolgen (Faria et al. 2012).

Neben den dargestellten *in vitro* Untersuchungen haben eine Reihe von Tierstudien die Verfügbarkeit von Polyphenolen im Gehirn untersucht. Zur Beurteilung inwieweit Polyphenole in

Tierstudien die BBB passieren können und im Gehirn vorliegen, sollte idealerweise Gehirngewebe herangezogen werden, welches frei von verbleibendem Blut ist. Die Untersuchungen erfolgen daher als Goldstandard in entbluteten, mit Salzlösung perfundierten Tieren. Alternativ können Korrekturberechnungen der verbleibenden Blutmenge vorgenommen werden (Schaffer and Halliwell 2012). Studien an Tieren, die diesen Ansätzen folgen, weisen auf die Präsenz von Polyphenolen bzw. deren Metaboliten nach meist oraler Aufnahme (auch nach mehrwöchiger Gabe) von unter 1 nmol/g Gehirngewebe hin. Für TOP sind die Studien in Tab. 1.2 zusammengefasst. Mit Ausnahme von Anthocyanen wurden vorrangig Phase-II-Metabolite identifiziert. Eine Detektion von Polyphenolmetaboliten insgesamt im zweistelligen nanomolaren Bereich/g Hirngewebe wurde in Ratten nach einmaliger Gabe von sehr hohen Mengen (1 g/kg KG) Trauben(-kern)extrakt (Serra et al. 2011; Margalef et al. 2015b) und Olivenextrakt (3 g/kg KG) (Serra et al. 2012) beschrieben. Zudem konnten Margalef et al. (2015a) zeigen, dass das Vorkommen und die Konzentration von Flavanol-Metaboliten nach Aufnahme von Traubenkernextrakt im Plasma, der Leber und dem Gehirn von Ratten geschlechtsspezifische Unterschiede aufweist. So wurden bei Weibchen 15,5 nmol/g Hirngewebe und bei Männchen 26,0 nmol/g Hirngewebe nachgewiesen. Weiterhin wurden Proanthocyanidin-Dimere (≤ 2 nmol/g bei Weibchen, $\leq 0,3$ nmol/g bei Männchen) im Gehirn nachgewiesen. In der Studie wurden blutentleerte Tiere verwendet, aber keine Angaben hinsichtlich einer Perfusion des Gehirns gemacht (Margalef et al. 2015b).

Inwieweit Polyphenole im Gehirn nach chronischer Gabe akkumulieren können ist ungewiss. Es liegen Daten aus einer Studie mit Schweinen vor, die auf eine mögliche Akkumulation von Anthocyanen im Gehirn hindeuten. Nach einer Fütterungsperiode von vier Wochen mit 1-4 % Blaubeeren konnten Anthocyane in einer Konzentration von 0,3-0,4 ng/g Gehirngewebe detektiert werden, jedoch nicht in Plasma oder Urin (Kalt et al. 2008). Demgegenüber finden Sakakibara et al. nach einer zweiwöchigen Diät mit 0,5 % Blaubeerextrakt zwar Anthocyane in Geweben wie Leber, Niere und Lunge, aber nicht im Gehirn (Sakakibara et al. 2009). Margalef et al. detektieren 21 h nach der letzten Dosis (100 mg) einer 12-wöchigen Gabe von Traubenkernextrakt Polyphenolmetabolite im Gehirn die 3,5 Mal geringer waren als 2 h nach der einmaligen Gabe von 125 mg Traubenkernextrakt. Zudem lagen im Gehirn nach 21 h vorrangig mikrobielle Abbauprodukte wie Homovanillinsäure und (Hydroxy-)benzoesäuren und keine Phase-II-Metabolite vor (Margalef et al. 2015a).

Einleitung

Tab. 1.2: Übersicht über detektierte TOP-Metabolite im Gehirn von Versuchstieren.

PP-Quelle	Dosis	Applikation	Tiermodell	Plasmakonzentration	Gehirnkonzentration/g Gewebe	Referenz
Cy3Glc	30 mg/kg KG	I. p.	C57BL/6-Mäuse, 10 Tage alt		Nach 1 h: ca. 3,5 nmol Cy3Glc	(Ke et al. 2011)
Cy3Glc	668 nmol	I. v.	Wistar-Ratten ♂	355 nM Cy3Glc	Nach 15 s: 40,5 pmol Cy3Glc	(Fornasaro et al. 2016)
Pelargonidin (Pel)	50 mg/kg KG	Oral	Sprague-Dawley-Ratten ♂	Nach 2 h: 1,5 pM (konjugiert + PS), < LOD nach 18 h	Nach 2 h: 0,16 nmol Pel (primär Agc)	(El Mohsen et al. 2006a)
ECat	100 mg/kg KG	Oral	Wistar-Ratten ♂	Nach 2 h: 66 µM ECat-Metabolite (primär ECat-Gluc, MeO-EC)	Nach 2 h: 0,4 nmol ECat-Metabolite	(Abd El Mohsen et al. 2002)
<i>Trans</i> -Res	15 mg/kg KG	I. v.	Sprague-Dawley-Ratten ♂		0,17 nmol Res, 0,04 nmol ResSul	(Juan et al. 2010)
Brombeerextrakt, primär Cy3Glc	15 g (14,8 mmol Acy)/kg Futter	Oral, 15 Tage	Wistar-Ratten ♂	0,36 pM Agc-Metabolite (Acy, Glc, Konjugate)	Nach 3 h: 0,25 nmol Acy , primär Cy3Glc	(Talavera et al. 2005)*
HBE (89 % PP)	82,5 mg/kg KG	Oral, 3 Wochen	Schweine, zu Beginn 1 Woche alt	Nach 1 h: 0,68 nM Acy	Nach 1 h: ca. 30 pmol Acy	(Chen et al. 2015)
TE	300 mg/kg KG	Oral, 2-mal/Tag, 3 Tage	Sprague-Dawley-Ratten ♂	Nach 4 h: < LOD, mono-, di-, trimere Flavanole detektiert	Nach 4 h: 53 ng Cat	(Prasain et al. 2009)
TE	50→100→150 mg/kg KG, eskalierend	Oral, 10 Tage	Sprague-Dawley-Ratten ♂	0,38 µg/ml ECat 0,19 µg/ml Cat	Nach 8 h: 0,29 ng ECat, 0,57 ng Cat	(Ferruzzi et al. 2009)
TE	125, 250, 375, 1000 mg/kg KG	Oral	Wistar-Ratten ♂		Höchste Konz. 2 h nach 1 g/kg KG: ca. 30 nmol Flavanolmetabolite , primär OMetCat, ca. 20 nmol PPS, PS	(Margalef et al. 2015b)*
TE	100 mg/kg KG	Oral, 12 Wochen	Wistar-Ratten ♂	21 h nach letzter Gabe nicht detektierbar	Nach 21 h: keine Flavanole oder Konjugate, 1,5 nmol BS, 0,64 nmol HBS, 0,53 nmol HVS, 0,2 nmol Dihydrophenylvalerolaktone	(Margalef et al. 2015a)*
Traubenextrakt	1 g/kg KG	Oral	Wistar-Ratten ♂		Nach 4 h: 13 nmol Flavanolmetabolite , primär (E-)CatGluc, keine Acy	(Serra et al. 2011)*

Einleitung

PP-Quelle	Dosis	Applikation	Tiermodell	Plasmakonzentration	Gehirnkonzentration/g Gewebe	Referenz
Trauben-PP-Mix	41 mg/kg KG	Oral, 10 Tage	Sprague-Dawley-Ratten ♂	407 nM CatGluc, 532 nM ECatGluc, 68 nM OMetCatGluc, 72 nM OMetE-CatGluc	Nach 1 h: 0,32 nmol ECat- + Cat-Metabolite (CatGluc, ECatGluc, OMetCatGluc, OMetE-CatGluc)	(Wang et al. 2012a)
TE-PAC-Monomerfraktion	17 mg/kg KG	Oral, 10 Tage	Sprague-Dawley-Ratten ♂	394 nM CatGluc, 586 nM ECatGluc, 177 nM OMetCatGluc, 184 nM O-Met-ECatGluc	Nach 1 h: 0,36 nmol ECat- + Cat-Metabolite (CatGluc, ECatGluc, OMetCatGluc, OMetE-CatGluc)	(Wang et al. 2012a)
TE-PAC-Oligo-/Polymerfraktion	28 mg/kg KG	Oral, 10 Tage	Sprague-Dawley-Ratten ♂	154 nM CatGluc, 251 nM ECatGluc, 8,7 nM OMetCatGluc, 9,7 nM OMet-ECatGluc	Nach 1 h: 19,2 pmol ECat- + Cat-Metabolite (CatGluc, ECatGluc, OMetCatGluc, OMetE-CatGluc)	(Wang et al. 2012a)
TE/Res/Traubensaft-PP	200 mg TE, 400 mg Res, 183 mg Traubensaft-PP/kg KG	Oral, 2-mal/Tag, 10 Tage	Sprague-Dawley-Ratten ♂	2,5 µM Cat, 2,8 µM OMetCatGluc, 2,8 µM ECatGluc, 4,2 µM OMe-tECatGluc, 0,1 µM QuerGluc, 0,08 µM OMetQuerGluc, je 3-4 nM Mal-/Pet-/Del-/Peo-/CyGlc, 78 µM ResGluc	Nach 1 h: ca. 0,48 nmol Cat, 0,66 nmol OMetCatGluc, 0,63 nmol ECatGluc, 0,85 nmol OMetECatGluc, 2,4 pmol QuerGluc, 0,7 pmol OMetQuerGluc, 0,07-0,17 pmol Mal-/Pet-/Del-/Peo-/CyGlc, 0,74 mol ResGluc	(Wang et al. 2014)
TE	250 mg/kg KG	Oral, 10 Tage	Sprague-Dawley-Ratten ♂	Nach 6 h: 4,72 µM Hippursäure, 0,92 µM 3-HPPS, 0,48 µM 5-HPVS	Nach 6 h: 1,75 nmol 3-HBS, 2,53 nmol 3-HPPS	(Wang et al. 2015b)
TE	25 mg/kg KG	Oral, 10 Tage	Sprague-Dawley-Ratten ♂		Nach 6 h: 1,36 nmol 3-HBS, 1,49 nmol 3-HPPS	(Wang et al. 2015b)
Apfelextrakt/TE (54 % PP)	82,5 mg/kg KG	Oral, 3 Wochen	Schweine, zu Beginn 1 Woche alt	Nach 1 h: 165 nM CatGluc, 158 nM ECatGluc, 35 nM MetOCatGluc, 13 nM MetOECatGluc	Nach 1 h: ca. 5 nmol Flavanolmetabolite, ca. 6 pmol QuerGluc Cat > 3MetOCat/ECatGluc > QuerGluc	(Chen et al. 2015)
Olivenextrakt (9 % Sec, 0,3 % Hy)	3 g/kg KG	Oral	Wistar-Ratten ♂	Nach 4 h: 5 µM Hy, 82 µM HySul, 2 µM HyGluc, 50 µM TySul, 13 µM HVSul, 5 µM VSul, 2 µM HBS, 24 µM Sec	Nach 4 h: 50 nmol HySul, 10 nmol TySul, 1,3 nmol Sec, 2 nmol V, 2,1 nmol HVSul	(Serra et al. 2012)*

Acy: Anthocyan, Agc: Aglicon, BS: Benzoesäure; Cat: Catechin, Cy: Cyanidin, Del: Delphinidin, ECat: Epicatechin, GluMeO: O-methylierter Metabolit, Glc: Glucosid; Gluc: Glucuronid, HBE: Heidelbeerextrakt; HBS: Hydroxybenzoesäure; HPPS: Hydroxyphenylpropionsäure; HPVS: Hydroxyphenylvaleriansäure; HV: Homovanillinsäure; KG: Körpergewicht, Konz: Konzentration, LOD: Detektionsgrenze, Mal: Malvidin, Pel: Pelargonidin, PAC: Proanthocyanidin, PP: Polyphenol, PS: Phenolsäuren, Quer: Quercetin, Res: Resveratrol, Sec: Secoiridoid-Derivate; TE: Traubenkernextrakt; Ty: Tyrosol; V: Vanillin, *Blutleere Tiere verwendet, keine Angabe zur Perfusion

Darüber hinaus zeigten Gasperotti et al. (2015), dass das Gehirn Zielorgan einer Reihe mikrobieller Metabolite von Polyphenolen ist. Nach intravenöser Gabe von 2,7 μM eines Metaboliten-Mix wurde im Gehirn innerhalb von 15 min ein signifikanter Anstieg der Konzentrationen von zehn der 23 enthaltenen Metaboliten einschließlich DOPAC, Homovanillinsäure, Vanillinsäure und Gallussäure festgestellt (Gasperotti et al. 2015).

Eine dosisabhängige Anreicherung von Hydroxytyrosol-Metaboliten im Gehirn konnten Lopez de las Hazas et al. (2015) kürzlich in Ratten nach oraler Gabe von Hydroxytyrosol in den Dosen 1 mg, 10 mg und 100 mg/kg KG identifizieren. Nach der höchsten Dosis stiegen die Gehirnkonzentrationen von Hydroxytyrosolsulfat (1,26 nmol/g), Homovanillinsäure (0,4 nmol/g) und dessen Sulfat (0,58 nmol/g) sowie Homovanillinalkoholsulfat (2,58 nmol/g) signifikant gegenüber den niedrigeren Dosen und der Kontrolle an. Die genannten Metabolite wurden in geringen Mengen auch im Gehirn der Kontrolltiere identifiziert, wahrscheinlich infolge einer endogenen Synthese über den Dopaminmetabolismus. Ein Anstieg der Metabolite nach höheren Dosen von extern zugeführtem Hydroxytyrosol könnte darauf hinweisen, dass manche Metabolite möglicherweise erst bei höherer Dosis die BBB passieren können (Lopez de las Hazas et al. 2015). Auf Grundlage der Methodenbeschreibung kann jedoch nicht von blutentleerten Gehirnen ausgegangen werden. In blutentleerten Gehirnen wurde Hydroxytyrosolsulfat in einer Konzentration von 50 nmol/g und Homovanillinsulfat in einer Konzentration von 2,2 nmol/g nach oraler Aufnahme von 3 g/kg KG Olivenextrakt (9 % Secoiridoid-Derivate, 0,3 % Hydroxytyrosol) detektiert (Serra et al. 2012). Die schnelle Aufnahme von Hydroxytyrosol aus dem Blut in das Gehirn konnte nach intravenöser Gabe von 100 mg/kg/KG bei Ratten mittels Mikrodialyse nachgewiesen werden, mit Maximalwerten von 2,1 $\mu\text{g/ml}$ in der zerebrospinalen Flüssigkeit. Ein Effluxtransport über P-Glykoprotein war vermutlich nicht beteiligt. Die Gabe des P-Glykoprotein-Hemmstoffs Cyclosporin konnte den Konzentrationsgradienten zwischen der zerebrospinalen Flüssigkeit (2,1 $\mu\text{g/ml}$) und dem Blut (111 $\mu\text{g/ml}$) nicht signifikant erhöhen (Wu et al. 2009). Gallardo et al. detektieren nach intraperitonealer Gabe von 40 mg/kg Hydroxytyrosol im Mikrodialysat des Stratum von Ratten 0,6 μM Hydroxytyrosol und ca. 0,3 μM Homovanillinalkohol (Gallardo et al. 2014).

Weitere wertvolle Informationen hinsichtlich eines Erreichens des Gehirns von Polyphenolen liefern Studien mit radioaktiv-markierten Substanzen. So konnten D'Angelo et al. (2001) ^{14}C -markiertes Hydroxytyrosol 5 min nach intravenöser Applikation zu 0,3 % im Gehirngewebe von Ratten nachweisen. An der Gesamtradioaktivität im Gehirn hatten sulfokonjugierte Derivate einen Anteil von 13,4 %, Hydroxytyrosol von 14,1 %, DOPAL von 17,9 %, DOPAC von

6,8 %, Homovanillinalkohol von 41,9 % und Homovanillinsäure von 5,9 % (D'Angelo et al. 2001). ³H-markiertes Epigallocatechingallat wurde im Gehirn von Mäusen nach einmaliger Gabe nachgewiesen, sowie in 6-fach höherer Konzentration nach erneuter Gabe 6 h später (Suganuma et al. 1998). Janle et al (2010) untersuchten die Bioverfügbarkeit von ¹⁴C-markierten Traubenvpolyphenolen, aufgeteilt in verschiedene polyphenolreiche Fraktionen. Die höchste Radioaktivität ging im Gehirn von den zwei anthocyanreichen Fraktionen mit jeweils 1,7 % der aufgenommenen Dosis aus. Fraktionen, die reich an Flavanolen waren, monomere Fraktionen sowie Fraktionen mit Dimeren bis Hexameren und Resveratrol-Glucosid, zeigten eine Wiederfindungsrate von < 0,4 %. Auch im Plasma zeigte sich eine bessere Absorption der anthocyanreichen Fraktionen. Die Fraktion reich an monomeren bis hexameren Flavanolen wurde innerhalb der ersten 24 h zu ca. 20 % mit der Fäzes ausgeschieden, aller anderen Fraktionen zu < 5 % (Janle et al. 2010). Zudem fand sich bei Ratten nach oraler Gabe von ³H-markiertem *trans*-Resveratrol eine Radioaktivität von 1,7 % der aufgenommenen Menge im Plasma sowie von ca. 0,03 % im Gehirn (El-Mohsen et al. 2006b). Nach oraler Gabe wurde Resveratrol weiterhin bei Schweinen und Ratten in Gehirnen identifiziert, welche jedoch alleinig durch nachträgliches Spülen von Blut befreit wurden (Liang et al. 2013; Azorin-Ortuno et al. 2011) sowie nach intravenöser Gabe (Juan et al. 2010).

Erste Anhaltspunkte im Hinblick auf die Passage der BBB von Polyphenolen beim Menschen liefert eine kürzlich durchgeführte randomisiert-kontrollierte Humanstudie mit AD-Patienten. Nach einjähriger Gabe von Resveratrol (500 mg-1000 mg eskalierend) konnte eine Konzentration an Resveratrol-Metaboliten von 9,4 µg/ml im Plasma und 32 ng/ml in der CSF detektiert werden (Turner et al. 2015).

1.3.7 Neuroprotektion und Hormesis

In den späten neunziger Jahren berichtete die Arbeitsgruppe um James Joseph (1999), dass die Gabe einer Nahrung reich an Antioxidanzien bei Ratten altersbedingte Defizite in Tests zur kognitiven und motorischen Funktion verhindern und sogar aufheben konnte. Die unterschiedlich ausgeprägten Ergebnisse nach einer Nahrungsanreicherung mit Blaubeeren und Erdbeeren trotz gleicher antioxidativer Aktivität ließen jedoch Zweifel an der einfachen antioxidativen Wirkung als Erklärung für die beobachteten Effekte aufkommen. Während die Erdbeeranreicherung alleinig die motorische Funktion der Ratten günstig beeinflussen konnte, hatte die Blaubeeranreicherung eine verbesserte motorische und kognitive Leistung zur Folge und konnte in höherem Maße Signaltransduktionsprozesse beeinflussen (Joseph et al. 1999). Es

wurde generell für längere Zeit angenommen, dass Polyphenole ihre gesundheitsprotektiven Aktivitäten über das Abfangen freier Radikale oder anderer Stickstoffspezies vermitteln. Auf Grundlage der umfangreichen Forschungsaktivitäten hinsichtlich der Bioverfügbarkeit von Polyphenolen und der daraus resultierenden Erkenntnis ihrer geringen Bioverfügbarkeit und umfangreichen Metabolisierung, hat sich dieses Bild jedoch in den letzten Jahren grundlegend geändert. Die Konzentrationen, die im Organismus und speziell im Gehirn vorliegen sind vermutlich um ein weites geringer als jene, die *in vitro* direkte antioxidative Effekte auslösen. Heutzutage ist weitgehend akzeptiert, dass die dokumentierten neuroprotektiven Effekte nicht auf direkte antioxidative Wirkungen der Polyphenole zurückzuführen sind (Schaffer et al. 2012; Schaffer and Halliwell 2012; Croft 2016). Es wird vielmehr davon ausgegangen, dass Polyphenole auf multiplen Wegen intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen können, die Kontrolle über das Absterben, Überleben oder Differenzieren von Nervenzellen haben, Genexpressionen beeinflussen und mit Mitochondrien interagieren (Vauzour 2014). Ein Ansatz für die Erklärung der zugrundeliegenden Mechanismen ist Hormesis.

Als Hormesis wird die adaptierte Reaktion von Zellen oder Organismen auf moderaten, meist periodischen Stress bezeichnet; ein Prozess bei dem eine chemische Verbindung oder ein Umweltfaktor der in hohen Dosen schädlich ist, in geringen Dosen günstige adaptierende Effekte auslöst (Mattson 2008). Bei der Hormesis-Theorie von Polyphenolen geht man davon aus, dass Zellen im Körper, einschließlich dem Gehirn, aufgenommene Polyphenole als „potentiell gefährlich“ ansieht und Stresssignale aussendet, wodurch die zelluläre Kapazität zur Stressabwehr erhöht wird (Lee et al. 2014). Polyphenole könnten so einige der gleichen Hormesis-basierten Prozesse auslösen, die für die günstigen Effekte einer Kalorienrestriktion sowie körperlichen und geistigen Aktivität vorgeschlagen werden (Murugaiyah and Mattson 2015).

Die Effekte der Kalorienrestriktion wurden zum ersten Mal 1935 bei Ratten beschrieben, die nach verminderter Aufnahme an Kalorien zur Verzögerung des Wachstums im Vergleich zu *ad-libitum* gefütterten Tieren eine erhöhte mittlere und maximale Lebensspanne zeigten (McCay et al. 1935). Seitdem wurde eine Verlängerung der Lebensspanne sowie der gesunden Lebenszeit (*Healthy life expectancy*) in Spezies von der Hefe bis zum Menschen beschrieben. Der Effekt der Kalorienrestriktion, die eine Reduzierung der Kalorienaufnahme von 20-50 % bei ausreichender Nährstoffversorgung umfasst, wird jedoch derzeit kontrovers diskutiert (Wahl et al. 2016; Nikolai et al. 2015). Von besonderem Interesse ist der Effekt der Kalorienrestriktion auf die Proteinfamilie der Sirtuine, NAD-abhängige Deacetylasen, die in Spezies vom Bakterium bis zum Menschen vorhanden sind. In Säugetieren finden sich sieben Sirtuine

(SIRT1-7). Durch die Abhängigkeit der Sirtuine von NAD^+ sind sie direkt mit dem metabolischen Status der Zelle verbunden (Nakagawa and Guarente 2011; Giblin et al. 2014). Substrate für SIRT1 sind beispielsweise das Tumorsuppressor-Protein p53 (p53), Transkriptionsfaktoren der Familie *Forkhead box proteins* (FOXO), die DNA-Reparaturen, Autophagie und Apoptose vermitteln, sowie weiterhin PGC1 α (Murugaiyah and Mattson 2015; Radak et al. 2010; Radak et al. 2013). Eine Verbindung von Polyphenolen zu SIRT1 wurde von der Forschergruppe um David A. Sinclair hergestellt (Howitz et al. 2003). Resveratrol wird mit einer Verlängerung der Lebensspanne sowie einer Aktivierung von SIRT1 und der Induktion verschiedener protektiver Genexpressionsmuster verbunden (Murugaiyah and Mattson 2015).

Hormesis wird auch für die Vermittlung günstiger Effekte auf das ZNS vorgeschlagen. SIRT1 ist beispielsweise vermutlich nicht nur bei den Effekten der Kalorienrestriktion und Fasten involviert, sondern auch bei der Gedächtnisbildung, synaptischen Plastizität und Neuroprotektion (Nakagawa and Guarente 2011). Vergleichbar mit der Reaktion von Muskelzellen bei körperlicher Aktivität werden Nervenzellen regelmäßig durch Calciumeinstrom, ROS und energetischen Stress herausgefordert (Mattson 2008). Mitochondrien nehmen eine zentrale Rolle bei den evolutionär konservierten zellulären und molekularen Mechanismen ein, die Gehirnleistungen erhöhen können und Nervenzellen weniger anfällig gegenüber der Alterung und Erkrankungen machen.

Die anregenden Synapsen, die bei diesen Prozessen aktiviert werden, setzen den Neurotransmitter Glutamat frei, der über einen Calciumeinstrom zur Aktivierung von Kinasen wie Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase IV (CaMKIV) und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) führt. In Folge werden Transkriptionsfaktoren wie CREB und *Nuclear factor κ B* (NF- κ B) phosphoryliert und somit aktiviert. Durch CREB wird die Expression multipler Gene induziert, welche die mitochondriale Funktion und Stressantwort beeinflussen. Dazu gehören BDNF, SIRT3, PGC1 α und Tfam. Neben der mitochondrialen Biogenese kann in Folge von PGC1 α die Expression von antioxidativen Enzymen, UCPs und anti-apoptotischen Proteinen induziert werden. Das Neurotrophin BDNF entsteht durch enzymatische Spaltung seines Vorläuferproteins proBDNF und wird von der Nervenzelle freigesetzt. An benachbarten oder anderen Nervenzellen kann BDNF Tyrosinkinase-Rezeptoren aktivieren, wodurch über die Kinasen Akt und ERK wiederum die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie CREB erfolgt. Über ihre Deacetylase-Aktivität kann das in der mitochondrialen Matrix lokalisierte SIRT3 weiterhin die Aktivität der SOD2 erhöhen und somit zur effektiveren Neutralisation von $\text{O}_2^{\cdot-}$ beitragen (Raefsky and Mattson 2017; Lee et al. 2014). Ein

direkter Einfluss auf die mitochondriale Atmung von SIRT3 wird ebenso über die Deacetylierung und somit Aktivierung der mitochondrialen Komplexe beschrieben (Brenmoehl and Hoflich 2013). Weiterhin kann starke körperliche Aktivität oder Fasten die Produktion von BDNF in Nervenzellen durch die Bildung des Ketonkörpers 3-Hydroxybutyrat anregen. An diesem Prozess sind ROS und NF-κB beteiligt (Raefsky and Mattson 2017).

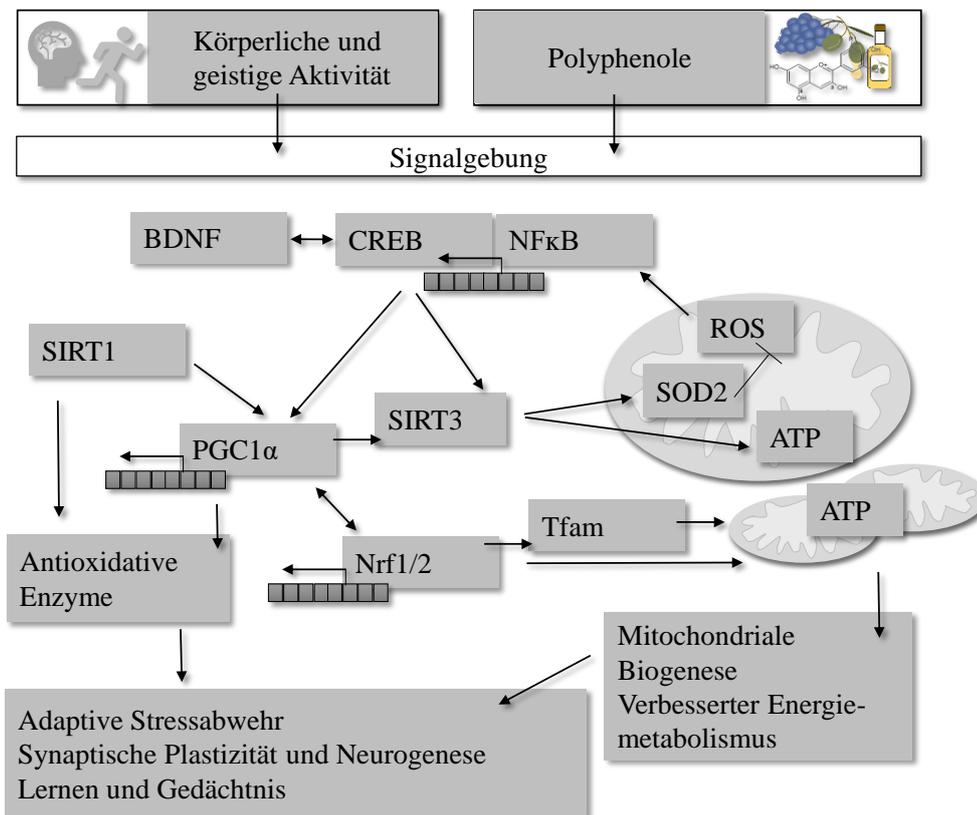


Abb. 1.12: Postulierte Mechanismen zur Neuroprotektion über Hormesis. BDNF: *Brain derived neurotrophic factor*, CREB: *cAMP-Reaktionselement-Bindungsprotein*, NF-κB: *Nuclear factor k-light-chain-enhancer of activated B cells*, Nrf: *Nuclear respiration factor*, PGC1α: *Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ-Co-Aktivator α* SOD: *Superoxiddismutase*, Tfam: *Mitochondrial transcription factor A*, UCPs: *Entkopplungsproteine*

Ein Teil dieser beschriebenen Prozesse kann vermutlich auch durch TOP ausgelöst werden. Beispielsweise konnte die Gabe von Traubenpulver bei Ratten u.a. vor Gedächtnisbeeinträchtigungen schützen und daran war die Aktivierung von CREB und die Bildung von BDNF beteiligt (Allam et al. 2013). Olivenpolyphenole konnten zudem BDNF im Hippocampus und Riechkolben von Mäusen erhöhen (Nicolo et al. 2013). Über die Aktivierung des *Nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (NFE2L2) können Polyphenole zudem vermutlich die Abwehr durch antioxidative und Phase-II-Enzyme erhöhen (Lee et al. 2014).

Zusammenfassend liegen zahlreiche Hinweise vor, dass Polyphenole ihre Effekte über Signalwege der Hormesis vermitteln können, in dem sie u.a. neurotrophische Faktoren, Biogenese und antioxidative Enzyme induzieren. Durch diese Effekte verfügt das Nervensystem über eine bessere Stressabwehr, bessere Funktionsfähigkeit und erhöhte Lebensfähigkeit (Murugaiyah and Mattson 2015; Lee et al. 2014). Die postulierten Mechanismen sind in Abb. 1.12 dargestellt.

2 Zielsetzung

Der Erhalt der körperlichen und geistigen Gesundheit in einer ständig älter werdenden Bevölkerung ist ein Ziel, das große Herausforderungen für die Forschung impliziert. Die Zahl der Menschen, die an Demenz leiden, wird sich voraussichtlich in den nächsten 35 Jahren verdreifachen. Für die Alzheimer-Erkrankung (AD), auf die schätzungsweise zwei Drittel der Demenzerkrankungen zurückzuführen sind, gibt es bis heute keine Therapie, die über die Linderung der Symptome hinausgeht.

Die Gehirnalterung wird allgemein als größter Risikofaktor für die Entwicklung einer AD angesehen. Zudem sind bei der Alterung und der AD die gleichen Gehirnbereiche von einer besonderen Anfälligkeit für Funktionsverluste betroffen. Diese Beobachtungen legen einen Zusammenhang der zugrundeliegenden Mechanismen nahe. In dieser Hinsicht gelangt die mitochondriale Dysfunktion als gemeinsamer Prozess bei der Gehirnalterung und der spät auftretenden AD zunehmend in den Blickpunkt der Forschung.

Nervenzellen benötigen eine große Menge an Energie in Form von ATP, welches in den Mitochondrien, den „Kraftwerken“ der Zellen, über die oxidative Phosphorylierung gebildet wird. Bei der mitochondrialen Atmung entsteht jedoch nicht nur ATP, sondern es werden auch ROS gebildet, die bei übermäßiger Produktion bzw. verminderten antioxidativen Abwehrmechanismen, zu oxidativen Schäden der Zellen sowie den Mitochondrien selbst führen können. Einige Theorien zur Alterung bauen darauf auf, dass durch diesen Prozess ein Kreislauf aus mitochondrialer Dysfunktion und ROS entsteht, dem der Organismus ab einer bestimmten individuellen Grenze nicht mehr gewachsen ist. Als Folge kommt es im alternden Gehirn zu Funktionsverlusten, die eine Progression zur Neurodegeneration und AD begünstigen.

Eine Stärkung der adaptiven Stressabwehr könnte auf Grundlage dieser Annahmen eine Verlangsamung von Alterungsprozessen im Gehirn bewirken und eine Möglichkeit zur Prävention oder Verzögerung von neurodegenerativen Erkrankungen darstellen. Nach der Theorie der Hormesis könnten diese Abwehrmechanismen durch die Induktion von mildem zellulären Stress gestärkt werden, beispielsweise durch körperliche Aktivität oder auch die Aufnahme von Polyphenolen. Trauben- und Olivenprodukte stellen reiche Quellen für Polyphenole dar, die besonders bei der traditionellen mediterranen Ernährungsweise regelmäßig konsumiert werden. Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass diese Ernährungsweise den altersbedingten Rückgang kognitiver Leistungen verlangsamen und das Risiko für eine AD reduzieren kann. Diese Effekte könnten zum Teil auf die enthaltenen Polyphenole zurückzuführen sein, die in Tierstudien und ersten Humanstudien neuroprotektives Potenzial gezeigt haben.

Vor diesem Hintergrund ist das übergeordnete Ziel dieser Forschungsarbeit die Untersuchung der Effekte von Trauben- und Olivenpolyphenolen (TOP) auf die mitochondriale und kognitive Dysfunktion bei der Gehirnalterung und AD im Zell- und Mausmodell. Grundlegend soll der Frage nachgegangen werden, ob TOP im Gehirn einer mitochondrialen Dysfunktion entgegenwirken können und so vor altersbedingten kognitiven Beeinträchtigungen und neurodegenerativen Prozessen schützen können. Weiterführend soll geklärt werden, ob die untersuchten Polyphenole ihre Effekte über die Induktion von Hormesis vermitteln können und so Adaptationsmechanismen stärken und zur Neuroprotektion führen. Schließlich soll der Einfluss von multimodalen Ansätzen aus Polyphenolkombinationen sowie zusätzlicher körperlicher und geistiger Anregung geprüft werden.

Im Fokus der Untersuchungen stehen zwei Traubenextrakte mit unterschiedlichen Gehalten an Anthocyanen, Proanthocyanidinen und Resveratrol, ein Olivenextrakt sowie dessen Hauptkomponente Hydroxytyrosol als Reinsubstanz. Diese Komponenten sollen einzeln sowie in Kombination zunächst hinsichtlich ihrer Effekte auf grundlegende Parameter des mitochondrialen Energiestoffwechsels im Zell- und später Tiermodell untersucht werden. Zu den erfassten Parametern gehören die ATP-Spiegel, das mitochondriale Membranpotenzial (MMP) und die mitochondrialen Atmungsaktivitäten in respiratorischen Messungen. Durch die Induktion von oxidativem und nitrosativem Stress im neuronähnlichen Zellmodell PC12 sollen Zustände nachgestellt werden, die im alternden Gehirn vorzufinden sind. Darüber hinaus erfolgt die Prüfung in einem Modell mit Alzheimer-Pathologie (PC12_{sw}). Aufgrund der umfangreichen Metabolisierung der Polyphenole im Organismus sollen im Zellmodell weiterhin die zwei Metabolite Syringasäure und DOPAC in die Untersuchungen eingeschlossen werden.

Umfassendere Erkenntnisse sollen weiterhin in Fütterungsstudien im Tiermodell erworben werden. Im Vordergrund der Forschungsarbeit stehen dabei die Effekte von TOP auf die mitochondriale Dysfunktion in gealterten Mäusen. Gestützt werden diese Studien von Verhaltenstests zur Gedächtnisleistung und Motorik der Tiere sowie Genexpressionsanalysen. Eine separate Studie soll sich zusätzlich mit dem Effekt von Traubenextrakt auf die Lebensspanne beschäftigen. Potenziell synergistische Effekte von multiplen Anregungsansätzen aus Polyphenolen und einer stimulierenden Umgebung werden bei gealterten Mäusen sowie einem Mausmodell mit Alzheimer-Pathologie (Thy-1-APP) geprüft.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

	Hersteller, Ort, Land (D: Deutschland)
96-Well Zellkulturplatte, <i>white walled</i>	Lonza, Walkersville, USA
96-Well PCR-Platte, <i>Hard-Shell</i> [®] , <i>low profile, thin wall, skirted, white/clear</i>	Bio-Rad, München, D
Klebefolien für PCR-Platte, Microseal [®] 'B'	Bio-Rad, München, D
<i>Accelerating Rota Rod</i>	Panlab/Harvard Apparatus, Barcelona, Spanien
Analysewaagen AB204, AT261 Delta Range	Mettler-Toledo, Gießen, D
Autoklav Bioklav	Schütt Labortechnik, Göttingen, D
Bacillol AF	Hartmann, Heidenheim, D
<i>Blue Juice</i>	Peqlab, Erlangen, D
Cycler advanced Primus 25	Peqlab, Erlangen, D
Distritips [®] (125/1250 µl, 12,5 ml)	Gilson, Limburg, D
Distriman [®]	Gilson, Middleton, USA
Eco Plus Latex-Handschuhe	AMPri, Winsen/Luhe, D
Einmal-Spritzen, zweiteilig, 25 ml	B. Braun, Melsungen, D
Einweg-Pasteurpipetten, graduiert, 1 ml	Carl Roth, Karlsruhe,
Ein- und Mehrkanalpipetten Transferpette [®]	Brand, Wertheim, D
Eismaschine ZIEGRA	Kälte- u. Klimatechnik Bader, Würzburg, D
<i>Enrichment "Mouse igloo"</i>	PLEXX, Elst, Niederlande
<i>Enrichment "Safe Harbour"</i>	PLEXX, Elst, Niederlande
<i>Enrichment "Cyclone Chew"</i>	PLEXX, Elst, Niederlande
<i>Enrichment "Crawl Ball"</i>	PLEXX, Elst, Niederlande
<i>Enrichment "Mouse Tunnel"</i>	PLEXX, Elst, Niederlande
<i>Enrichment "Novomaze mouse"</i>	ViewPoint, Lyon, Frankreich
Galaxy [®] 48 S CO ₂ Inkubator	Eppendorf, Hamburg, D
Gefrierschränke, -20 °C, -80 °C	Liebherr, Biberach an der Riß, D
Gelsystem	Peqlab, Erlangen, D

Genesys 5 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Darmstadt, D
Glaspasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe, D
<i>Pellet Mixer</i>	VWR, International GmbH, D
HeraSAFE HS/HSP 18	Heraeus, Hanau, D
Inkubationsschüttler Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Inkubator 37 °C	GFL, Burgwedel, D
Inkubator BB 6220	Heraeus, Hanau, D
LEGO DUPLO	LEGO®, Billund, Dänemark
Mikroliterspritzen	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Mikroliter-Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Mikroliter-Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Mikroliter-Pipetten Finnpipette™	Thermo Fisher, Waltham, USA
Milli-Q Academic Wasseraufbereitungs-System	Millipore, Billerica, USA
Molecular Imager Gel Doc XR System	Bio-Rad, München, D
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific Darmstadt, D
Nestlets	PLEXX, Elst, Niederlande
Neubauer-Zählkammer	Labor Optik, Lancing, Großbritannien
Nikon Eclipse TS100 und TMS	Nikon, Düsseldorf, D
Oxygraph-2k	Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich
<i>Passive Avoidance</i>	Ugo Basile Srl, Gemoni, Italien
pH-Meter InoLab pH Level 1	WTW, Weilheim, D
Photometer Digiscan	Asys Hightech, Eugendorf, D
Photometer Genesys 5	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen Finntip™	Thermo Fisher, Waltham, USA
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand, Wertheim, D
Polyethylen-Flaschen, 125 ml	Leckebusch GmbH, VERL-Sürenheide, D
Polypropylen-Deckel DIN 25	Leckebusch GmbH, VERL-Sürenheide, D
Potter S Homogenisator	B. Braun, Melsungen, D
<i>Power Pac 300</i>	BioRad, München, D
Quartz Küvette 101-QS 10 mm	Zeiss, Jena, D
Reaktions- und Mehrzweckgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

<i>Real-Time PCR Detection System Cfx96</i>	BioRad, München, D
Rotarod Penlab	Harvard apparatus, USA
Knopfkanüle	
<i>Sonifier Cell Disruptor B15</i>	Branson, Danbury, USA
Sterilfilter, 0,2 µm	MACHEREY-NAGEL, Düren, D
<i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf, Hamburg, D
Ultraschallbad Sonorex Super RK 510H	Bandelin, Berlin, D
Vasco® Nitril Handschuhe	B. Braun, Melsungen, D
Victor X3 2030 und 1420 <i>Multilabel Reader</i>	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, D
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad 1002	GFL, Burgwedel, D
Zellkulturmaterialien	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zentrifuge GS-6R, Microfuge R	Beckman, Krefeld, D
Zentrifuge 1-16K	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, D

3.1.2 Chemikalien

	Hersteller, Ort, Land (D: Deutschland)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dithionitrobenzoesäure (DTNB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
β-Mercapthoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Agarose	Merck KGaA, Darmstadt, D
Acetyl-CoA, Trilithiumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Antimycin A	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
<i>Blue Juice</i>	Peqlab, Erlangen, D
Bovines Serumalbumin (BSA), <i>essentially fatty acid free</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Calciumchlorid (CaCl ₂ *2H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Citronensäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
<i>cOmplete Protease Inhibitor Cocktail</i>	Roche, Basel, Schweiz
Cytochrom c	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Material und Methoden

Digitonin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dithionit	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dithionitbenzoesäure (DTNB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DNA Ladder 100 bp	Peqlab, Erlangen, D
DNA Loading Buffer	Peqlab, Erlangen, D
dNTP-Mix	Peqlab, Erlangen, D
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (DPBS)	Gibco, Darmstadt, D
DEPC treated water	Invitrogen, Karlsruhe, D
Ethanol ($\geq 99,9\%$)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol ($>99\%$)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol (70%)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Bio-Rad, München, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
FCCP	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
G418	Gibco, Carlsbad, USA
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, D
Glutamat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
<i>Hanks' balanced salts</i> (HBS)-Fertigpuffer	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München, D
K-Lactobionat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumhydroxid (KOH), 5 N	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumsorbit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Malat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natrimascorbat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Material und Methoden

Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumhydroxid (NaOH), 1 N; 0,1 N	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumnitroprussid (SNP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin-Dihydrochlorid (TMPD)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Oligomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Oxalacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	PAA, Cölbe, D
Pferdeserum	PAA, Cölbe, D
Polyethylenglycol 400	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Primer A/B	Peqlab, Erlangen, D
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Pyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
<i>Reaction Buffer</i>	Peqlab, Erlangen, D
Rhodamin 123	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
RNAase freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
<i>RNAlater RNA Stabilization Reagent</i>	Quiagen, Hilden, D
Rotenon	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Salzsäure (HCl), 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
Salzsäure (HCl), 1 N; 0,1 N	Merck KGaA, Darmstadt, D
Succinat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Sucrose	Carl Roth, Karlsruhe, D
Taurin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
<i>Taq Master Enhancer</i>	Peqlab, Erlangen, D
Taq Polymerase	Peqlab, Erlangen, D
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt, D
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco, Carlsbad, USA

3.1.3 Primer für die quantitative *real-time* PCR

Primer	Sequenz	Hersteller	Produktgröße (bp)	Konz [µM]
AMPK (beta)	5'- AGT ATC ACG GTG GTT GCT GT -3' 5'- CAA ATA CTG TGC CTG CCT CT -3'	Biomol, Hamburg, D	190	0,1
B2M	5'- GGC CTG TAT GCT ATC CAG AA -3' 5'- GAA AGA CCA GTC CTT GCT GA -3'	Biomol, Hamburg, D	198	0,4
BDNF	5'-GGT GCA GAA AAG CAA CAA GT -3' 5'- GCA CAA AAA GTT CCC AGA GA -3'	Biomol, Hamburg, D	219	0,1
CAT	5'- AGC GGT CAA GAA TTT CAC TG -3' 5'- AAT CCA TCC AGC GTT GAT TA-3'	Biomol, Hamburg, D	234	0,1
CI (Ndufv1)	5'- CAC CTG TAA GGA CCG AGA GA -3' 5'- GCA CCA CAA ACA CAT CAA AA -3'	Biomol, Hamburg, D	227	0.1
CIV (Cox5A)	5'- CTG TTC CAT TCG CTG CTA TT -3' 5'- GCG AAC AGC ACT AGC AAA AT -3'	Biomol, Hamburg, D	217	0,1
CREB	5'- CGA AAA CTT GAA GCC ACT AC -3' 5'-ACC GAA ACA CAA TGT CCT -3'	biomers.net GmbH, Ulm, D	140	0,5
GPx1	5'- GTC CAG CGT GTA TGC CTT CT -3' 5'- CTC CTG GTG TCC GAA CTG AT -3'	Biomol, Hamburg, D	217	0,1
Nrf1	5'- TCG GAG CAC TTA CTG GAG TC -3' 5'- CTA GAA AAC GCT GCC ATG AT -3'	Biomol, Hamburg, D	228	0,5
PGC1α	5'- TGT CAC CAC CGA AAT CCT -3' 5'- CCT GGG GAC CTT GAT CTT -3'	biomers.net GmbH, Ulm, D	124	0,05
PGK1	5'- GCA GAT TGT TTG GAA TGG TC -3' 5'- TGC TCA CAT GGC TGA CTTT TA -3'	Biomol, Hamburg, D	185	0,4
SIRT1	5'- GTG AGA AAA TGC TGG CCT AA -3' 5'- CTG CCA CAG GAA CTA GAG GA -3'	Biomol, Hamburg, D	161	1
SIRT3	5'- TTT GTG GTT GGT GAG TTC CT -3' 5'- GCA TTT CCT CCC CAA AGT AT -3'	Biomol, Hamburg, D	204	0,1
SOD2	5'- ACA GCG CAT ACT CTG TGT GA -3' 5'- GGG GGA ACA ACT CAA CTT TT -3'	Biomol, Hamburg, D	183	0,1
Synaptophysin 1	5'- TTT GTG GTT GGT GAG TTC CT -3' 5'- GCA TTT CCT CCC CAA AGT AT -3'	Biomol, Hamburg, D	204	0,1
Tfam	5'- AGC CAG GTC CAG CTC ACT AA -3' 5'- AAA CCC AAG AAA GCA TGT GG -3'	Biomol, Hamburg, D	166	0,5

Bp: Basenpaare, Konz: Konzentration, D: Deutschland

3.1.4 Puffer, Lösungen, Medien

Für die Herstellung aller Puffer, Lösungen und Medien wurde Reinstwasser verwendet (Milli-Q, Millipore, Billerica, USA), welches nachfolgend als H₂O bezeichnet wird.

Hanks' balanced salt solution (HBSS)

HBS-Fertigpuffer	1 Packung/l
HEPES	2,4 g/l
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,147 g/l
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,246 g/l

Die Substanzen wurden in H₂O gelöst und bei 37°C mit HCl (1 N, 0,1 N) und NaOH (1 N, 0,1 N) auf pH 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Medium 1

		Finale Konzentration
NaCl	8,06 g/l	138 mM
KCl	402,57 mg/l	5,4 mM
Na ₂ HPO ₄	24,13 mg/l	0,17 mM
KH ₂ PO ₄	29,94 mg/l	0,22 mM
Glucose*H ₂ O	1,09 g/l	5,5 mM
Sucrose	19,99 g/l	58,4 mM

Die Substanzen wurden in H₂O gelöst und bei 4°C mit HCl (1 N) und NaOH (1 N) auf pH 7,35 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C über maximal 14 Tage.

Medium 2

		Finale Konzentration
NaCl	6,43 g/l	110 mM
KCl	395,12 mg/l	5,3 mM
CaCl ₂ *2H ₂ O	264,64 mg/l	1,8 mM
MgCl ₂ *6H ₂ O	203,33 mg/l	1 mM
Glucose*H ₂ O	4,96 g/l	25 mM
Sucrose	23,96 g/l	70 mM
HEPES	4,77 g/l	20 mM

Material und Methoden

Die Substanzen wurden in H₂O gelöst und bei 4°C mit HCl (1 N) und NaOH (1 N) auf pH 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C über maximal 14 Tage.

MIR05

		Finale Konzentration
EGTA	0,19 g/l	0,5 mM
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,61 g/l	3 mM
K-Lactobionat	120 ml 0,5 M K-Lactobionat-Stock*	60 mM
Taurin	2,50 g/l	20 mM
KH ₂ PO ₄	1,36 g/l	10 mM
HEPES	4,77 g/l	20 mM
Sucrose	37,65 g/l	110 mM
BSA	1 g/l	

Die Substanzen wurden in H₂O gelöst und auf pH 7,1 bei 30°C mit 5 N KOH eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C in 20 ml Aliquots.

*Für den 0,5 M K-Lactobionat-Stock wurden 35,83 g K-Lactobionat in 100 ml H₂O gelöst und nach Einstellung mit KOH auf pH 7,0 mit H₂O auf ein Volumen von 200 ml aufgefüllt.

MIR05+PI

In 50 ml MIR05 wurde eine *cOmplete Protease Inhibitor Cocktail* Tablette (PI) gelöst.

PCR-Mastermix zur Genotypisierung von Thy-1-APP Mäusen

DEPC <i>treated water</i>	444 µl
Taq <i>Master Enhancer</i> (5x)	150 µl
<i>Reaction Buffer</i>	75 µl
dNTP Mix	15 µl
Primer A (5'-GTA GCA GAG GAG GAA GAA GTG-3')	15 µl
Primer B (5'-CAT GAC CTG GGA CAT TCT C-3')	15 µl
Taq Polymerase	6 µl

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

100 ml DPBS (10X) wurden in 900 ml H₂O gelöst.

PBS+EDTA

40,4 mg EDTA wurden in 100 ml PBS gelöst und bei 4°C auf pH 6,7 mit HCl (1 N; 0,1 N) und NaOH (1 N; 0,1 N) eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Reaktionsmedium für die Messung der Citratsynthase-Aktivität (CS)

Zur Herstellung des Reaktionsmediums wurden zunächst Puffer hergestellt. Es wurden 2,42 g TRIS/20 ml H₂O gelöst und mit 37 % HCl auf pH 8,1 eingestellt, um einen 1,0 M TRIS-HCl-Puffer zu erhalten. Weiterhin wurde ein 0,5 M Triethanolamin-HCl-Puffer aus 8,06 g Triethanolamin/100 ml H₂O hergestellt, mit 37 % HCl auf pH 8,0 eingestellt und mit 202,24 mg EDTA supplementiert. Die Puffer wurden bei 4°C gelagert. Acetyl-CoA wurde in H₂O gelöst um eine Konzentration von 12,2 mM zu erhalten und in Aliquots bei -20°C gelagert.

Am Tag der Messung wurde der 0,5 M Triethanolamin-HCl-Puffer 1:5 mit H₂O verdünnt und die Komponenten des Reaktionsmediums hergestellt:

		Finale Konzentration
DTNB	4 mg/10 ml 0,1 M TRIS-HCl-Puffer	1,01 mM
Triton X-100	10 g/90 ml H ₂ O	10 %
Oxalacetat	6,6 mg/5 ml 0,1 M Triethanolamin-HCl Puffer	10 mM
Acetyl-CoA		12,2 mM

Rhodamin 123-Lösung

Für eine 100 µM Rhodamin 123 (R 123)-Lösung wurden 25 mg R 123 in 656,5 µl DMSO gelöst und in 5 µl Aliquots bei -20°C gelagert. Am Tag der MMP-Messung wurde ein Aliquot mit 495 µl HBSS aufgefüllt und nachfolgend 1:50 mit HBSS verdünnt um eine 20 µM R123-Lösung zu erhalten.

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) [20 mM]

1,21 g TRIS wurden in 500 ml H₂O gelöst und der pH-Wert bei 4°C auf 7,4 mit HCl (1 N) eingestellt.

TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (50x)

TRIS	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA	100 ml

Die Lösung wurde auf pH 8,0 eingestellt und mit H₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

Trypanblau-Lösung

Für eine 0,4 % Trypanblau-Lösung wurden 100 mg Trypanblau in 100 ml PBS gelöst.

Zellkulturmedium für PC12_{neo} und PC12_{sw} Zellen

DMEM, <i>high glucose</i> , GlutaMAX TM <i>supplement</i>	500 ml
Fötale Kälberserum (FCS), inaktiviert	50 ml
Pferdeserum (HS), inaktiviert	25 ml
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
G418	0,4 mg/ml

Reduziertes Zellkulturmedium für PC12_{neo} und PC12_{sw} Zellen

DMEM, <i>high glucose</i> , GlutaMAX TM <i>supplement</i>	500 ml
FCS, inaktiviert	10 ml
HS, inaktiviert	5 ml
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
G418	0,4 mg/ml

Zellkulturmedium für HepG2 Zellen

DMEM, <i>high glucose</i> , GlutaMAX TM <i>supplement</i>	500 ml
FCS, inaktiviert	50 ml
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml

Reduziertes Zellkulturmedium für HepG2 Zellen

DMEM, <i>high glucose</i> , GlutaMAX™ <i>supplement</i>	500 ml
FCS, inaktiviert	10 ml
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml

3.1.5 Kits

	Hersteller, Ort, Land (D: Deutschland)
BioRad DC Protein <i>Assay</i>	Bio-Rad, München, D
BCA Protein <i>Assay Kit</i>	Pierce, Rockford, USA
Invitrogen™ Ambion™ TURBO DNA <i>free Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
iScript™ cDNA <i>Synthesis Kit</i>	Bio-Rad, München, D
<i>Protein Carbonyl Content Assay Kit</i>	Sigma Aldrich, Steinheim, D
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden, D
ViaLight Plus <i>Bioluminescence Kit</i>	Lonza, Walkersville, USA

3.1.6 Testsubstanzen

Die Traubenextrakte ExGrape Anthocyanins (Acy) und Resveratrol (Res) wurden von der Breko GmbH, Bremen, zur Verfügung gestellt und von der Technischen Universität Braunschweig (Institut für Lebensmittelchemie) analysiert. In Tab. 3.1 sind die Proanthocyanidin-, Anthocyan- und Resveratrolgehalte der ExGrape Traubenextrakte gegenübergestellt.

Die pulverförmigen Traubenextrakte wurden bei -20°C gelagert und jeweils frisch gelöst. Hydroxytyrosol und sein potenzielles Abbauprodukt DOPAC wurden von Seprox BIOTECH, Spanien als Feststoff zur Verfügung gestellt, bei 4-8°C gelagert und nach Benutzung mit Argon begast um eine sauerstofffreie Lagerung zu gewährleisten. Der Hytolive Sirup wurde von Genosa I+D, Spanien, bezogen. Der honigartige OMWW-Extrakt enthält 25,38 % Hydroxytyrosol, 5,11 % Tyrosol und 27,12 % H₂O. Hytolive (OI) wurde bei 4-8°C gelagert und nach Benutzung mit Argon begast um eine sauerstofffreie Lagerung zu gewährleisten. Weiterhin wurde der Heidelbeerextrakt Actiplants Bilberry von Symrise BioActives GmbH, Hamburg, Deutschland, mit 36,5 % Anthocyanen (berechnet als Cyanidin-3-Glucosidchlorid) eingesetzt.

Tab. 3.1: Polyphenolgehalte der ExGrape Traubenextrakte Analyse durch die Technische Universität Braunschweig (Prof. P. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie).

Polyphenol (%)	ExGrape Acy	ExGrape Res
Catechin + Epicatechin	4,55	3,24
Proanthocyanidin-Dimere B1+B2	3,36	2,52
Proanthocyanidin-Trimere	2,33	2,49
Proanthocyanidin-Tetramere	1,11	1,5
Proanthocyanidin-Pentamere	1,29	0,96
Proanthocyanidin-Polymere	27,12	37,81
Anthocyane (Cy-3-glc)	17,16	4,96
trans-Resveratrol	0,007	0,41

3.1.7 Zelllinien

3.1.7.1 PC12_{neo}-Zellen

PC12-Zellen entstammen einem adrenalen Phäochromozytom der Ratte und differenzieren unter Zugabe des Nervenwachstumsfaktors (*Nerve growth factor*, NGF) zum neuronalen Phänotyp (Greene und Tischler 1976). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten PC12_{neo}-Zellen waren PC12-Zellen, die durch eine stabile Transfektion mit einem Plasmid erhalten wurden, in das ein pCMV Promoter und eine Neomycin-Resistenz eingebracht war. PC12_{neo}-Zellen können somit durch G418 selektiert werden und wurden neben PC12_{sw}-Zellen eingesetzt (Eckert et al. 2001). Die Zellen wurden von Barbara Steiner in einer Kooperation mit Prof. Christian Haas in der Arbeitsgruppe von Prof. W. E. Müller (Frankfurt, Deutschland) hergestellt.

3.1.7.2 PC12_{sw}-Zellen

PC12_{sw}-Zellen sind PC12-Zellen, die durch eine stabile Transfektion mit einem Plasmid erhalten wurden, in das ein pCMV Promoter, eine Neomycin-Resistenz sowie die schwedische Doppelmutation (KM670/671NL) des APPs eingebracht war. Aufgrund ihrer Nähe zum N-Terminus der A β -Region induziert die schwedische Doppelmutation die β -Sekretase-Aktivität und steigert somit die A β -Produktion in den Zellen (Eckert et al. 2001). PC12_{sw}-Zellen produzieren relativ geringe Mengen an A β und weisen im Vergleich zu PC12_{neo}-Zellen ausgeprägte mitochondriale Dysfunktionen auf. Sie stellen daher ein Zellmodell für die frühe AD dar (Hagl et al. 2015c).

3.1.7.3 HepG2 Zellen

Die humane Leberzelllinie HepG2 wurde ursprünglich aus dem Leberzellkarzinom eines 15-jährigen Kaukasiers isoliert (Aden et al. 1979) und freundlicher Weise von Prof. Dr. Jan Frank (Hohenheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

3.1.8 Mauslinien

3.1.8.1 C57BL/6J-Mäuse

Der C57BL/6-Mausstamm ist der am weitesten verbreitete Inzuchtstamm in der biomedizinischen Forschung. Das Inzuchtverfahren zeichnet sich durch eine Bruder-Schwester-Verpaarung über mindestens 20 Generationen aus und zielt so auf homozygote, genetisch identische Tiere ab. Die C57BL/6J-Maus ist der originäre Stamm *des Jackson Laboratory*, neben dem noch eine Reihe weiterer Unterstämme existieren. C57BL/6J-Mäuse werden in vielfältigen Forschungsbereichen u.a. der Neurobiologie und Studien zur Lebensspanne eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden C57BL/6J-Mäuse in Alterungsstudien und Studien zur Lebensspanne eingesetzt. Darüber hinaus dient der C57BL/6-Stamm häufig als genetischer Hintergrund für die Herstellung transgener Mausmodelle wie für das hier eingesetzte Thy-1-APP₇₅₁SL AD-Modell.

3.1.8.2 Thy-1-APP₇₅₁SL-Mäuse

Im transgenen Mausmodell Thy-1-APP₇₅₁SL mit dem genetischen Hintergrund der C57BL/6-Maus wurde ein humanes APP₇₅₁-Gen mit der humanen London (V717L)- und schwedischen (KM670/671NL) Doppelmutation unter Kontrolle des murinen Thy-1-Promotors eingeführt (Blanchard et al. 2003). Der Thy-1-Promotor sorgt für eine hohe neuronale Expression von APP. In transgenen Thy-1-APP₇₅₁SL-Mäusen konnten intrazellulär schon in einem Alter von drei Monaten erhöhte A β -Spiegel detektiert werden (Blanchard et al. 2003). Diese frühen Veränderungen werden von einer ausgeprägten mitochondrialen Dysfunktion mit einem Abfall des MMPs und verminderten ATP-Konzentrationen begleitet (Hauptmann et al. 2009). Erste A β -Plaques wurden ab einem Alter von 6 Monaten nachgewiesen (Blanchard et al. 2003). Zur Untersuchung des Effektes von TOP auf die mitochondriale Dysfunktion im murinen Alzheimer-Modell wurden Thy-1-APP₇₅₁SL-transgene Mäuse aus institutseigener Zucht mittels PCR identifiziert und mit dem Wildtyp verglichen.

3.1.8.3 *Naval Medical Research Institute* (NMRI-)Mäuse

Bei der NMRI-Maus handelt es sich im Gegensatz zu dem C57BL/6-Modell um einen Auszuchtstamm, benannt nach dem *Naval Medical Research Institute*. Bei diesem Zuchtverfahren wird

ein höherer Heterozygotienanteil durch die Verpaarung von entfernt verwandten Tieren erreicht. Der Auszuchtstamm kennzeichnet sich somit durch eine höhere genetische Variabilität und soll die menschliche Population mit seiner großen genetischen Varianz zwischen den Individuen besser nachbilden. In der vorliegenden Arbeit wurden NMRI-Mäuse, neben C57BL/6J-Mäusen für Alterungsstudien herangezogen.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Auftauen

Zum Auftauen der Zellen wurden diese aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37°C vorsichtig aufgetaut. Zügig danach erfolgte die Zugabe von 1 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium und die Überführung der Zellsuspension in ein Falcon mit 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium. Die erhaltene Suspension wurde bei 1.000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge GS-6R), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 12 ml frischem, vorgewärmtem Zellkulturmedium gelöst und vereinzelt. Die Zellen wurden in der Zellkulturflasche für mindestens 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Zellinkubator belassen bevor der erste Zellsplitt erfolgte. Die Zellen wurden mindestens zweimal passagiert bevor sie für Versuche zum Einsatz kamen.

3.2.1.2 Passagieren

Um ein konstantes Wachstum der Zellen in Kultur zu gewährleisten wurden die Zellen vor dem Übergang in die Differenzierungsphase bei Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % passagiert (gesplittet). Das Splitten erfolgte alle 3-4 Tage. Um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche (75 cm² Flaschen) zu lösen wurde das alte Zellkulturmedium abgesaugt und 1 ml vorgewärmtes Trypsin/EDTA auf den Zellrasen gegeben. HepG2-Zellen wurden vor der Trypsin-Zugabe mit PBS (1 %) gewaschen, indem die Zellen kurz mit 10 ml vorgewärmtem PBS (1 %) unter Schwenken benetzt wurden und der Puffer danach direkt wieder abgesaugt wurde. Nach der Inkubation mit Trypsin/EDTA (ca. 3 min für PC12-Zellen, ca. 5 min für HepG2-Zellen) und Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurde die Reaktion mit 9 ml frischem, vorgewärmtem Zellkulturmedium abgestoppt. Die erhaltene Zellsuspension wurde zur Vereinzelnung der Zellen trituriert und Aliquots der Suspension (1:2 – 1:10) in eine neue Zellkulturfla-

sche mit 12 ml (75 cm² Flaschen) bzw. 20 ml (125 cm² Flaschen) vorgewärmtem Zellkulturmedium überführt. Die PC12-Zellen wurden für die Zellkulturexperimente bis zu einer Zellpassage von 15 verwendet, die HepG2-Zellen bis zu einer Zellpassage von 25.

3.2.1.3 Medienwechsel

Wurden HepG2 Zellen nicht nach 3 Tagen Kultivierung gesplittet, erfolgte nach 2-3 Tagen ein Medienwechsel. Das alte Zellkulturmedium wurde bis auf ca. 1 ml abgesaugt und durch das gleiche Volumen an frischem, vorgewärmten Zellkulturmedium ersetzt. Dieses wurde vorsichtig an der gegenüberliegenden Seite des Zellrasens in die Zellkulturflasche gegeben, um ein Ablösen der Zellen zu vermeiden. Der Wechsel des Mediums diente der Entfernung von Stoffwechselprodukten und Zugabe von neuen Nährstoffen.

3.2.1.4 Aussaat

Für die ATP- und MMP-Messungen nach Inkubation mit den Testsubstanzen wurden die Zellen in definierter Zellzahl auf Zellkulturplatten ausgesät. Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen, die eine Konfluenz von 70-80 % erreicht hatten, wurden für die Aussaat verwendet. Das Zellkulturmedium wurde zunächst abgesaugt und die Zellen wurden mit 1 ml Trypsin/EDTA behandelt um sie vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Bei HepG2-Zellen erfolgte vor der Trypsinzugabe ein Waschschriff mit PBS (1 %). Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Reaktion mit 9 ml frischem vorgewärmten reduzierten Medium abgestoppt und die Zellsuspension bei 1.000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge GS-6R). Der Überstand wurde abgesaugt und das resultierende Zellpellet in 1 ml reduziertem Medium aufgenommen und gelöst. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau (0,4 %) gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Trypanblau-Färbung dient der Überprüfung der Viabilität der Zellen. Der Farbstoff wird nur von toten Zellen aufgenommen, die im Mikroskop blau erscheinen. Es wurden somit nur helle und somit lebende Zellen in die Zellzahlbestimmung miteinbezogen. Über die Auszählung der Zellen in 4 großen Quadraten mit jeweils 16 Einzelquadraten der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl/ml aus dem Mittelwert der 4 großen Quadrate unter Einbezug des Verdünnungsfaktors mit Trypanblau (4) und dem Kammerfaktor (10^4 , Bezug der Zellen auf 1 ml) berechnet [Zellzahl/ml = (Mittelwert der 4 großen Quadrate) * $10 * 10^4$]. Die Zellsuspension wurde daraufhin entsprechend der bestimmten Zellzahl mit reduziertem Zellkulturmedium auf 1 Million Zellen/ml verdünnt. Diese Zellsuspension wurde direkt für die Aussaat auf 24-Well-Zellkulturplatten für die MMP-Messung verwendet, in dem 200 µl (200.000 Zellen) in jedes Well pipettiert wurden. Die Wells

wurden zuvor mit vorgewärmtem frischen reduzierten Zellkulturmedium bestückt, um ein Endvolumen von 500 µl zu erreichen. In dem Endvolumen eingeschlossen waren 100 µl Zellsuspension, die spätere Inkubationslösung (5-50 µl) und das reduzierte Zellkulturmedium. Für die ATP-Messung wurden die Zellen auf 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Dafür erfolgte zunächst eine 1:5-Verdünnung der Zellsuspension mit reduziertem Medium auf 200.000 Zellen/ml für PC12-Zellen bzw. eine 1:10-Verdünnung für HepG2-Zellen. Von dieser verdünnten Zellsuspension wurden 100 µl pro Well ohne Vorlage von Zellkulturmedium ausgesät (20.000 PC12-Zellen, 10.000 HepG2-Zellen). Die Zellkulturplatten wurden für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Zellinkubator gelagert, bevor sie mit den Testsubstanzen inkubiert wurden.

3.2.2 Zellinkubation

3.2.2.1 Herstellung der Stocklösungen

Die Traubenextrakte ExGrape Anthocyanins (Acy) und Resveratrol (Res) wurden für die Zellinkubation frisch gelöst. Zur Herstellung der Stocklösung wurden 10,0 mg ExGrape in 50 µl DMSO gelöst und auf 2 ml mit reduziertem Zellkulturmedium (ATP- und MMP-Messungen) bzw. vollem Zellkulturmedium (Proteincarbonylgehalt, Respirometrie) aufgefüllt (1:40, 5 mg/ml, 2,5 % DMSO). Für die Res-Variante konnte der Lösungsmittelanteil weiter reduziert werden. Somit wurden 10,0 bzw. 20,0 mg Res in 25 µl DMSO gelöst und auf 2 ml mit dem jeweiligen Zellkulturmedium aufgefüllt [1:40, 5 mg/ml, 2,5 % DMSO; 1:20, 10 mg/ml, 1,25 % DMSO].

Syringasäure (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland), pulverförmig, wurde bei Raumtemperatur gelagert und analog zu den Traubenextrakten frisch gelöst. Zur Herstellung der Stocklösung wurden 9,9 mg Syringasäure in 50 µl DMSO gelöst und auf 2 ml mit reduziertem Zellkulturmedium (ATP- und MMP-Messungen) bzw. vollem Zellkulturmedium (Proteincarbonylgehalt-Messungen) aufgefüllt [25 mM].

Für Hydroxytyrosol und DOPAC wurden zunächst Stocklösungen in H₂O wöchentlich neu hergestellt und bei -20°C gelagert (ATP-Messungen nach 7 h, MMP-Messungen und Respirometrie). Für die Stocklösungen wurden 10,0 mg Hydroxytyrosol in 1,3 ml H₂O gelöst [50 mM] sowie 10,1 mg DOPAC in 1,2 ml H₂O [50 mM]. Aufgrund eines unklaren Effektverlustes von Hydroxytyrosol wurden die Stocklösungen von Hydroxytyrosol und DOPAC für spätere Untersuchungen frisch am Inkubationstag in Zellkulturmedium hergestellt. Dies betraf alle ATP-Messungen nach 24 h, alle Untersuchungen mit der Kombination mit ExGrape, alle Messungen in PC12_{sw}-Zellen und alle Messungen zum Proteincarbonylgehalt.

Der Flüssigextrakt Hytolive wurde direkt frisch in Zellkulturmedium gelöst. Aufgrund seines Hydroxytyrosolgehaltes von 25 % wurde die Hytolive-Konzentration in Hydroxytyrosol-Äquivalenten [$\mu\text{M}_{\text{HyÄq}}$] berechnet. Die Stocklösung wurde aus 10 mg Hytolive und 1,3 ml H_2O hergestellt [$12,5 \mu\text{M}_{\text{HyÄq}}$].

3.2.2.2 Inkubation für ATP- und MMP-Messungen

Die Inkubationslösungen für die Untersuchung der Effekte auf die ATP-Spiegel und das MMP in PC12_{neo-}, PC12_{sw-} und HepG2-Zellen wurden aus den Stocklösungen (siehe 3.2.2.1) direkt vor Versuchsbeginn hergestellt. Die Verdünnungen der Stocks erfolgten mit reduziertem Zellkulturmedium mit dem für die gewünschte Endkonzentration im Well geeigneten Verdünnungsfaktor (Tab. 3.2). Die verdünnte Lösung V wurde für ATP-Messungen in einem Volumen von 1-10 μl pro Well zu den vorliegenden 100 μl reduziertem Medium (96-Well-Platte) gegeben. Für MMP-Messungen wurde die verdünnte Lösung V in einem Volumen von 5-50 μl zugegeben (24-Well-Platte). Die Vorlage des reduzierten Mediums bei der Zellaussaat der 24-Well-Platte wurde auf das Volumen der Inkubationslösung angepasst, sodass ein Endvolumen von 500 μl vorlag (siehe 3.2.1.4). Das gesamte Inkubationsschema ist in Tab. 3.2 dargestellt.

Für 7 h ATP-Messungen mit SNP-Schädigung wurden jeweils 12 Wells der 96-Well-Platte mit der Inkubationslösung der Testsubstanzen inkubiert und 12 Wells mit reinem reduziertem Zellkulturmedium (Kontrolle). Das Volumen der Mediumzugabe entsprach dem Mittelwert des Volumens der auf der Zellkultur eingesetzten Inkubationslösungen. Bei Einsatz eines Lösungsmittels wurden zusätzlich 3-4 Wells mit der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (DMSO, H_2O) versetzt. Bei der Untersuchung von mehr als drei Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz wurden die drei höchstkonzentrierten Lösungsmittelkontrollen aufgetragen. Nach 1 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % erfolgte die Schädigung mit Natriumnitroprussid (SNP) bei einem Teil der Zellen. SNP ist ein NO-Donor, welcher über oxidative Mechanismen zu einem Abfall des MMP führt und somit die Funktionalität der mitochondrialen Atmungskette beeinträchtigt und folglich die ATP-Spiegel in den Zellen absinken lässt. Die Hälfte der Wells (6 Wells), welche die Inkubationslösung und reines Zellkulturmedium erhalten hatten, wurden mit SNP, in einer Konzentration von 0,5 mM (1 μl SNP 50 mM), behandelt. Die verbleibenden Wells erhielten das gleiche Volumen reduziertes Zellkulturmedium. Die Zellen wurden anschließend für 6 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % inkubiert.

Für 24 h ATP-Messungen erfolgte keine Schädigung mit SNP, da dieses über den Zeitraum von 24 h für ATP-Messungen ungeeignet ist. Dementsprechend wurden nur 6 Wells mit der jeweiligen Zellinkubationslösung behandelt und 6 Wells mit reduziertem Zellkulturmedium (Mittelwert des Volumens der eingesetzten Zellinkubationslösungen).

Material und Methoden

Tab. 3.2: Inkubationsschema für ATP- und MMP-Messungen in Zellkulturversuchen. Verdünnungen erfolgten in reduziertem Medium, Gesamtvolumen/Well 500 µl (MMP) bzw. 100 µl (ATP).

	Konz Stock	Verdünnung Stock	Konz verdünnte Lösung (V)	Volumen von V/Well, ATP	Volumen von V/Well, MMP	Konz Well
ExGrape Acy, Res	5 mg/ml	1:50	0,1 mg/ml	1 µl		1 µg/ml
		1:20	0,25 mg/ml			2,5 µg/ml
		1:10	0,5 mg/ml			5 µg/ml
		1:5 (25)	1 (0,2) mg/ml	1 (5) µl	5 µl	10 µg/ml
		1:4	1,25 µg/ml	1 µl		12,5 µg/ml
		1:2 (5)	2,5 (1;0,5) mg/ml	1 (2,5;5) µl		25 µg/ml
		1:2 (5)	2,5 (5;1) mg/ml	2 (1;5) µl		10 µl
Syringasäure	25 mM	1:50	0,5 mM	1 µl		1 µM
		1:250 (50)	0,1 (0,5) mM	5 (1) µl	25 µl	5 µM
		1:25	1 mM	1 µl		10 µM
				2 µl	10 µl	20 µM
				3 µl	15 µl	30 µM
		5 µl	25 µl	50 µM		
1:2,5 (12,5)	10 (2) mM	1 (5) µl		100 µM		
Hydroxy-Tyrosol (Hy)	50 mM	1:800	62,5 µM	1 µl		0,625 µM
		1:500 (400)	0,1 (0,125) mM			1 (1,25) µM
		1:500 (200)	0,1 (0,25) mM	2,5 (1) µl	12,5 µl	2,5 µM
		1:100	0,5 mM	1 µl	50 µl	5 µM
		1:200	0,25 mM	2,5 µl		6,25 µM
		1:50 (250)	1 (0,2) mM	1 (5) µl		10 µM
		1:500	0,1 mM		50 µl	10 µM
		1:200	0,25 mM	5 µl		12,5 µM
		1:50 (20;100)	1 (2,5;0,5) mM	2,5 (1;5) µl	12,5 µl	25 µM
1:50 (100)	1 (0,5) mM	5 (10) µl	25 µl	50 µM		
Hytolive (OI)	12,5 mM _{HyÄq}	1:200	62,5 µM _{HyÄq}	1 µl		0,625 µM _{HyÄq}
		1:125 (100)	0,1 (0,125) mM _{HyÄq}			1 (1,25) µM _{HyÄq}
		1:50	0,25 mM _{HyÄq}		5 µl	2,5 µM _{HyÄq}
		1:50 (12,5)	0,25 (1) mM _{HyÄq}	4 (1) µl	20 µl	10 µM _{HyÄq}
		1:10 (50)	1,25 (0,25) mM _{HyÄq}	1 (5) µl		12,5 µM _{HyÄq}
		1:5 (25)	2,5 (0,5) mM _{HyÄq}	1 (5) µl	5 µl	25 µM _{HyÄq}
				2 (10) µl	10 µl	50 µM _{HyÄq}
DOPAC	50 mM	1:1000	0,05 mM	1 µl		0,5 µM
		1:1000 (500)	0,05 (0,1) mM	2 (1) µl	10 µl	1 µM
		1:1000 (200)	0,05 (0,25) mM	5 (1) µl	25 µl	2,5 µM
		1:50 (200)	1 (0,25) mM	1 (4) µl	5 µl	10 µM
		1:50	1 mM	2,5 µl	12,5 µl	25 µM

Konz: Konzentration, in Klammern angegeben sind alternativ eingesetzte Inkubationsansätze

Eine Lösungsmittelkontrolle wurde gegebenenfalls analog zur 7 h Messung mitgeführt. Die Zellen wurden anschließend für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % inkubiert. Für 24 h MMP-Messungen wurden 10 bzw. 12 Wells der 24-Well-Platte mit der Inkubationslösung der

jeweiligen Testsubstanz behandelt und 10 bzw. 12 Wells mit dem gleichen Volumen an reduziertem Zellkulturmedium (Kontrolle). Bei Einsatz eines Lösungsmittels wurden 4 Wells mit der Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach 1 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % erfolgte die Schädigung mit SNP bei einem Teil der Zellen. Die Hälfte der Wells (6 bzw. 5 Wells), welche die Inkubationslösung und reines Zellkulturmedium erhalten hatten, wurden mit SNP, in einer Konzentration von 0,5 mM (5 µl der 50 mM SNP-Lösung), behandelt. Die verbleibenden Wells erhielten das gleiche Volumen an reduziertem Zellkulturmedium. Die Zellen wurden anschließend für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % inkubiert.

3.2.2.3 Inkubation für respiratorische Messungen (Oxygraph-2k)

PC12_{neo}-Zellen (75 cm² Zellkulturflaschen) mit einer Konfluenz von 50-60 % wurden für 24 h mit 50 µg/ml ExGrape Acy und 25 µM Hydroxytyrosol inkubiert und anschließend für die Messung im Oxygraph-2k geerntet. Für die Inkubation wurde das alte Zellkulturmedium 24 h vor Zellernte abgenommen und jeweils eine Zellkulturflasche mit 10 ml Inkubationslösung der jeweiligen Testsubstanz und eine Flasche mit 10 ml Inkubationslösung der Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Für die Inkubation mit 50 µg/ml ExGrape Acy wurden 100 µl der Stocklösung (5 mg/ml, Kapitel 3.2.2.1) in 9,9 ml Zellkulturmedium gelöst. Die Lösungsmittelkontrolle bestand aus 0,025 % DMSO. Für die Inkubation mit 25 µM Hydroxytyrosol wurde die Stocklösung (50 mM, Kapitel 3.2.2.1) zunächst 1:2 mit Zellkulturmedium verdünnt. Von der verdünnten Hydroxytyrosol-Stocklösung wurden nachfolgend 10 µl in 10 ml Zellkulturmedium gelöst. Die Lösungsmittelkontrolle bestand aus 0,05 % H₂O. Die Inkubation der Zellkulturflaschen erfolgte über 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5 %.

3.2.2.4 Inkubation für die Bestimmung des Proteincarbonylgehalts

PC12_{neo}-Zellen (125 cm² Zellkulturflaschen) mit einer Konfluenz von 60-80 % wurden für 7 h mit 50 µg/ml ExGrape Acy, 25 µM Hydroxytyrosol, 50 µg/ml ExGrape Acy + 25 µM Hydroxytyrosol (50+25 Acy+Hy), 5 µM Syringasäure und 10 µM DOPAC inkubiert und anschließend für die Bestimmung des Proteincarbonylgehalts geerntet. Für die Inkubation wurde das alte Zellkulturmedium 7 h vor Zellernte abgenommen und durch 25 ml Inkubationslösung der jeweiligen Testsubstanz, Lösungsmittelkontrolle oder reines Zellkulturmedium ersetzt. Die Inkubationslösungen der Testsubstanzen wurden aus den in 3.2.2.1 beschriebenen Stocklösungen hergestellt. Das Inkubationsschema ist in Tab. 3.3 dargestellt. Für die Inkubation mit 50 µg/ml ExGrape Acy wurden 200 µl der Stocklösung in 19,8 ml Zellkulturmedium gelöst. Die Hydroxytyrosol-Inkubation erfolgte mit 10 µl der 1:2 in Zellkulturmedium verdünnten Stocklösung (50 mM), gelöst in 20 ml Zellkulturmedium. Für die 50+25 Acy+Hy Inkubation wurden 200 µl

der ExGrape Acy-Stocklösung und 10 µl der 1:2 verdünnten Hydroxytyrosol-Stocklösung zu 19,8 ml Zellkulturmedium gegeben. Der Syringasäurestock (25 mM) wurde mit Zellkulturmedium zunächst 1:50 verdünnt. Zu 19,8 ml Zellkulturmedium wurden dann 10µl der verdünnten Syringasäurestocklösung (0,5 mM) pipettiert, um eine 5 µM Syringasäurelösung zu erhalten. Für die Inkubation mit 10 µM DOPAC wurde der DOPAC-Stock (50 mM) zunächst 1:50 mit Zellkulturmedium verdünnt. Die resultierende verdünnte DOPAC-Stocklösung (1 mM) wurde dann in einem Volumen von 200 µl zu 19,8 ml Zellkulturmedium gegeben. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgte jeweils in zwei Zellkulturflaschen. Als Lösungsmittelkontrolle für die in DMSO gelösten Testsubstanzen ExGrape Acy, Acy+Hy und Syringasäure diente 0,025 % DMSO. Diese Lösungsmittelkontrolle entsprach der DMSO-Konzentration für Acy bzw. Acy+Hy. Der DMSO-Anteil in der Syringasäure-Inkubationslösung war 50-fach geringer. Zusätzlich wurden zwei Zellkulturflaschen mit reinem Zellkulturmedium behandelt.

Die Inkubation der Zellkulturflaschen erfolgte über 7 h im Brutschrank bei 37°C und 5 %.

Für die Untersuchung des Effekts einer SNP-Schädigung und des Einflusses der Testsubstanzen auf den Proteincarbonylgehalt bei SNP-Schädigung wurde 1 h nach Inkubationsbeginn in jeweils einer der zwei Zellkulturflaschen, die zuvor mit den Testsubstanzen oder reinem Zellkulturmedium inkubiert worden waren, 30 µl einer 100 mM SNP-Lösung hinzugegeben (150 µM SNP in der Zellkulturflasche). In den verbleibenden Zellen erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens an Zellkulturmedium.

Tab. 3.3: Inkubationsschema für die Bestimmung des Proteincarbonylgehalts. Alle Verdünnungen erfolgten in Zellkulturmedium.

	Stock	Verdünnung Stock	Konz verdünnte Lösung (V)	Inkubationslösung (V+Zellkulturmedium M)	Konz Inkubationslösung
ExGrape Acy	5 mg/ml			200 µl V + 19,8 ml M	50 µg/ml
Syringasäure	25 mM	1:50	0,5 mM	10 µl V + 20 ml M	5 µM
Hydroxytyrosol (Hy)	50 mM	1:2	25 mM	10 µl V + 20 ml M	25 µM
DOPAC	50 mM	1:50	1 mM	200 µl V + 19,8 ml M	10 µM
Acy+Hy				200 µl V (Acy) + 10 µl V (Hy) +19,8 ml M	50 µg/ml+25 µM
Lösungsmittel	100 %	1:40	2,5 %	200 µl V + 19,8 ml M	0,025 %

Konz: Konzentration; M: Zellkulturmedium; V: verdünnte Lösung

3.2.3 Zellernte

3.2.3.1 Zellernte für respiratorische Messungen

Nach 24 h Inkubation wurde die Inkubationslösung aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen einmal mit vorgewärmter PBS (1 %) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 10 ml Zellkulturmedium vom Flaschenboden ab gespült und die resultierende Zellsuspension bei 1.000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge GS-6R). Nach dem Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 1 ml vorgewärmtem Respirationsmedium MiR05 gelöst. 10 µl dieser Zellsuspension wurden zur Bestimmung der Zellzahl mit 90 µl Trypanblau (0,4 %) vermischt und in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Zellzahlbestimmung erfolgte wie in 3.2.1.4 beschrieben. Daraufhin wurde die Zellsuspension der Zellzahl entsprechend mit MiR05 verdünnt auf $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml eingestellt.

3.2.3.2 Zellernte für Proteincarbonylmessungen

Nach 7 h Inkubation wurde die Inkubationslösung aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die PC12_{neo}-Zellen mit 10 ml PBS (1 %) vom Flaschenboden ab gespült. Nach Zentrifugation der geernteten Zellen bei 3.000 rpm und 4°C für 10 min (Zentrifuge GS-6R) wurde der Zellüberstand abgesaugt und das Zellpellet in 300 µl PBS+EDTA aufgenommen. Die resultierende Zellsuspension wurde durch Ultraschallbehandlung auf Eis homogenisiert. Das Zellhomogenat wurde nachfolgend bei 10.000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert, der Überstand in zwei Proben zu je 150 µl aufgeteilt und bei -80°C eingefroren.

3.2.4 Tierhaltung und -studiendesigns

3.2.4.1 Allgemeine Tierhaltung

Die Mäuse waren in der Anlage für Kleintierhaltung des Pharmakologischen Instituts untergebracht. Die Tiere wurden in Makrolon Käfigen mit rostfreien Stahldeckeln gehalten, die mit Eintreu, Papiertüchern und Plastikrollen (höchstens 10 Tieren pro Käfig) ausgestattet waren. Die Haltung erfolgte unter Standardbedingungen (Raumtemperatur: 22°C, Luftfeuchtigkeit 55 %, 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus). Während Studien, in denen keine angereicherten Spezialfutterpellets eingesetzt wurden, hatten die Mäuse freien Zugang zu Standard-Futterpellets (1324, Altromin, Lage, Deutschland). Mit Ausnahme der Lebenszeitstudie, in der angereichertes Trinkwasser eingesetzt wurde, hatten die Tiere zudem freien Zugang zu Leistungswasser. Während der Studienphase wurde der Gesundheitsstatus der Mäuse regelmäßig kontrolliert und das Gewicht erfasst. Der Wiegerhythmus betrug in den mehrmonatigen Studien zwei Wochen

und in der Lebenszeitstudie einen Monat. In der Studie mit Verabreichung der Testsubstanz über die Knopfkanüle wurden die Tiere täglich gewogen, um die richtige Dosierung in Abhängigkeit des Körpergewichts zu gewährleisten. Die Haltung der Mäuse und Durchführung der Tierstudien erfolgte unter Berücksichtigung sämtlicher Tierschutzvorschriften.

3.2.4.2 Tierstudien mit Erfassung der mitochondrialen Funktion

Mit Ausnahme der Lebenszeitstudie, die in Abschnitt 3.2.4.3 separat beschrieben wird, wurde in allen Tierstudien die mitochondriale Funktion über das MMP und die ATP-Konzentration in dissoziierten Hirnzellen sowie über respiratorische Messungen erfasst. Dazu wurden die Tiere am Ende der Kurzzeit- bzw. Langzeitfütterungen durch Luxation der Halswirbelsäule und anschließende Dekapitation getötet. Das Blut wurde zur optionalen biochemischen und pharmakologischen Untersuchung nach der Dekapitation in einem Falcon-Röhrchen mit Heparin aufgefangen und das Plasma nach Zentrifugation bei 3.000 rpm bei -80°C gelagert. Das Gehirn der Tiere wurde zügig entnommen und das Cerebrum freigelegt. Eine Hemisphäre wurde nachfolgend direkt zur mechanischen Herstellung dissoziierter Hirnzellen genutzt sowie die obere Hälfte der zweiten Hemisphäre zur Isolation von Mitochondrien für respiratorische Messungen. Die zweite Hälfte der Hemisphäre wurde für weitere Untersuchungen wie quantitative *real-time* PCR-Analysen bei -80°C eingefroren. In den Studien mit TOP wurden die Hirnproben für die PCR-Analysen zunächst in *RNAlater* RNA Stabilization Reagent für 24 h bei 4°C gelagert und nachfolgend bei -80°C eingefroren. Leber und Nieren wurden zudem für weitere Analysen entnommen und bei -80°C gelagert.

In den Langzeitstudien wurden zusätzlich Verhaltenstests zur Erfassung der Gedächtnisleistung (*Social Recognition* Test, *Y-Maze* Tests, *Passive Avoidance* Test) und Motorik (Rotarod Test) durchgeführt. Die Tests erfolgten zum Ende der Fütterungsperioden sowie nach Möglichkeit vor der Fütterungsperiode zur zusätzlichen Ermittlung der basalen Leistung. Abb. 3.1 gibt einen Überblick über das Studiendesign der Langzeitstudien.

Material und Methoden

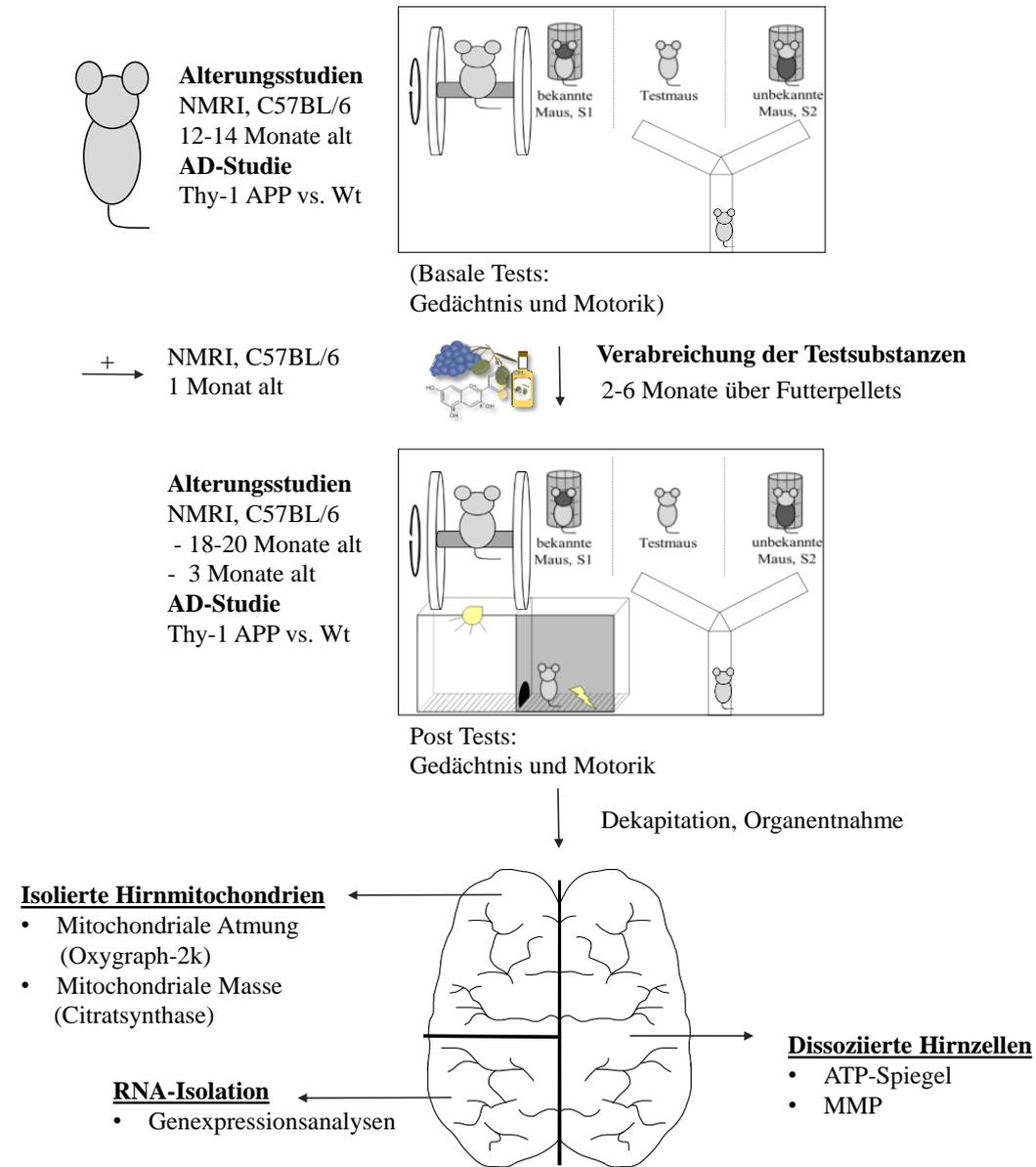


Abb. 3.1: Tierstudiendesign der Langzeitstudien. Schematische Darstellung des allgemeinen Designs der Studien mit Langzeitfütterungen.

Kurzzeitstudie mit ExGrape Acy in C57BL/6J-Mäusen

In der Kurzzeitstudie mit 3-wöchiger Verabreichung von 200 mg/kg KG/Tag ExGrape Acy über die Knopfkanüle sollte der kurzfristige Effekt auf die mitochondriale Funktion bei der Hirnalterung untersucht werden. Gealterte männliche C57BL/6J-Mäuse im Alter von 18-21 Monaten entstammten der institutseigenen Zucht und wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Junge C57BL/6J-Mäuse wurden von Charles River (Sulzbach, Deutschland) im Alter von 2 Monaten bezogen. Die Gruppeneinteilung ist in Tab. 3.4 dargestellt.

Tab. 3.4: Gruppen der Kurzzeitstudie mit Acy in C57BL/6J-Mäusen. Angegeben sind Gruppenname, Alter und Anzahl der Mäuse bei Studienbeginn sowie die Art der Verabreichung; 10 % PEG: 10 % wässrige Polyethylenglycol-Lösung.

Gruppe	Alter	Anzahl	Verabreichung per Knopfkanüle für 3 Wochen
Jung	2 Monate	9	10 % PEG
Alt	18-21 Monate	9	10 % PEG
Alt Acy	18-21 Monate	9	200 mg/kg KG ExGrape Acy/Tag in 10 % PEG

Nach dem Verabreichungszeitraum wurde die mitochondriale Funktion über das MMP und die ATP-Konzentrationen in dissoziierten Hirnzellen sowie anhand respiratorischer Messungen an isolierten Hirnmitochondrien bestimmt.

Langzeitstudie mit ExGrape Acy in C57BL/6J-Mäusen

Der Effekt der Langzeitfütterung mit ExGrape Acy auf die mitochondriale Funktion sowie die Gedächtnisleistung sollte in männlichen gealterten C57BL/6J-Mäusen (Charles River, Sulzbach, Deutschland) untersucht werden. ExGrape Acy wurde in einer Konzentration von 2 g/kg in Futterpellets verpresst (Altromin, Lage, Deutschland). Als Vergleichsextrakt wurde der Heidelbeerextrakt Actiplants Bilberry in der Konzentration 2 g/kg in Futterpellets verpresst. Als Basisfutter diente ein antioxidanzienarmes Futter von Altromin, Lage, Deutschland (C1000 mod. mit 2500 IU/kg Vitamin A; 20 mg/kg Vitamin E; 0 mg/kg Vitamin C; 0,150 mg/kg Selen). Das Basisfutter wurde als Grundlage für die Extraktanreicherung eingesetzt und in unangereicherter Form als Kontrollfutter an eine gleichaltrige Gruppe und eine junge Gruppe verfüttert. Die junge Gruppe wurde nach den ersten 4 Verabreichungsmonaten in einem Alter von 1 Monat in die Studie aufgenommen, um zum Studienende ein Alter von 3 Monaten zu erreichen. Die Gruppeneinteilung ist in Tab. 3.5 aufgeführt.

Tab. 3.5: Gruppen der Langzeitstudie mit Acy und HBE in C57BL/6J-Mäusen. Angegeben sind Gruppenname, Alter und Anzahl der Mäuse bei Studienbeginn sowie die Art der Verabreichung

Gruppe	Alter	Anzahl	Verabreichung in Futterpellets
Jung	1 Monat	15	C1000 mod. über 2 Monate
Alt	13 Monate	15	C1000 mod. über 6 Monate
Alt Acy	13 Monate	15	C1000 mod. + 2 g/kg ExGrape Acy über 6 Monate
Alt HBE	13 Monate	15	C1000 mod. + 2 g/kg HBE über 6 Monate

In der Langzeitstudie wurde die Erfassung der mitochondrialen Funktion am Ende der Studie durch Verhaltenstests zur kognitiven Funktion ergänzt. Weiterhin wurde die Genexpression mittels quantitativer *real-time* PCR in Hirn- und Leberhomogenat untersucht. Die kognitive Leistung der Mäuse wurde mittels *Social Recognition Test*, *1-Trial-Y-Maze* und *Passive Avoidance Test* erfasst. Für den *Social Recognition Test* wurde zudem auch ein basaler Wert vor Fütterungsbeginn genommen. Der *1-Trial-Y-Maze* Test befand sich zum Studienbeginn in der Etablierungsphase und wurde daher als Ergänzung in die Testbatterie nach der Fütterung mit aufgenommen. Der *Passive Avoidance Test* kann aufgrund einer starken Erinnerungsleistung der Mäuse an einen einmaligen Schock nur einmal erfolgen und wurde somit auch nur nach der Fütterungsphase durchgeführt. Das Studiendesign folgte der schematischen Darstellung in Abb. 3.1.

Langzeitstudie mit ExGrape Acy und Hydroxytyrosol in C57BL/6J-Mäusen

Die Langzeitstudie mit Hydroxytyrosol und der Kombination ExGrape Acy+Hy in männlichen gealterten C57BL/6J-Mäusen (Charles River, Sulzbach, Deutschland) wurde einen Monat versetzt zu der Langzeitstudie mit ExGrape Acy und HBE gestartet und hatte das gleiche, zuvor beschriebene Studiendesign. Die 14 Monate alten Tieren wurden in drei Gruppen eingeteilt, wie in Tab. 3.6 gezeigt ist.

Tab. 3.6: Gruppen der Langzeitstudie mit Acy und Hy in C57BL/6J-Mäusen. Angegeben sind Gruppenname, Alter und Anzahl der Mäuse bei Studienbeginn sowie die Art der Verabreichung

Gruppe	Alter	Anzahl	Verabreichung in Futterpellets
Jung	1 Monat	15	C1000 mod. über 2 Monate
Alt	14 Monate	17	C1000 mod. über 6 Monate
Alt Hy	14 Monate	16	C1000 mod.+ 0,9 g/kg Hydroxytyrosol über 6 Monate
Alt Acy+Hy	14 Monate	16	C1000 mod. + 2 g ExGrape Acy/0,9 g Hydroxytyrosol über 6 Monate

Die Hydroxytyrosol-Reinsubstanz wurde in einer Konzentration von 0,9 g in das C1000 mod. Futter analog zur Langzeitstudie mit ExGrape Acy und HBE verpresst; weiterhin wurde eine

Kombination bestehend aus 2 g ExGrape Acy/0,9 g Hydroxytyrosol eingesetzt (Altromin, Lage, Deutschland). Die Kontrollgruppen Jung und Alt erhielten unangereichertes C1000 mod. über 6 Monate (Alt) bzw. 2 Monate (Jung).

Die Erfassung der mitochondrialen Funktion und die Verhaltenstests erfolgten analog zur Langzeitstudie mit ExGrape Acy und HBE. Abweichend davon wurden keine Genexpressionsanalysen durchgeführt.

Langzeitstudie mit ExGrape Res, Hytolive und *Environmental Enrichment* in NMRI-Mäusen

Der Effekt von ExGrape Res in Kombination mit Hytolive und *Environmental Enrichment* wurde in gealterten NMRI-Mäusen (Männchen und Weibchen) aus institutseigener Haltung untersucht, die in drei Gruppen eingeteilt wurden. Als junge Kontrollgruppe wurden NMRI-Mäuse im Alter von 1 Monat von Charles River, Sulzbach, Deutschland, bezogen und für die letzten zwei Fütterungsmonate in die Studie mit einbezogen. Tab. 3.7 zeigt die Gruppeneinteilung der Studie. Die Futterpellets mit einer Konzentration von 1,6 g/kg ExGrape Res/1,6 g Hytolive wurden analog zu den zuvor beschriebenen Studien auf Grundlage der C1000 mod. Diät (Altromin, Lage, Deutschland) hergestellt, welches auch in dieser Studie als Kontrollfutter eingesetzt wurde. Die eingesetzten *Enrichment*-Maßnahmen werden in Abschnitt 3.2.7 näher beschrieben.

Tab. 3.7: Gruppen der Langzeitstudie mit RO und ROEn in NMRI-Mäusen. Angegeben sind Gruppenname, Alter und Anzahl der Mäuse bei Studienbeginn sowie die Art der Verabreichung

Gruppe	Alter	Anzahl	Verabreichung in Futterpellets
Jung	1 Monat	20	C1000 mod. über 2 Monate
Alt	12 Monate	29	C1000 mod. über 6 Monate
Alt RO	12 Monate	28	C1000 mod. + 1,6 g/kg ExGrape Res/1,6 g Hytolive über 6 Monate
Alt ROEn	12 Monate	27	C1000 mod. + 1,6 g/kg ExGrape Res/1,6g Hytolive + <i>Environmental Enrichment</i> über 6 Monate

Vor und nach der Fütterungsperiode wurden Verhaltenstests zur Gedächtnisleistung und Motorik durchgeführt. Die Erfassung der Gedächtnisleistung erfolgte anhand des 1-Trial- und 2-Trial-Y-Maze Tests und des *Passive Avoidance* Tests. Aufgrund einer starken Erinnerungsleistung der Mäuse an einen einmaligen Schock wurde der *Passive Avoidance* Test nur am Ende der Fütterungsperiode durchgeführt. Die motorische Leistung, erfasst durch den *Rotarod Test*, wurde vor und nach der Fütterungsperiode untersucht. Das Studiendesign folgte dem in Abb.

3.1 gezeigten Schema. Neben der Erfassung der mitochondrialen Funktion erfolgten Genexpressionsanalysen im Hirngewebe der Mäuse mittels quantitativer *real-time* PCR.

ExGrape Res, Hytolive und *Environmental Enrichment* im AD-Mausmodell

Für die Untersuchung des Effekts der Kombination aus ExGrape Res, Hytolive und *Environmental Enrichment* im AD-Modell Thy-1-APP₇₅₁SL wurden Thy-1-APP-transgene Tiere in der Kleintierhaltung des Pharmakologischen Instituts gezüchtet und genotypisiert. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mittels PCR von einer Schwanzbiopsie (Mäuse im Alter von ≥ 6 Wochen) vor Studieneinteilung und wurde nach Beenden der Studie mit einer frischen Schwanzbiopsie nochmals überprüft. Thy-1-APP-transgene Tiere (Männchen und Weibchen) wurden in drei Gruppen eingeteilt. Als Kontrollgruppen dienten Thy-1-APP-Wildtyp Mäuse (Männchen und Weibchen) (Tab. 3.8). Die Intervention erfolgte im AD-Modell für 8 Wochen beginnend mit einem Alter von 1-2 Monaten. Analog zur NMRI-Studie wurden Futterpellets mit 1,6 g ExGrape Res/1,6 g Hytolive auf Basis der C1000 mod. Diät (Altromin, Lage, Deutschland) eingesetzt. Die zusätzlich eingesetzten *Enrichment*-Maßnahmen werden in Abschnitt 3.2.7 näher beschrieben.

Tab. 3.8: Gruppen der AD-Studie mit RO und ROEn im Mausmodell Thy-1-APP. Angegeben sind Gruppenname, Alter und Anzahl der Mäuse bei Studienbeginn sowie die Art der Verabreichung

Gruppe	Alter	Anzahl	Verabreichung in Futterpellets
Wildtyp	1-2 Monate	17	C1000 mod. über 2 Monate
APP	1-2 Monate	18	C1000 mod. über 2 Monate
APP RO	1-2 Monate	17	C1000 mod. + 1,6 g/kg ExGrape Res/1,6 g Hytolive über 2 Monate
APP ROEn	1-2 Monate	15	C1000 mod. + 1,6 g/kg ExGrape Res/1,6 g Hytolive + <i>Environmental Enrichment</i> über 2 Monate

Zusätzlich zu der Untersuchung der mitochondrialen Funktion und der Gedächtnisleistung und Motorik in Verhaltenstests wurde der *Burrowing* Test und der *Nesting* Test zur Erfassung der Beeinträchtigung von Alltagsaktivitäten eingesetzt. Beide Tests erfordern eine Einzelhaltung der Tiere über Nacht, welche zu einer Entfremdung der zuvor in einem Käfig gehaltenen Tiere führen kann. Aufgrund der Aggressivität der Thy-1-APP-Männchen gegenüber fremden Männchen, wurden die basalen Tests folglich nur mit weiblichen Mäusen durchgeführt. Eine Zusammensetzung von Männchen nach der Einzelhaltung über Nacht hätte zu Rankämpfen mit Todesfolge führen können. Nach Abschluss der Fütterungsperiode wurden die Tests mit beiden Geschlechtern durchgeführt.

3.2.4.3 Lebenszeitstudie mit ExGrape Acy in C57BL/6J-Mäusen

In der Lebenszeitstudie mit ExGrape Acy wurden 100 männliche C57BL/6J-Mäuse von Charles River, Sulzbach, Deutschland, bezogen und im Alter von 6 Monaten in zwei Gruppen eingeteilt (Tab. 3.9). Abweichend zu den bisher beschriebenen Studiendesigns erstreckte sich die Verabreichungsperiode mit 2 mg/ml ExGrape Acy im Trinkwasser über die gesamte Lebenszeit der Mäuse. Die Trinklösungen wurden als alleinige Flüssigkeitsquelle eingesetzt. Auf Basis der geschätzten täglichen Flüssigkeitsaufnahme entspricht die Verabreichung einer Dosis von 200 mg/kg ExGrape Acy. Die Trinkflaschen wurden alle 3-4 Tage erneuert. Zur Verbesserung der Haltbarkeit und Stabilität der Trinklösungen erfolgte ein Zusatz von 2,7 mg/ml Kaliumsorbat und 1,2 mg/ml Citrat. In einem 3-Monatsintervall wurden Verhaltenstests zur Gedächtnisleitung und Motorik durchgeführt. Für die Tests, die zunächst den *Passive Avoidance* Test und den Rotarod Test umfassten, wurde eine Untergruppe von 15 Tieren herangezogen. Basale Leistungswerte vor Verabreichungsbeginn konnten für die motorische Leistung auf dem Rotarod gewonnen werden. Ab einem Alter von 12 Monaten wurde die Testbatterie zur kognitiven Leistung um den *Social Recognition* Test erweitert sowie ab dem Alter von 21 Monaten um den *1-Trial-Y-Maze* Test. Neben den Verhaltenstests wurden zur Erstellung von Überlebenskurven (Kaplan-Meier) die Todeszeitpunkte der Mäuse protokolliert.

Tab. 3.9: Gruppen der Lebenszeitstudie mit Acy in C57BL/6J-Mäusen. Angegeben sind Gruppenname, Alter und Anzahl der Mäuse bei Studienbeginn sowie die Art der Verabreichung, die Kontroll-Lösung beinhaltete 2,7 mg/ml Kaliumsorbat und 1,2 mg/ml Citrat

Gruppe	Alter	Anzahl	Verabreichung im Trinkwasser bis zum Lebensende
Kontrolle	6 Monate	50	Kontroll-Lösung
Acy	6 Monate	50	Kontroll-Lösung + 2 mg/ml ExGrape Acy

3.2.5 Genotypisierung von Thy-1-APP-transgenen Mäusen

Der Genotyp der Thy-1-APP₇₅₁SL-Mäuse, die aus der institutseigenen Zucht des Pharmakologischen Instituts entstammten, wurde mittels PCR von einer Schwanzbiopsie (Mäuse im Alter von ≥ 6 Wochen, Lagerung bei -20°C) bestimmt. Zur Isolierung der DNA wurden die Schwanzbiopsien (ca. 1,5 mm) mit 100 μl einer 1:40 mit H_2O (DEPC *treated water*) verdünnten 1 N NaOH für 20 min bei 98°C im Thermocycler inkubiert. Nach Zugabe von 100 μl eines 40 mM TRIS Puffers (nicht gepuffert) wurde 1 μl der Lösung mit 24 μl des PCR-Mastermix (Kapitel 3.1.4) vermischt. Anschließend erfolgte die Inkubation im Thermocycler (Cycler advanced Primus 25) (94°C für 15 min, gefolgt von 35 Zyklen 94°C für 20 s, 65°C für 40 s und 72°C für 1 min, gefolgt von 72°C für 10 min). Danach wurden die Proben mit 2 μl *Blue Juice*

versetzt und auf ein 1,5% Agarose Gel (1,2 g Agarose und 90 ml TAE versetzt mit Ethidiumbromid) geladen. Weiterhin wurde eine DNA-Leiter bestehend aus 8 μ l H₂O (DEPC treated water), 2 μ l DNA Ladder (100 bp), und 2 μ l DNA Loading Buffer aufgetragen. Als Positivkontrolle diente eine zuvor positiv getestete Probe, als Negativ-Kontrolle H₂O (DEPC treated water). Die Gelelektrophorese wurde bei 90 V für 2 min gefolgt von 120 V für 45 min durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels ultraviolettem Licht mit Hilfe des *Molecular Imager Gel Doc XR-Systems*. APP-transgene Thy-1-Mäuse zeigten eine Bande bei 500 bp, Thy-1-Wildtyp-Mäuse nicht. Die Genotypisierung erfolgte vor der Tierstudie sowie nach Fertigstellung der Studie mit einer neuen Schwanzbiopsie zur Bestätigung der richtigen Genotypisierung und somit korrekten Studieneinteilung.

3.2.6 Verhaltenstests

3.2.6.1 Y-Maze

Das Y-Maze wurde, in Zusammenarbeit mit Madeleine Müller, eigens aus weißen Polyvinylchlorid-Platten hergestellt. Es besteht aus drei identischen Armen (Länge: 36 cm, Höhe: 7 cm, Breite: 5 cm), die in einem Winkel von 180° angeordnet sind und während des Tests mit einer Acrylplatte abgedeckt wurden (Abb. 3.2).

Im **1-Trial-Y-Maze Test** wurde die spontane Alternation in einer einzigen Testphase erfasst. Die Maus wurde zu Beginn des Tests in einen der drei Arme gesetzt und die Eintritte in die drei Arme, gekennzeichnet mit A, B, C, wurden über einen Zeitraum von 5 min erfasst. Die spontane Alternationsrate, d. h. der Besuch aller drei Arme ohne vorher zum wiederholten Male einen der zwei anderen Arme besucht zu haben, wurde als Parameter des räumlichen Gedächtnisses erfasst (Abb. 3.2A). Der Eintritt wurde gewertet, wenn alle vier Pfoten in den Arm eingetreten waren; ein Austritt wurde gewertet, sobald die zwei Vorderpfoten den Arm verlassen hatten. Die Anzahl der Gesamteintritte in die drei Arme während der 5-minütigen Testphase gab weiterhin Aufschluss über die lokomotorische Aktivität der Mäuse.

Im **2-Trial-Y-Maze Test** wurden zwei Phasen durchlaufen (Abb. 3.2B). In der 1. Phase über 5 min wurde ein Arm des Y-Mazes mit einer kleinen weißen Polyvinylchlorid-Platte verschlossen und die Maus konnte für 5 min beide offenen Arme erkunden. Daraufhin wurde die Maus zurück in ihren Käfig gesetzt. Nach 2 h wurde die Maus erneut für 5 min in den Startarm des Y-Mazes positioniert, in dem nun alle drei Arme zugänglich waren. Die Aufenthaltszeit in dem alten Arm (zugänglich in 1. Phase) und die Aufenthaltszeit in dem neuen Arm (verschlossen in 1. Phase) wurde erfasst. Der Eintritt in einen Arm wurde analog zum 1-Trial-Ansatz gewertet,

wenn alle vier Pfoten in den Arm eingetreten waren; ein Austritt sobald die zwei Vorderpfoten den Arm verlassen hatten.

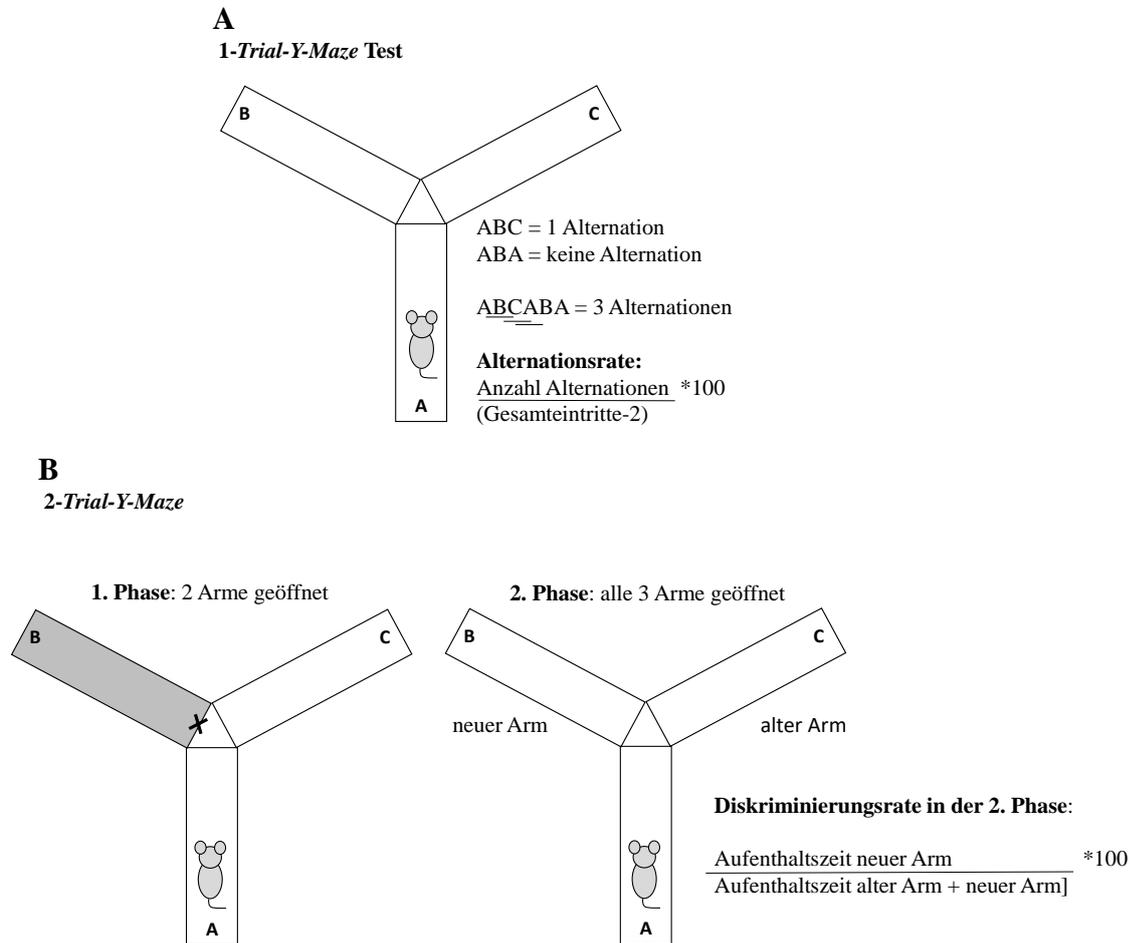


Abb. 3.2: Aufbau der Y-Maze Tests. **A:** Der 1-Trial-Y-Maze Test bestand aus einer 5-minütigen Phase in der die spontane Alternationsrate erfasst wurde, **B:** Der 2-Trial-Y-Maze Test umfasste zwei 5-minütige Phasen. In der 1. Phase wurde ein Arm verschlossen und in der 2. Phase die Aufenthaltszeit in dem zuvor verschlossenen Arm (neuer Arm) mit dem zuvor geöffneten Arm (alter Arm) über die Diskriminierungsrate verglichen.

Die Diskriminierungsrate [Aufenthaltszeit neuer Arm/Aufenthaltszeit alter Arm + neuer Arm]*100 lieferte Aufschluss über die Gedächtnisleistung der Maus, die von Natur aus einen unbekanntem Arm vorrangig erkunden würde. Die Startarme und nicht zugänglichen Arme des Y-Mazes wurden zwischen den Mäusen variiert. Nach jeder Maus wurde das Y-Maze mit 70 % Ethanol gereinigt.

3.2.6.2 Social Recognition Test

Der *Social Recognition* Test beruht auf der sozialen Wiedererkennung. Der Test wurde in einem 3-Kompartimentmodell in einem *open field* (2/3 eines 75*75 cm² Aufbaus) durchgeführt (Abb 3.3).

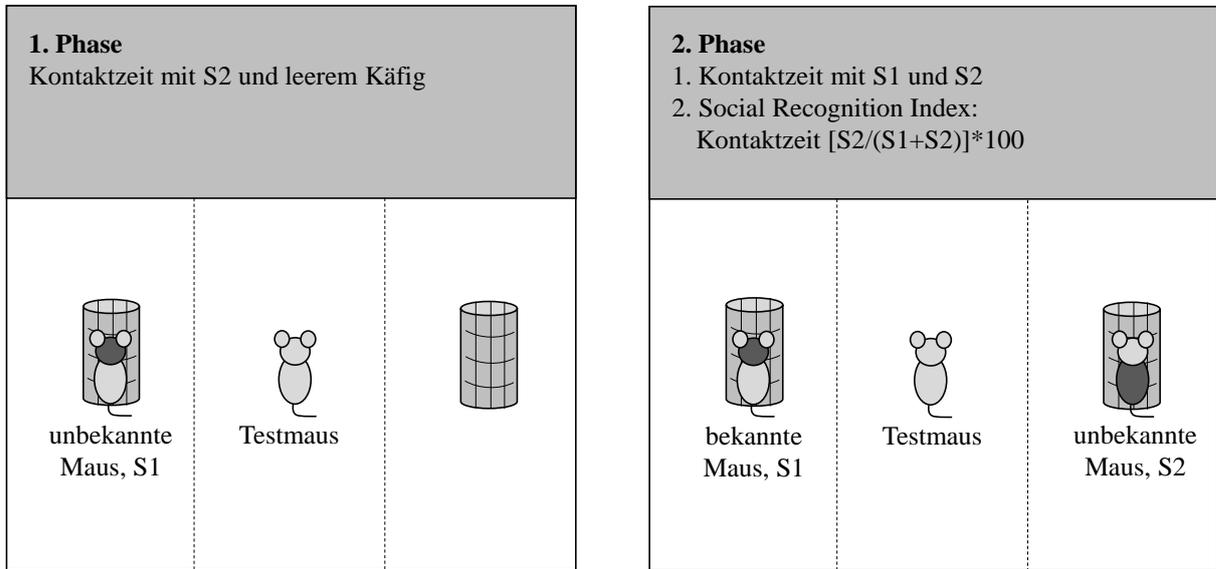


Abb 3.3:Aufbau des Social Recognition Tests. Der Test wurde in einem 3-Kompartimentmodell (2/3 eines 75*75 cm² *open field*) durchgeführt und unterteilte sich in eine 1. und 2. Phase. Die Kontaktzeiten der Testmaus mit bekannten/unbekannten Mäusen wurde jeweils über 5 min erfasst. Die Gedächtnisleistung wurde in der 2. Phase über die Kontaktzeit mit S1 (bekannte Maus) gegenüber S2 (unbekannte Maus) sowie der Berechnung des *Social Recognition* Indexes erfasst.

In den beiden äußeren Kompartimenten wurde jeweils in der Mitte ein Gitterkäfig aufgestellt unter den eine Maus platziert werden kann. Der Test durchlief zwei 5-minütige Phasen, die von einer 15-minütigen Pause getrennt sind. In der 1. Phase wurde einer der Gitterkäfige mit einer Maus bestückt, die der Testmaus bisher unbekannt war (S1). Der andere Gitterkäfig blieb leer. Die Testmaus wurde in das mittlere leere Kompartiment gesetzt und für 5 min beobachtet. Danach wurden alle Mäuse für 15 min aus dem *open field* genommen. In der 2. Phase wurden beide Gitterkäfige besetzt, der erste mit der schon bekannten Maus (S1) und der zweite mit einer neuen, der Testmaus unbekannt Maus (S2). Die Testmaus wurde wie zuvor in die Mitte des Systems gesetzt und für 5 min beobachtet. Dabei wurden Parameter wie die Aufenthaltszeit in den beiden äußeren Kompartimenten, die Kontaktzeit mit dem jeweiligen Gitterkäfig und Faktoren wie längeres Putzen oder Erstarren (*Freezing*) von zwei Beobachtern notiert. Eine höhere Aufenthaltszeit bzw. Kontaktzeit mit der unbekannt Maus (S2) verglichen mit der bekannten Maus (S1) in der 2. Phase wird mit einer sozialen Wiedererkennungsleistung und

somit mit einer Gedächtnisleitung assoziiert. Für diese Beurteilung hat sich in eigenen Untersuchungen die Kontaktzeit als konstanterer Parameter als die Aufenthaltszeit herausgestellt, sodass diese zusammen mit dem *Social Recognition Index*, berechnet aus Kontaktzeit $[S2/(S1+S2)]*100$ angegeben wird. Das 3-Kammersystem sowie die Gitterkäfige wurden nach jeder Maus sowie zwischen 1. und 2. Phase mit 70 % Ethanol gereinigt.

3.2.6.3 *Passive Avoidance Test*

Im *Passive Avoidance Test* sollte die Erinnerung an einen zuvor induzierten leichten elektrischen Schock untersucht werden. Der *Passive Avoidance Apparat* (Ugo Basile Srl, Gemoni, Italien) besteht aus einem 2-Kammersystem, bei dem eine hell erleuchtete Kammer von einer abgedunkelten Kammer durch ein verschließbares Tor getrennt sind (Abb. 3.4).

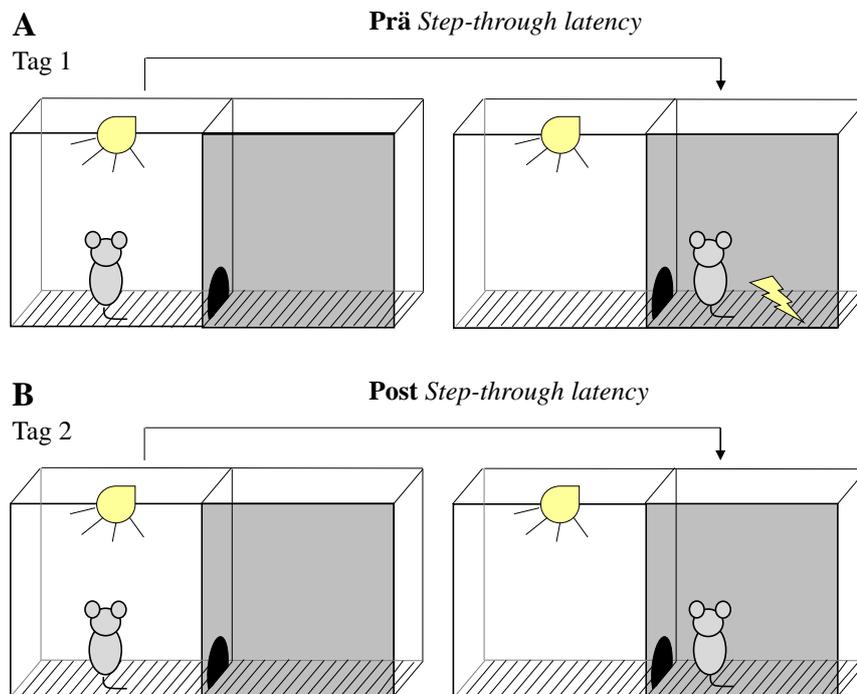


Abb. 3.4: Aufbau des *Passive Avoidance Tests*. Der Test wird in einem 2-Kammersystem durchgeführt, das zwei Kammern durch ein verschließbares Tor abtrennt. Die linke Kammer wird über eine Lampe hell erleuchtet und die andere ist abgedunkelt. **A:** Am Tag 1 wird die Übertrittszeit (*Prä Step-through latency*) von der erleuchteten in die abgedunkelte Kammer erfasst. Nach Übertritt in die dunkle Kammer wird ein leichter elektrischer Schlag über den aus Gitter bestehenden Boden verabreicht. **B:** Am Tag 2 wird erneut die Übertrittszeit (*Post Step-through latency*) erfasst, jedoch kein elektrischer Schlag vermittelt. Eine hohe *post Step-through latency* ist mit einem Langzeitgedächtnis assoziiert.

Setzt man die Maus in die erleuchtete Kammer flüchtet sie ihrer Natur entsprechend in die dunkle Kammer. Bei dem Eintritt in die dunkle Kammer wird das Tor geschlossen und ein leichter elektrischer Schock wird über den aus Gitter bestehenden Boden verabreicht. Zu einem

späteren Zeitpunkt, üblicherweise nach 24 h, wird das Erinnerungsvermögen an den Schock getestet, in dem die Maus erneut in die erleuchtete Kammer gesetzt wird. Die Zeit bis zum Übertritt in die dunkle Kammer (*Step-through latency*) nach dem Schock (post) wird mit der Zeit bis zum Übertritt vor dem Schock (prä) verglichen. Eine hohe post *Step-through latency* wird mit einem hohen Langzeiterinnerungsvermögen verbunden. Am 1. Tag wurde das Tor 30 s nach dem Hineinsetzen der Maus in die erleuchtete Kammer automatisch geöffnet. Bei dem Übertritt der Maus in die dunkle Kammer wurde über eine Wippe das Signal zum Schließen der Tür gegeben und ein elektrischer Schock für 2 s vermittelt. Für NMRI-Mäuse lag dieser nach Vorversuchen bei einer Stärke von 0,5 mA, für C57BL/6J-Mäuse bei einer Stärke von 0,2 mA. Bei jenen Mäusen, die 180 s in der erleuchteten Kammer verblieben, wurde der Versuch abgebrochen und die Tiere wurden vom Versuch ausgeschlossen. Nach 24 h wurden erfolgreich konditionierte Mäuse erneut in die erleuchtete Kammer gesetzt, das Tor öffnete sich 5 s danach automatisch und die post *Step-through latency* wurde erfasst. Mäuse, die beim post Test 300 s in der erleuchteten Kammer verbleiben, wurden dem Höchstwert von 300 s zugeordnet und der Test wurde beendet.

3.2.6.4 Rotarod Test

Der Rotarod Test beruht auf der Fortbewegung auf einer zunehmend schneller rotierenden Stange. Die *Latency to fall* gibt dabei an, wie lange sich die Testmaus auf der rotierenden Stange halten kann und gibt somit Auskunft über Kondition, Koordination und Balance. Der Test wurde auf dem Penlab Rotarod (Harvard apparatus, USA) mit aufsteigender Geschwindigkeit (von 1 rpm bis 40 rpm in 1 min) durchgeführt (Abb. 3.5).

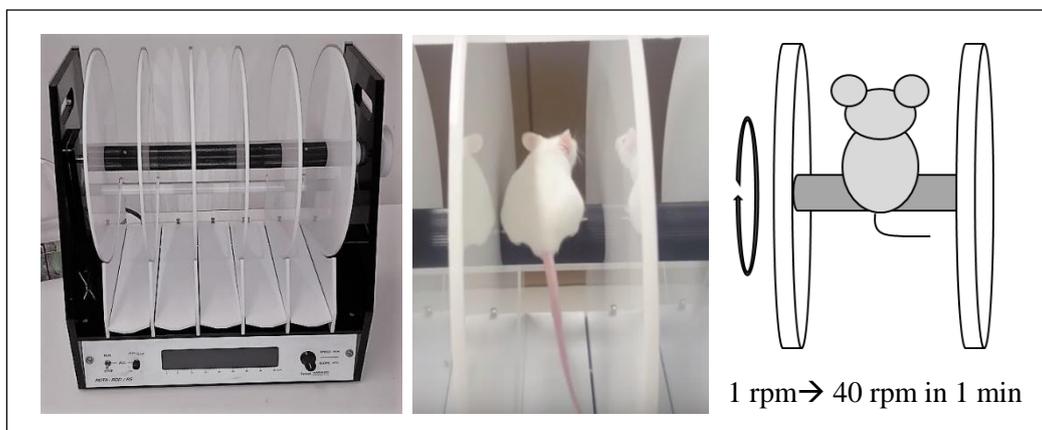


Abb. 3.5: Aufbau des Rotarod Tests. Fotografische Abbildung des Penlab Rotarods (links), einer Maus während der Testphase auf dem Rotarod (Mitte) und vereinfachte graphische Veranschaulichung (rechts).

Die Mäuse wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils drei Durchläufe auf das Rotarod gesetzt und die *Latency to fall* erfasst. Zwischen den drei Durchläufen lag eine 15-minütige Pause. Gewertet wurde die mittlere *Latency to fall* aus den drei Durchläufen des Tages mit der besten Leistung (Tag 2 oder Tag 3). Ein Verhalten der Maus, das zum frühzeitigen Runterfallen von der Rolle führte, wie z. B. das Umdrehen auf der Rolle führte zum Ausschluss des Einzelwertes.

3.2.6.5 Alltagsaktivitäten (*Burrowing* und *Nesting*)

Im Thy-1-APP-Mausmodell sollte getestet werden, inwieweit Beeinträchtigungen in speziestypischen Verhaltensweisen auftreten, die gleichwertig zu Beeinträchtigungen von Alltagsaktivitäten sind, die mit der AD beim Menschen assoziiert sind. Das *Burrowing* und das *Nesting* sind zwei sensitive und gut charakterisierte Tests, die Aufschluss über beeinträchtigte Alltagsaktivitäten geben können (Deacon 2012).

Der *Nesting Test* beruht darauf, dass sowohl weibliche als auch männliche Mäuse aus Gründen der Thermoregulation und Fortpflanzung Nestbau betreiben. Für den Test wurde ein Nestlet aus Baumwolle (5 cm² Quadrat) in einen Käfig mit Eintreu positioniert.

Jeweils eine Maus wurde 1 h vor Beginn der Dunkelphase in den bestückten Käfig gesetzt und der Nestbau am nächsten Tag anhand einer Bewertungsskala von 1-5 von zwei unabhängigen Personen bewertet (Abb 3.6).

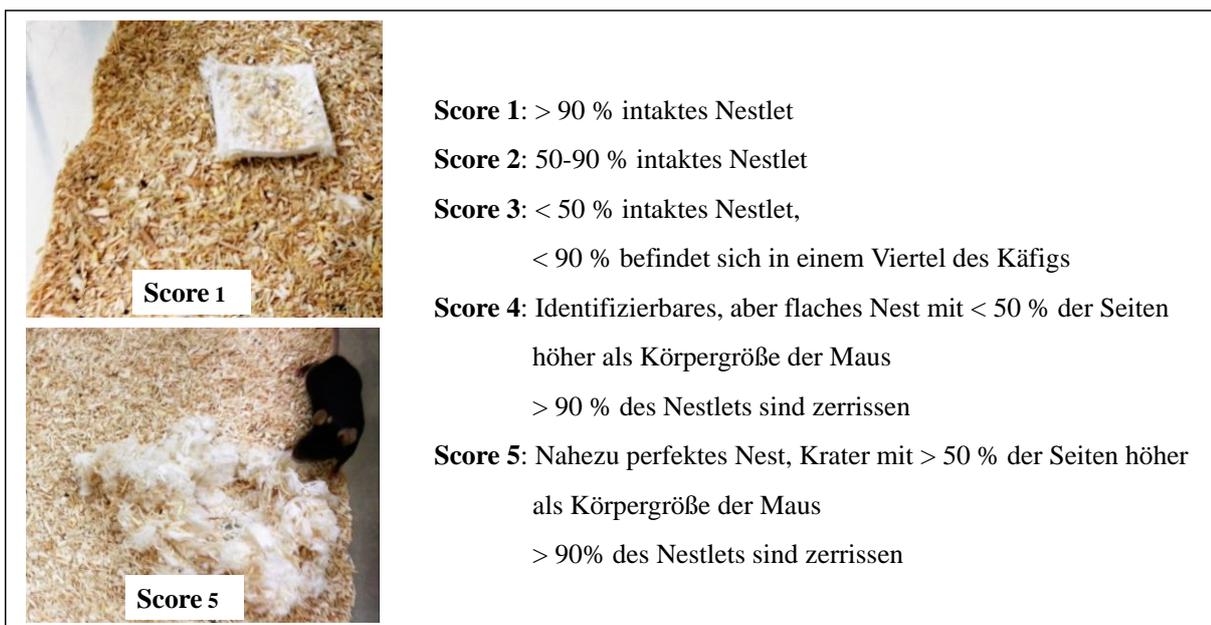


Abb 3.6: Bewertungsskala für den Nesting Test. Die Nestlets wurden anhand eines Scoresystems von 1-5 nach Deacon (2012) bewertet. Für den Score 1 und 5 sind Beispielfotografien aus der Fütterungsstudie mit Thy-1-APP-Mäusen abgebildet.

C57BL/6-Mäuse bauen üblicherweise Nester mit einem Score von 4-5 (Deacon 2012).

Der **Burrowing Test** beruht auf der Beobachtung, dass Mäuse, die über Nacht einen Behälter mit Futterpellets in den Käfig gestellt bekommen, diesen bis zum nächsten Morgen ausräumen. C57BL/6-Mäuse räumen typischerweise ca. 200 g Futterpellets über Nacht aus. Mäuse mit Hirnschäden zeigen dagegen eine geringere *Burrowing*-Aktivität (Deacon 2012). Der *Burrowing*-Behälter war eine ca. 20 cm lange, graue Polypropylen-Röhre, mit einem Durchmesser von ca. 6,7 cm (Eigenbau von Carmina Schäfer). Eine Seite wurde durch einen Mutterstopfen verschlossen und die offene Seite durch zwei 5 cm lange Schrauben erhöht. Die *Burrowing*-Röhren wurden mit 200 g zerkleinerten Futterpellets gefüllt und in einen Käfig mit Eintreupositioniert. Drei Stunden vor Beginn der Dunkelphase wurde jeweils eine Maus in den bestückten Käfig gesetzt und am nächsten Morgen das in der Röhre verbliebene Futter gewogen.

3.2.7 *Environmental Enrichment*

In den Fütterungsstudien, die eine Intervention mit *Environmental Enrichment* zur körperlichen und geistigen Anregung einschlossen, wurden die Käfige mit einem Laufrad und einer geistig anregenden Umgebung ausgestattet (Abb. 3.7).

A

Käfig ohne *Environmental Enrichment*



B

Käfig mit *Environmental Enrichment*

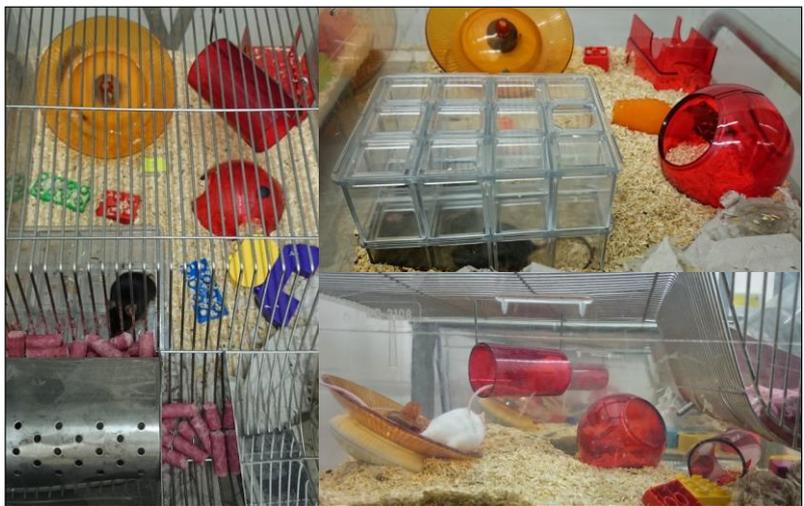


Abb. 3.7: *Environmental Enrichment* im Vergleich zur normalen Käfighaltung. A: Käfig ohne *Enrichment*-Maßnahmen B: Käfig mit *Enrichment*-Maßnahmen wie Häuschen, Schaukel mit oder ohne Röhre, begehbare Ball, Rolle zum Benagen, DUPLO-Steine, Nestlets (nur bei NMRI-Mäusen), 2-stöckiges Labyrinth und Laufrad; Beispielfotografien aus der Studienphase mit *Enrichment*-Intervention.

Zum *Environmental Enrichment* gehörten Häuschen, eine Schaukel mit oder ohne Röhre, ein begehbare Ball, eine Rolle zum Benagen, DUPLO-Steine, Nestlets (nur bei NMRI-Mäusen)

und ein 2-stöckiges Labyrinth aus 2*12 Einzelkompartimenten, die individuell zusammengefügt werden konnten. Die Anordnung des Labyrinths und die weiteren *Enrichment*-Maßnahmen wurden bei der Thy-1-APP-Studie alle zwei Wochen und bei der NMRI-Studie einmal im Monat gewechselt.

3.2.8 Isolation von Mitochondrien aus Gehirngewebe

Für die respiratorischen Messungen im Oxygraph-2k wurden Mitochondrien aus dem Gehirngewebe im Respirationsmediums MiR05, supplementiert mit einem Proteaseinhibitor (PI, *complete Protease Inhibitor Cocktail* Tablette), isoliert. Zunächst wurden ca. 80-120 mg Hirngewebe in 2 ml MiR05 + PI in einem Potter Homogenisator (800 rpm) homogenisiert. Um Zelltrümmer zu entfernen folgte eine Zentrifugation bei 1.400 g und 4°C für 7 min, sowie eine weitere Zentrifugation des Überstands bei 1.400 g für 3 min zum Waschen. Nach einer Zentrifugation des resultierenden Überstands bei 10.000 g und 4°C für 5 min wurden die im Zellpellet befindlichen Mitochondrien in 1 ml MiR05 + PI gelöst und erneut mittels Zentrifugation bei 1.400 g und 4°C für 3 min gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Mitochondrien im Zellpellet mittels Zentrifugation bei 10.000 g für 5 min und 4°C gesammelt und in 250 µl MiR05 + PI gelöst. 80 µl der Mitochondriensuspension wurden in eine Kammer des Oxygraph-2k eingespritzt. Die verbleibende Suspension wurde für die Bestimmung des Proteingehalts und Citratsynthase-Aktivitäts-Messungen bei -80°C gelagert.

3.2.9 Herstellung dissoziierter Hirnzellen

Für die mechanische Herstellung dissoziierter Hirnzellen wurde eine Hemisphäre eines Maushirns zunächst in eiskaltem Medium 1 gewaschen. Nach der Zerkleinerung mit einem Skalpell in 2 ml eiskaltem Medium 1 und Zugabe weiterer 2 ml des Mediums, erfolgte die Dissoziation durch zwei Nylonsiebe mit unterschiedlicher Maschenweite. Zunächst wurde die Flüssigkeit mit dem zerkleinerten Hirngewebe unter Zuhilfenahme einer Pasteurpipette durch ein Sieb mit einem Durchmesser von 200 µm in ein Becherglas mit 20 ml Medium 1 gedrückt. Die resultierende Suspension wurde mittels Pasteurpipette über ein Sieb mit einem Durchmesser von 102 µm weiter dissoziiert. Zum Waschen der Hirnsuspension erfolgten drei Zentrifugationsschritte bei jeweils 2.000 rpm für 5 min bei 4°C. Der Überstand wurde zweimal verworfen, das Zellpellet in 10 µl eiskaltem Medium 2 aufgenommen und mittels Pasteurpipette resuspendiert. Nach der dritten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 4,5 ml vorgewärmtem DMEM (ohne

Zusätze) resuspendiert. Von der fertigen Zellsuspension wurden jeweils 50 μl in 2*6 Wells einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät (für ATP-Messungen) und 250 μl in 2*6 Wells einer 24-Well-Zellkulturplatte (für MMP-Messungen). Jeweils die Hälfte der Zellen wurden mit SNP, gelöst in DMEM, behandelt. Die andere Hälfte der Zellen erhielt das gleiche Volumen DMEM. Die fertigen dissoziierten Hirnzellen weisen eine stabile Viabilität von ca. 14 h auf.

Die SNP-Konzentration lag für die Schädigung der dissoziierten Zellen für MMP-Messungen jeweils bei 2 mM (5 μl der 100 mM SNP-Lösung); für ATP-Messungen an C57BL/6J- und NMRI-Mäusen bei 0,1 mM (1 μl der 5 mM SNP-Lösung) und an Thy-1-APP-Mäusen bei 0,5 mM (1 μl der 25 mM SNP-Lösung). Die Zellkulturplatten wurden für 3 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.10 Quantitative *real-time* PCR

Isolation von RNA aus Gewebe

Die Isolation von RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Quiagen, Hilden) aus 20-30 mg Hirn- und Lebergewebe, das bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert wurde. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in der Zentrifuge 1-16K (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz). Das Gewebe wurde in RLT-Puffer (mit 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ β -Mercaptoethanol) mit einem Handpotter homogenisiert und nachfolgend mit 590 μl RNase-freiem H₂O und 10 μl Protein-kinase K (20 mg/ml) versetzt. Nach einer Inkubation bei 55°C unter Schütteln (300 rpm) für 10 min wurden die Proben bei 14.500 rpm und Raumtemperatur für 3 min zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand abgenommen und mit 450 μl Ethanol (100 %) versetzt. Nach vorsichtigem Vermischen mit der Pipette wurden 700 μl der Suspension auf eine RNeasy Säule in einem 2 ml Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zentrifugation bei 1.000 rpm für 30 s wurde der Durchfluss verworfen und der Vorgang für das Hirngewebe mit der restlichen Suspension wiederholt. Nachfolgend wurden 700 μl RW1 Puffer auf die Säule gegeben, wiederum bei 10.000 rpm für 15 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der Zentrifugationsschritt wurde nach Zugabe von 500 μl RPE Puffer noch einmal wiederholt. Nach erneuter Zugabe von 500 μl RPE Puffer auf die Säule erfolgte eine Zentrifugation bei 11.000 rpm für 2 min und nachfolgend für bei 14.500 rpm für 1 min. Anschließend wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 30 μl RNase-freiem H₂O versetzt um die isolierte RNA von der Säule zu spülen. Nach Zentrifugation bei 1.000 rpm für 1 min wurden nochmals 30 μl RNase-freies H₂O auf die Säule gegeben und erneut bei 1.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Schließlich erfolgte eine Zentrifugation bei 11.000 rpm um den Übergang der kompletten Flüssigkeit in das Eluat zu gewährleisten. Nachfolgend wurde am Nanodrop 2000c die RNA-Konzentration (1 μl

unverdünnt) bestimmt und die Reinheit der Isolation kontrolliert. Die Reinheit der RNA wurde über die Quozienten A260/A280 (1,8-2,0) und A260/A230 (> 1,5) kontrolliert.

Für die RNA aus Hirngewebe der NMRI-Mäuse wurde weiterhin eine DNase-Behandlung mittels TURBO DNA *free* Kit (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) durchgeführt. Zu 50 µl RNA (< 200 µg/ml) wurden 5 µl TURBO DNase-Puffer und 1 µl TURBO DNase hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 5 µl DNase *Inactivation* Reagenz hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10.000 g und Raumtemperatur für 90 s wurde der Überstand abgenommen und die RNA-Konzentration sowie Reinheit am Nanodrop 2000c wie zuvor beschrieben ermittelt.

Die mRNA wurde entsprechend der bestimmten Konzentration für die cDNA-Synthese aliquotiert (250 ng RNA pro Syntheseansatz) und bei -80°C gelagert.

Herstellung von cDNA

Die Synthese der cDNA erfolgte mit Hilfe des iScript™ cDNA *Synthesis Kit* (Bio-Rad, München). Zur Herstellung der cDNA wurden die RNA-Aliquots (250 ng RNA) aufgetaut und mit RNase-freiem H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Zu jeder Probe wurden daraufhin 10 µl Mastermix, bestehend aus 5 µl RNase-freiem H₂O, 4 µl *iScriptase Reaction Mix* und 1 µl *iScript Reverse Transcriptase*, hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation im Thermocycler (Cycler advanced Primus 25) (5 min bei 25 °C, 30 min bei 42°C und 5 min bei 85°C, Deckeltemperatur 105°C). Die fertige cDNA wurde in Aliquots bei -80°C gelagert.

Durchführung der quantitativen *real-time* PCR

Die mRNA-Expression (Genexpression) wurde mittels quantitativer *real-time* PCR (qPCR) mit Hilfe von Target spezifischen Primern am *real-time* PCR *Detection System* CFX96 Kit (Bio-Rad, München) gemessen. Dazu wurden die Aliquots der bei -80°C gelagerten cDNA zunächst aufgetaut und 1:2 mit RNase -freiem H₂O verdünnt. Auf eine 96-Well PCR-Platte (*Hard-Shell*) wurden 8 µl pro Well des Mastermixes bestehend aus 5 µl *SYBR Green Supermix* und verdünntem Primer Stock (Kapitel 1.1.1) aufgetragen. Die verdünnte cDNA wurde im Anschluss in einem Volumen von 2 µl pro Well in Triplets hinzugegeben. Als Kontrolle diente RNase-freies H₂O. Die PCR-Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und im Thermocycler inkubiert. Nach einer Inkubation über 3 min bei 95°C (Aktivierung der Polymerase und initiale Denaturierung), erfolgte für die meisten Gene eine Inkubation für 10 s bei 95°C (Denaturierung), 45 s

bei 58°C (Annealing), 29 s bei 72°C (Elongation) für 45 Zyklen. Abweichend davon wurde das Annealing bei SIRT 3 für 30 s bei 60 °C durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mittels der 2- $\Delta\Delta C_q$ Methode mit Hilfe des BioRad CFX Manager (BioRad, München) und Biogazelle qBase+ (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgien).

3.2.11 Messung des mitochondrialen Membranpotenzials

Die Messung des MMPs erfolgte fluorimetrisch nach Zugabe des positiv geladenen Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 123 (R 123). Der Membranfarbstoff lagert sich entsprechend der Protonendichte an der inneren Mitochondrienmembran an und seine Emission ist proportional zur Elektronegativität der inneren Mitochondrienmembran. Das MMP wurde in 24-Well Zellkulturplatten nach Aussaat (Kapitel 3.2.1.4) und Inkubation (Kapitel 3.2.2.2) von PC12-Zellen bzw. Aussaat von dissoziierten Hirnzellen (Kapitel 3.2.9) mittels Zugabe von 0,4 μM R 123 (10 μl bzw. 5 μl R 123 [20 μM]) bestimmt. Nach 15 min Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 wurde die Reaktion mit 500 μl bzw. 250 μl /pro Well HBSS gestoppt. Nach Zentrifugation bei 1.500 rpm bzw. 3.000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Zellen erneut mit 500 μl bzw. 250 μl /pro Well HBSS versorgt. Die Fluoreszenz in jedem Well wurde im Victor X3 2030 *Multilable Reader* (Exzitation 490 nm/Emmission 535 nm) in vier aufeinanderfolgenden Messungen erfasst. Für die dissoziierten Hirnzellen erfolgte direkt vor der Messung eine Resuspendierung der Zellen sowie spätere Normierung des MMPs auf den Proteingehalt. Bei den PC12-Zellen wurde zuvor eine definierte Zellzahl von 200.000 Zellen ausgesät.

3.2.12 Messung der ATP-Konzentration

Die ATP-Konzentration wurde in 96-Well-Zellkulturplatten (*white walled*) nach Aussaat (Kapitel 3.2.1.4) und Inkubation (Kapitel 3.2.2.2) von PC12- und HepG2-Zellen bzw. Aussaat von dissoziierten Hirnzellen (Kapitel 3.2.9) mit dem *ViaLight Plus Bioluminescence Kit* (Lonza, Walkersville, USA) bestimmt. Die Messung beruht auf der Umsetzung von ATP und Luciferin zu Licht mittels Luciferase. Die entstehende Biolumineszenz ist proportional zur ATP-Konzentration. Über einen ATP-Standard (0,01-5 μM) kann die ATP-Konzentration in den Wells bestimmt werden. Es werden zunächst 50 μl (PC12- und HepG2-Zellen) bzw. 25 μl (dissoziierte Hirnzellen) *Cell Lysis Reagent* zur Zellsuspension gegeben, um ATP aus den Zellen zu extrahieren. Nach 10 min Inkubation erfolgte die Zugabe von 100 μl bzw. 50 μl *ATP Monitoring Reagent plus*. Die Biolumineszenz wurde nach 5 min im Victor X3 2030 *Multilable Reader* erfasst. Die ATP-Konzentration in dissoziierten Hirnzellen wurde auf den Proteingehalt bezogen. PC12- und HepG2-Zellen wurden zuvor in definierter Zellzahl ausgesät.

3.2.13 Respiratorische Messung (Oxygraph-2k)

Die Untersuchung der mitochondrialen Atmung erfolgte mittels dem Oxygraph-2k System (Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich). Das System verfügt über zwei unabhängige Kammern, in denen der Sauerstoffverbrauch im Zeitverlauf nach Zugabe von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren der mitochondrialen Atmung gemessen wird. Dadurch kann man mitochondriale Atmungsaktivitäten (u. a. einzelne Komplexaktivitäten) von zwei Proben erfassen und miteinander vergleichen. Respiratorische Messungen erfolgten in PC12-Zellen nach Inkubation mit den Testsubstanzen (Kapitel 3.2.2.3) und in isolierten Hirnmitochondrien (Kapitel 3.2.3.1). Vor der Messung wurden jeweils 2,4 ml MIR05 (37 °C) in die Kammern gegeben und für ca. 30 min äquilibriert. Für die Messung an isolierten Hirnmitochondrien wurden nach Schließung der Kammern und Stabilisierung des Signals 80 µl Mitochondriensuspension in die Kammern eingespritzt und äquilibriert. Für die Messung an Zellen wurde das MIR05 komplett entfernt und durch 2,4 ml Zellsuspension [10^6 Zellen/ml MIR05] ersetzt und äquilibriert (endogene Atmung). Weiterhin erfolgte zusätzlich eine Permeabilisierung der intakten Zellen mit Digitonin [$10 \mu\text{g}/10^6$ Zellen] nach Stabilisierung der endogenen Atmung. Für beide Suspensionsarten folgte daraufhin die Zugabe von Komplex 1-Substraten. Hirnmitochondrien erhielten Pyruvat [5 mM] und Malat [2 mM]; Zellen erhielten Glutamat [10 mM] und Malat [2 mM] (*Leak*-Atmung ohne ADP, Leak (P/M)). Die nachfolgende Zugabe von ADP [2 mM] ermöglichte die Erfassung der Komplex I-Aktivität (KI). Nach Zusatz des Komplex II-Substrats Succinat [10 mM] wurde weiterhin die maximale physiologische Atmung (KI+KII) bestimmt. Bei den isolierten Hirnmitochondrien erfolgte zur Kontrolle der mitochondrialen Integrität danach eine Zugabe von Cyt c [10 mM]. Für beide Suspensionsarten wurde im nächsten Schritt Oligomycin (Omy) [2 µg/ml] zugegeben um Komplex V zu hemmen (*Leak*-Atmung nach Omy-Zugabe, Leak(Omy)). Zur Entkopplung der mitochondrialen Atmung wurde nachfolgend FCCP schrittweise hinzupipettiert (0,5 µM Schritte) bis kein weiterer Sauerstoffanstieg mehr zu messen war, sodass die maximale Aktivität des Elektronentransfersystems (ETS) erfasst werden konnte. Nach der Entkopplung wurde Komplex I durch die Hinzugabe von Rotenon [0,5 µM] gehemmt, wodurch die entkoppelte Komplex II-Atmung (KII_{ETS}) erfasst wurde. Der weitere Zusatz von Antimycin A [2,5 µM] und somit Hemmung von Komplex III ermöglichte die Messung der *Residual oxygen consumption* (ROX), dem Sauerstoffverbrauch ohne Beteiligung der mitochondrialen Atmung. Im letzten Schritt wurde TMPD [0,5 mM], ein künstliches KIV-Substrat, zusammen mit Ascorbat [2 mM] zur TMPD-Regeneration, hinzugegeben (Komplex IV-Atmung (KIV)) und der Sauerstoffverbrauch nach finaler Zugabe von Natriumazid [> 100 mM] wurde von KIV subtrahiert. Weiterhin wurde von allen Atmungsaktivitäten ROX abgezogen.

Um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff während der Messung zu gewährleisten wurden die Kammern zwischendurch kurz geöffnet. Dies erfolgte üblicherweise nach Zugabe von Oligomycin, Antimycin A und TMPD/Ascorbat. Die Integrität der isolierten Mitochondrien wurde als gut betrachtet, wenn die Atmung nach Zugabe von Cyt c nicht über 10 % anstieg. Ein Beispiel einer respiratorischen Messung mit isolierten Hirnmitochondrien ist in Abb. 3.8 dargestellt.

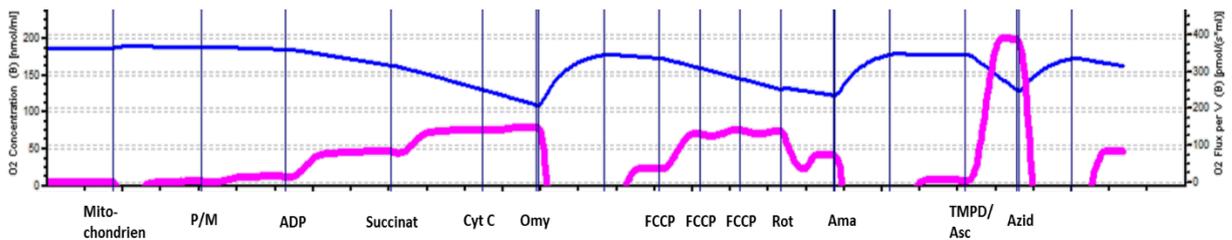


Abb. 3.8: Beispiel einer respiratorischen Messung (Oxygraph-2k) mit isolierten Hirnmitochondrien. Die Sauerstoffkonzentration ist in blau, der Sauerstoffverbrauch in violett dargestellt. P/M: Zugabe von Pyruvat und Malat; Cyt c: Zugabe von Cytochrom C; Omy: Zugabe von Omy; Rot: Zugabe von Rotenon, Ama: Zugabe von Antimycin A, TMPD/Asc: Zugabe von TMPD und Ascorbat.

3.2.14 Messung der Citratsynthase-Aktivität

Die Citratsynthase ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und ein quantitativer Marker für die Masse intakter Mitochondrien. Die Citratsynthase katalysiert die Reaktion von Acetyl-CoA mit Oxalacetat zu Citrat und CoA-SH. Bei der photometrischen Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität (CS) wird diese geschwindigkeitslimitierende Reaktion an die irreversible Umsetzung von Dithionitrobenzoesäure (DTNB) mit CoA-SH zu Thionitrobenzoesäure (TNB) und CoA-S-S-TNB gekoppelt. Die Absorption von TNB bei 412 nm nimmt linear mit seiner Konzentration zu und wird über 200 s im Spektrometer erfasst. Die CS wurde in isolierten Maushirnmitochondrien und intakten PC12-Zellen (10^6 Zellen/ml) nach dem Protokoll von Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich, bestimmt. Die verwendete Mitochondrien- bzw. Zellsuspension war jeweils ein Aliquot der Lösung für die respiratorischen Messungen und wurde bis zur CS-Messung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden $200\ \mu\text{l}$ der Zellsuspension bzw. $10\ \mu\text{l}$ der Mitochondriensuspension zu dem Reaktionsmedium für die Messung der CS (Kapitel 3.2.14), zusammengesetzt aus $100\ \mu\text{l}$ DTNB [$1,01\ \text{mM}$], $25\ \mu\text{l}$ Triton-X-100 [$10\ \%$], $50\ \mu\text{l}$ Oxalacetat [$10\ \text{mM}$] und $25\ \mu\text{l}$ Acetyl-CoA [$12,2\ \text{mM}$], gegeben. Dem Reaktionsmedium wurde H_2O zugeführt, sodass ein Endvolumen von $1\ \text{ml}$ erreicht wurde. Die Zellsuspension und das Reaktionsmedium wurden zuvor für $5\ \text{min}$ auf 30°C im Wasserbad erwärmt. Nach dem Zusammenführen von Probe und Reaktionsmedium wurde die Messlösung

in eine Quartz Küvette überführt und sofort im Spektrometer bei 412 nm über 200 s (einfache Kinetik, 10 s Intervall) vermessen. Es wurden Mittelwerte aus 2-3 Messungen berechnet. Die spezifische CS v wurde über die Rate der Absorptionsänderung r_A unter Einbezug des Verdünnungsfaktors der Probe in der Messlösung V über die Formel: v [$\mu\text{mol}/\text{min}$] = $(r_A$ [min^{-1}]/13,6 [mM^{-1}])* V/ml berechnet und in *International Units*, IU [$\mu\text{mol}/\text{min}$], normiert auf 10^6 Zellen für PC12-Zellen oder normiert auf mg Protein für Hirnmitochondrien angegeben.

3.2.15 Bestimmung des Proteincarbonylgehalts

Die Bestimmung des Proteincarbonylgehalts erfolgte mittels dem Protein Carbonyl Content Assay Kit (Sigma-Aldrich) und der zugehörigen Anleitung. Pro Messung wurde jeweils einer der zwei Aliquots des gewonnenen Zellüberstands (je 150 μl) (Kapitel 3.2.3.2) aufgetaut und einer Streptozozin-Behandlung unterzogen. Diese Behandlung wird in der Anleitung des Kits empfohlen, um eine Störung der Messung durch hohe Mengen an Nukleinsäuren zu vermeiden. Zu den 150 μl Zellüberstand wurden 15 μl der 10 % Streptozozin-Lösung gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 g und Raumtemperatur für 5 min. Der resultierende Überstand wurde für die Bestimmung des Proteincarbonylgehalts verwendet und somit mit 100 μl DNPH bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Nachfolgend wurden 30 μl Trichloressigsäure (TCA, 100 %) hinzugegeben und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch bei 13.000 g und Raumtemperatur für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um freies DNPH zu entfernen wurde das Zellpellet zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Hierzu wurde das Zellpellet nach Zugabe von 500 μl des Acetons für 30 s in ein Ultraschallbad gestellt und nachfolgend für 5 min bei -20°C für 5 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 g und Raumtemperatur für 2 min wurde das Aceton abgenommen und die Prozedur wiederholt. Anschließend wurde 200 μl einer Guanidin-Lösung (6 M) zum Zellpellet gegeben und mittels Ultraschallbehandlung auf Eis homogenisiert. 100 μl dieser Lösung wurden in jeweils ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Zusätzlich wurde ein Well mit 100 μl H_2O bestückt. Um Luftblasen zu entfernen, die regelmäßig beim Pipettieren der Lösung in die Wells entstehen, wurde die 96-Well-Platte anschließend bei 3.250 rpm für 20 min zentrifugiert (Zentrifuge GS-6R). Die Messung des Proteincarbonylgehalt wurde nachfolgend photometrisch bei 380 nm durchgeführt (Victor X3 Multilabel Counter). Die restliche Suspension wurde jeweils zur Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA Protein Assay Kit verwendet (Kapitel 3.2.16). Die Berechnung des Proteincarbonylgehalts (C [nmol/Well]) erfolgte anhand der gemessenen Absorption (A_{380}) mit folgender Formel: C [nmol/Well] = $(A_{380}/6,364)*100$. Die Absorption der H_2O -Kontrolle wurde

zuvor von jeder Probe subtrahiert. Der Proteincarbonylgehalt (C [nmol/Well]) wurde anschließend auf den Proteingehalt bezogen. Es wurden jeweils Mittelwerte aus den zwei unabhängig voneinander aufgearbeiteten und gemessenen Aliquots (2*150 µl Zellüberstand) gebildet.

3.2.16 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt wurde mittels dem BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) bestimmt. Im alkalischen Milieu wird Cu^{2+} von Proteinen zu Cu^+ reduziert, welches kolorimetrisch mit Bicinchinonsäure (*Bicinchinonic acid*, BCA) erfasst werden kann. Nach Homogenisieren der Proben mittels Ultraschallbehandlung wurden diese mit PBS verdünnt. Als Proteinstandard diente BSA (*Bovine serum albumin*) in einer Konzentration von 0,1-1 mg/ml. Die Proteinbestimmung erfolgte in Triplets auf einer 96-Well Platte mit 10 µl verdünnter Probe/Well. Es wurden nachfolgend 200 µl Arbeitslösung (Mischung aus Reagent A und B im Verhältnis 50:1) in jedes Well gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Absorption bei 570 nm wurde am Victor 1420 Multilabel Reader gemessen und die Proteinkonzentration über die Standardreihe errechnet.

3.2.17 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism Version 5.03. Die erhobenen Messwerte sind dargestellt als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwerts (\pm SEM). Für die statistische Überprüfung von Unterschieden zwischen zwei Messgruppen wurde der ungepaarte, zweiseitige *t*-Test durchgeführt, für Unterschiede zwischen mehr als zwei Messgruppen eine 1-way ANOVA mit dem Tukey's Multiple Comparison Test. Zum Vergleich von Gruppen mit zwei oder mehr Messparametern wurde eine 2-way ANOVA mit Bonferroni post Tests angewendet. Wurden im Rahmen der Tierstudien Messdaten vor und nach der Fütterung bzw. Zeitverläufe erhoben, wurde ein gepaarter *t*-Test bzw. eine *repeated measures* ANOVA durchgeführt. Beim *Passive Avoidance*, *Burrowing* und *Nesting* Test sind die Daten als Mittelwert (\pm 90 % Konfidenzintervall, KI) angegeben. Für die statistische Überprüfung von Unterschieden zwischen zwei Messgruppen wurde hier bei ungepaarten Daten der Mann Whitney Test sowie bei gepaarten Daten der Wilcoxon matched-pairs signed rank Test durchgeführt. Zum Vergleich von Gruppen mit zwei oder mehr Messparametern wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Multiple Comparison Test angewandt. Der Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven in der Lebenszeitstudie erfolgte über den Log-rank Test.

4 Ergebnisse

4.1 ExGrape Traubenextrakte und Olivenpolyphenole im Zellmodell

Zunächst sollte der Einfluss der polyphenolreichen ExGrape Traubenextrakte und Olivenpolyphenole auf die mitochondriale Funktion im Zellmodell untersucht werden. Der anthocyanreiche Traubenextrakt ExGrape Acy (Acy) und das Olivenpolyphenol Hydroxytyrosol (Hy) wurden hinsichtlich ihrer Effekte auf die ATP-Spiegel, das MMP und die mitochondriale Atmung untersucht. Der bei der Alterung beobachtete gesteigerte oxidative und nitrosative Stress und die daraus resultierenden Beeinträchtigungen der mitochondrialen Funktion sollten mit dem NO-Donor SNP induziert werden. Zudem wurden verschiedene Kombinationen beider Testsubstanzen auf mögliche additive oder synergistische Effekte getestet. Darauffolgend sollte der Frage nachgegangen werden, ob der Traubenextrakt ExGrape Res (Res) mit geringerem Anthocyangehalt und höherem Anteil an Resveratrol und Proanthocyanidinen sowie der hydroxytyrosolreiche OMWW-Extrakt Hytolive (Ol) einen ausgeprägteren Schutz vor mitochondrialer Dysfunktion bieten.

4.1.1 ExGrape Acy in PC12_{neo}- und HepG2-Zellen

Der Traubenextrakt Acy stand im Fokus der Untersuchungen und wurde hauptsächlich hinsichtlich seiner mitoprotektiven Eigenschaften in dem neuronenenähnlichen Zellmodell PC12_{neo} untersucht. Weiterhin sollte zur Prüfung von Effekten außerhalb des Gehirns ein nicht neuronales Modell herangezogen werden. Die Leberzelllinie HepG2 wurde für diese Untersuchung ausgewählt, in denen die ATP-Spiegel nach Acy-Inkubation ermittelt wurden.

4.1.1.1 PC12_{neo}-Zellen

Der Effekt einer 24 h-Inkubation mit 25 und 50 µg/ml Acy auf das MMP in PC12_{neo}-Zellen ist in Abb. 4.1 normiert auf die mediumbehandelte Kontrolle (100 %) dargestellt. Basal (ohne SNP-Stress) hatte die Acy-Inkubation gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (0,025 % DMSO) keinen signifikanten Einfluss auf das MMP. Auf die Zugabe des Stressors SNP reagierten Acy-unbehandelte Zellen mit einem signifikanten Rückgang des MMPs auf 80-85 %. Diese Beeinträchtigung konnte durch die Inkubation mit 25 µg/ml Acy, 1 h vor der SNP-Schädigung beginnend, signifikant abgeschwächt werden ($p < 0,01$).

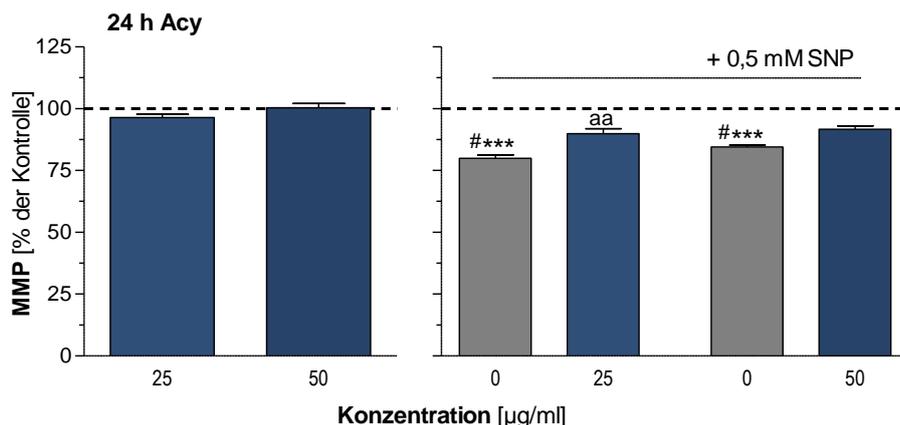


Abb. 4.1: MMP in PC12_{neo}-Zellen nach Acy-Inkubation. Das mitochondriale Membranpotenzial (MMP) wurde mittels Rhodamin 123 in PC12_{neo}-Zellen nach Inkubation mit 25 und 50 µg/ml Acy gemessen und auf die mediumbehandelte Kontrolle normiert [100 %]; dargestellt sind Mittelwerte±SEM von 6 unabhängigen Versuchen nach 24 h Acy-Inkubation (basal) sowie nach 24 h Schädigung mit 0,5 mM SNP (ohne [0 µg/ml] und mit Acy-Inkubation beginnend 1 h vor SNP-Schädigung); #*** $p < 0,001$ vs. Lösungsmittelkontrolle (0,025 % DMSO, nicht dargestellt), ^{aa} $p < 0,01$ vs. SNP-Schädigung ohne Acy [0 µg/ml], 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; Lösungsmittelkontrollen unterschieden sich nicht signifikant von der mediumbehandelten Kontrolle [100 %], one sample t -test (nicht dargestellt); Daten wurden unter Mithilfe von Christina Plank erhoben.

Der Effekt von Acy auf die ATP-Spiegel der PC12_{neo}-Zellen wurde nach 7 h- und 24 h-Inkubation basal und für die 7 h-Inkubation zusätzlich nach Zugabe von SNP gemessen und auf die mediumbehandelte Kontrolle normiert (100 %). Wie aus Abb. 4.2 hervorgeht, führte die Inkubation mit Acy in den basalen Messungen zu keiner Erhöhung der ATP-Konzentrationen. Die 6 h-Behandlung mit SNP verursachte in den Acy-unbehandelten Zellen einen Rückgang der ATP-Spiegel auf 40 %. Die 1 h zuvor einsetzende Inkubation mit Acy konnte diesen Rückgang in den Konzentrationen 25 und 50 µg/ml vermindern. Der größte Effekt ging dabei von der Konzentration 50 µg/ml mit einer gemessenen ATP-Konzentration von 54,6 % ($p < 0,001$) aus. Dies steht im Gegensatz zu der basalen Messung, bei der die 24 h-Behandlung mit 50 µg/ml Acy zu einer signifikanten Verminderung der ATP-Spiegel führte. Die Konzentration 50 µg/ml ist eine hoch angesetzte Konzentration, bei der eine beginnende Toxizität oder auch Interaktion mit der Biolumineszenz-basierten ATP-Messung nicht auszuschließen ist. Die 24 h-Inkubation mit niedrigeren Konzentrationen (1-10 µg/ml) und somit Konzentrationen, die näher an den *in vivo* zu erreichenden Konzentrationen liegen, hatte keinen Einfluss auf die ATP-Spiegel.

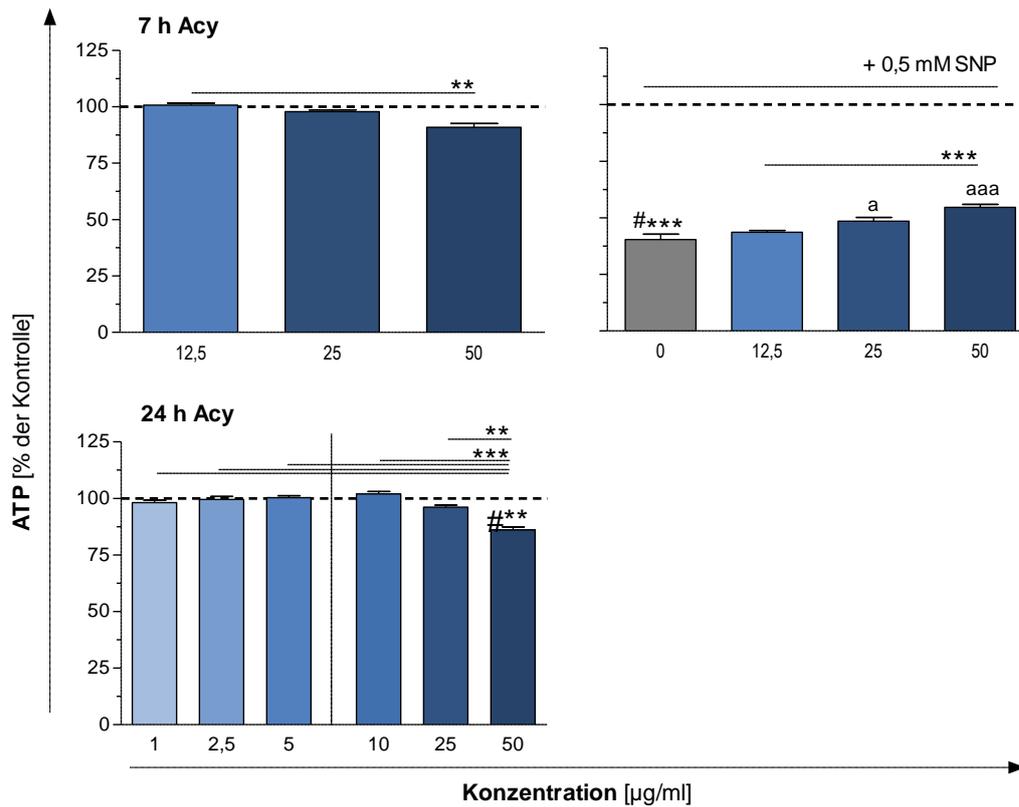


Abb. 4.2: ATP-Konzentration in PC12_{neo}-Zellen nach Acy-Inkubation. ATP-Konzentrationen wurden mittels ViaLight Kit (Lonza) anhand der Biolumineszenz in PC12_{neo}-Zellen nach Inkubation mit 1-50 µg/ml Acy gemessen und auf die mediumbehandelte Kontrolle normiert [100 %]; dargestellt sind Mittelwerte±SEM von 5-6 unabhängigen Versuchen nach 7 h oder 24 h Acy-Inkubation (basal) sowie nach 6 h Schädigung mit 0,5 mM SNP (ohne [0 µg/ml] und mit Acy-Inkubation beginnend 1 h vor SNP-Schädigung); die 24 h-Inkubation wurde in 2 unabhängigen Versuchsreihen (1-5 µg/ml und 10-50 µg/ml) durchgeführt, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ wie angezeigt; ### $p < 0,01$, #### $p < 0,001$ vs. Lösungsmittelkontrolle (DMSO, nicht dargestellt), ^a $p < 0,05$, ^{aaa} $p < 0,001$ vs. SNP-Schädigung ohne Acy [0 µg/ml], 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test, Lösungsmittelkontrollen ($\leq 0,025$ % DMSO) unterschieden sich, mit Ausnahme der Kontrolle zu [5 µg/ml] und [50 µg/ml] nach 24 h, nicht signifikant von der mediumbehandelten Kontrolle [100 %] (one sample *t*-test, nicht dargestellt); die Kontrollen zu [5 µg/ml] und [50 µg/ml] nach 24 h lagen mit 94,3 und 95,6 % signifikant unterhalb der 100 % (nicht dargestellt); Daten der 7 h-Inkubation wurden unter Mithilfe von Christina Plank erhoben.

Die mitochondriale Atmung nach Acy-Behandlung sollte weiterhin mittels hochauflösender Respirometrie im Oxygraph-2k nach Zugabe von Substraten, Inhibitoren und Entkopplern des Atmungssystems detaillierter untersucht werden. PC12_{neo}-Zellen wurden zuvor über 24 h mit 50 µg/ml Acy oder der Lösungsmittelkontrolle (0,025 % DMSO) behandelt. Die gewählte Acy-Konzentration hatte basal zu einer signifikanten Verminderung der über die Biolumineszenz erfassten ATP-Spiegel geführt, konnte jedoch die stärkste Erhöhung nach SNP Stress erbringen. Die respiratorischen Messungen ergaben hinsichtlich der mitochondrialen Atmungsaktivitäten normiert auf die Zellzahl keine Unterschiede zwischen Acy-behandelten Zellen und Kontrollzellen (Abb. 4.3A). Auch die *Respiratory Control Ratio* (RCR) berechnet aus [Atmungsrate des Elektronentransportsystems nach Entkopplung mit FCCP (ETS) / Leak-Atmung nach Zugabe

von Oligomycin (Omy)] zeigte keine Unterschiede und somit eine vergleichbare Kopplung des ETS (Gnaiger 2001) (Abb. 4.3B). Je höher die RCR ist, desto besser wird der Protonengradient zur ATP-Synthese genutzt. Eine geringe RCR weist auf ein hohes *Leak* von Protonen über die mitochondriale Membran ohne Beitrag zur Energieproduktion hin (vergleiche Kapitel 1.2.1.2).

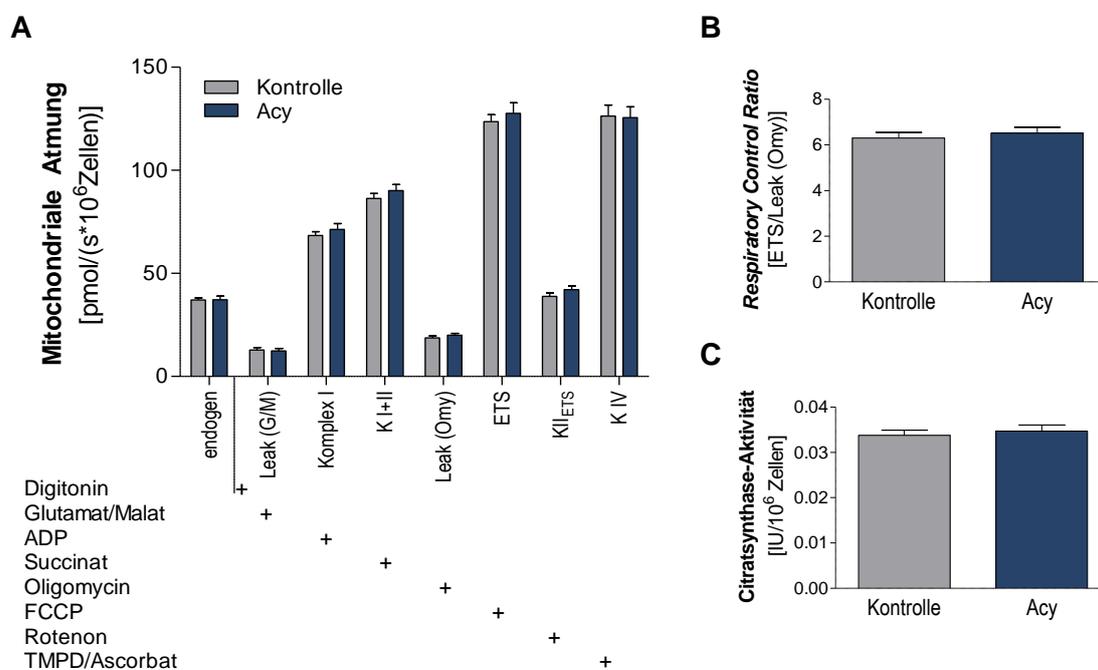


Abb. 4.3: Zellzahl-normierte mitochondriale Atmung und CS in PC12_{neo}-Zellen nach Acy-Inkubation. PC12_{neo}-Zellen wurden über 24 h mit 50 µg/ml Acy oder dem Lösungsmittel (0,025 % DMSO, Kontrolle) inkubiert und in einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml im Oxygraph-2k untersucht; dargestellt sind Mittelwerte±SEM der mitochondrialen Atmung normiert auf 10⁶ Zellen, endogen sowie nach Permeabilisierung mit Digitonin und Zugabe von Substraten, Inhibitoren und Entkopplern (gekennzeichnet mit +) (A), der *Respiratory Control Ratio* berechnet aus Atmung des ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe (B), der Citratsynthase-Aktivität (CS) in *International Units* (IU) normiert auf die Zellzahl (C), von n=14-18 unabhängigen Versuchen.

Die Daten deuten darauf hin, dass Acy in der hier untersuchten Konzentration von 50 µg/ml keinen Effekt auf die basale mitochondriale Atmung hat. Weiterhin wurde in einem Aliquot der für die respiratorischen Untersuchungen behandelten Zellen die Citratsynthase-Aktivität (CS) gemessen, ein Marker der stark mit der vorhandenen mitochondrialen Masse assoziiert ist (Larsen et al. 2012). Für beide Behandlungen wurde eine vergleichbare mittlere CS gemessen und die Acy-Behandlung hatte somit keinen Effekt auf die Mitochondrienmasse der Zellen (Abb. 4.3C). Folglich zeigte auch die im Oxygraph gemessene mitochondriale Atmung normiert auf die CS keine Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den Acy-behandelten Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Normierung der mitochondrialen Atmung auf die CS liefert Hinweise

auf die Atmung des einzelnen Mitochondriums (Rabøl et al. 2010). Der Traubenextrakt Acy konnte somit nur in Zellen, die SNP-Stress ausgesetzt wurden, günstige Effekte erzielen.

Auf Grundlage der Annahme, dass Polyphenole im Organismus einem umfangreichen Stoffwechsel unterliegen (erläutert in Kapitel 1.3.5), sollte weiterhin die Phenolsäure Syringasäure als mögliches Degradationsprodukt der im Traubenextrakt enthaltenen Anthocyane untersucht werden.

Tab. 4.1: MMP und ATP-Konzentrationen in PC12_{neo}-Zellen nach Syringasäure-Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM normiert auf die mediumbehandelte Kontrolle [100 %] von 5-6 unabhängigen Versuchen; MMP_{24h}, ATP_{24h}, ATP_{7h}: basale Messung nach 7 h- und 24 h-Inkubation mit Syringasäure [Lösungsmittelkontrolle in Klammern]; MMP_{24h}SNP, ATP_{7h}SNP: nach zusätzlicher Schädigung mit 0,5 mM SNP beginnend 1 h nach Inkubationsstart [SNP-Kontrolle ohne Syringasäure in Klammern]; Daten wurden unter Mithilfe von Marta Borchiellini erhoben.

	Konz	MMP _{24h}	ATP _{24h}	ATP _{7h}	MMP _{24h} SNP	ATP _{7h} SNP
Syrin- gasäure [µM]	1		94,7±2,7			
	5	104,2±1,3 [106,2±1,5]***	97,3±2,6 [96,9±1,9]	93,6±2,9	91,5±2,5 [83,9±1,4]	38,0±2,8 [47,3±2,1]
	10		103,1±1,6 [100,0±0,6]			
	20			101,7±3,2		44,8±2,1 [47,3±2,1]
	30	104,3±1,2 [105,1±1,2]**		102,7±3,7 [101,2±2,0]	91,7±2,0 [85,3±1,9]	44,5±2,3 [47,3±2,1]
	50	104,2±1,4 [106,0±2,1]**		101,4±4,2 [99,7±1,9]	90,9±1,6 [85,5±2,3]	45,8±2,7 [47,3±2,1]
	100	98,3±3,5 [101,7±1,6]	100,6±1,9 [99,6±1,4]	108,3±3,1 [98,9±2,1]	86,1±3,4 [79,9±2,5]	47,2±2,2 [47,3±2,1]

Konz: Konzentration; ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ vs. [mediumbehandelte Kontrolle (100 %)], one-sample *t*-Test; Lösungsmittelkontrollen: $\leq 0,01$ % DMSO, bei nicht vorhandener Lösungsmittelkonzentration wurde mit nächst höherer Lösungsmittelkontrolle verglichen, SNP-Kontrollen ohne Syringasäure waren gegenüber der Lösungsmittelkontrolle signifikant vermindert.

Entgegen dem Traubenextrakt Acy hatte Syringasäure keinen signifikanten Effekt auf das MMP und die ATP-Spiegel (Tab. 4.1). Dies galt sowohl für die basalen Werte als auch für die Werte nach SNP-Schädigung. Der schützende Effekt von Acy auf die SNP-geschädigten Zellen konnte somit für sein potenzielles Abbauprodukt Syringasäure in den untersuchten Konzentrationen nicht nachgewiesen werden.

4.1.1.2 HepG2-Zellen

Die Acy-Behandlung von HepG2-Leberzellen sollte erste Informationen über den Einfluss des Extrakts im nichtneuronalen Zellmodell liefern. HepG2-Zellen wurden über 7 h mit 25 und 50 µg/ml Acy behandelt bzw. 1 h nach Inkubationsbeginn zusätzlich mit SNP gestresst. Die

SNP-Behandlung musste für HepG2-Zellen gegenüber den PC12_{neo}-Zellen 10-fach, und somit auf 5 mM erhöht werden, um eine vergleichbare Verminderung der ATP-Konzentrationen gegenüber PC12-Zellen zu erhalten. Abb. 4.4 zeigt, dass die Acy-Behandlung auch in HepG2-Zellen vor SNP-Stress schützen konnte. Normiert auf die mediumbehandelte Kontrolle (100 %) wiesen die Acy-unbehandelten Zellen nach SNP-Behandlung eine mittlere ATP-Konzentration von 50 % auf, die durch die Vorbehandlung mit 25 und 50 µg/ml signifikant auf 63 % und 74 % angehoben werden konnte ($p < 0,001$).

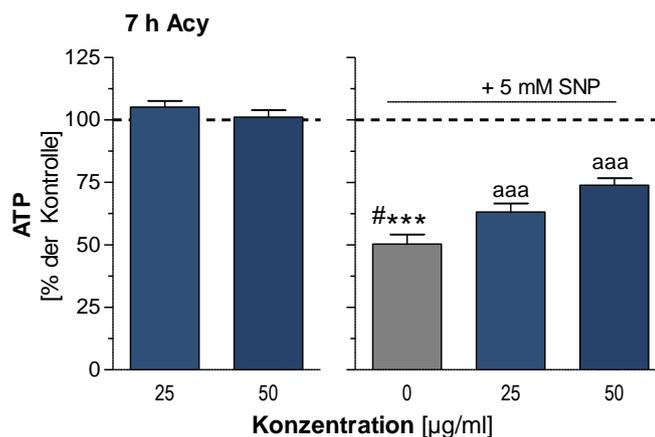


Abb. 4.4: ATP-Konzentration in HepG2-Zellen nach Acy-Inkubation. ATP-Konzentrationen wurden mittels ViaLight Kit (Lonza) in HepG2-Zellen nach Inkubation mit 25 und 50 µg/ml Acy gemessen und auf die mediumbehandelte Kontrolle normiert [100 %]; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 8 unabhängigen Versuchen nach 7 h Acy-Inkubation (basal) sowie nach 6 h Schädigung mit 5 mM SNP ohne [0 µg/ml] und mit Acy beginnend 1 h vor SNP-Schädigung; ### $p < 0,001$ vs. Lösungsmittelkontrolle ($\leq 0,025$ % DMSO, nicht dargestellt), aaa $p < 0,001$ vs. SNP-Schädigung ohne Acy [0 µg/ml], 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; Lösungsmittelkontrollen unterschieden sich nicht signifikant von der mediumbehandelten Kontrolle (100 %, one sample *t*-test, nicht dargestellt).

Basal, ohne SNP-Stress, lagen die gemessenen ATP-Spiegel minimal über 100 %, waren jedoch nicht signifikant erhöht. Der Extrakt Acy konnte somit auch in HepG2-Zellen vor SNP-Stress schützen und hatte im Vergleich zu PC12_{neo}-Zellen einen tendenziell günstigeren Einfluss auf die basalen ATP-Konzentrationen.

4.1.2 Hydroxytyrosol und ExGrape Acy-Kombination in PC12_{neo}-Zellen

Analog zum Traubenextrakt Acy wurden die mitochondrialen Effekte des Olivenpolyphenols Hy als Reinsubstanz in PC12_{neo}-Zellen untersucht. Weiterhin sollte ein möglicher additiver oder synergistischer Effekt in Kombination mit Acy geprüft werden.

Ergebnisse

Hy zeigte nach 24 h-Inkubation der PC12_{neo}-Zellen in Konzentrationen von 2,5-50 μM basal gegenüber der Lösungsmittelkontrolle ($\leq 0,1$ % H₂O) keinen Effekt auf das MMP (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: MMP und ATP-Konzentrationen in PC12_{neo}-Zellen nach Hy-, DOPAC- und Acy+Hy-Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM normiert auf die mediumbehandelte Kontrolle (100 %) von 6-7 unabhängigen Versuchen (bei ATP_{24h} mit 2,5-50 μM Hy: n=2-3); MMP_{24h}, ATP_{24h}, ATP_{7h}: basale Messung nach 7 h- und 24 h-Inkubation mit Testsubstanzen [Lösungsmittelkontrolle in Klammern]; MMP_{24h}SNP, ATP_{7h}SNP: nach zusätzlicher Schädigung mit 0,5 mM SNP beginnend 1 h nach Inkubationsstart [SNP-Kontrollen ohne Testsubstanzen in Klammern], SNP-Kontrollen waren signifikant gegenüber jeweiliger Lösungsmittelkontrolle vermindert; Daten wurden unter Mithilfe von Sabrina Bothur und Marta Borchiellini erhoben.

	Konz	MMP _{24h}	ATP _{24h}	ATP _{7h}	MMP _{24h} SNP	ATP _{7h} SNP
Hy [μM]	0,25		100,3 \pm 2,7 [100 %]			
	1 (1,25)		(99,7 \pm 1,2) [100 %]	103,7 \pm 0,5		47,6 \pm 1,7 [42,6 \pm 1,6]
	2,5	97,2 \pm 1,8 [100,0 \pm 2,2]	104,4\pm0,7^{#**} [100 %]	101,8 \pm 0,7	75,4 \pm 3,6 [73,9 \pm 3,1]	49,6\pm1,6* [42,6 \pm 1,6]
	6,25		98,0 \pm 0,6 [100 %]			
	10 (12,5)	97,9 \pm 2,3 [102,0 \pm 1,7]	(93,8 \pm 2,0) [100 %]	104,0 \pm 0,9 [99,0 \pm 0,6]	79,8 \pm 2,9 [77,1 \pm 2,6]	52,2\pm2,6^{***} [42,6 \pm 1,6]
	25	95,5 \pm 0,9 [101,2 \pm 1,9]	93,4 \pm 3,0 [100 %]	102,2 \pm 1,0 [98,8 \pm 1,2]	80,2 \pm 2,8 [76,2 \pm 2,3]	51,7\pm1,7^{***} [42,6 \pm 1,6]
	50	97,4 \pm 3,2 [102,4 \pm 2,0]	84,6\pm0,4^{****} [100 %]	99,6 \pm 0,9 [97,3 \pm 0,5] ^{***}	79,8 \pm 2,2 [75,9 \pm 2,1]	51,1\pm1,3^{**} [42,6 \pm 1,6]
DOPAC [μM]	0,5		101,3 \pm 2,8 [100 %]	102,8 \pm 0,5		52,0 \pm 3,1 [44,2 \pm 2,2]
	1	103,7 \pm 0,7 [102,9 \pm 0,8] ^{#*}	100,1 \pm 1,8 [100 %]	102,8 \pm 0,9	84,7 \pm 2,0 [81,4 \pm 1,7]	53,2 \pm 2,9 [44,2 \pm 2,2]
	2,5	99,6 \pm 0,9 [104,5 \pm 2,2]	105,4 \pm 0,6 [100 %]	101,3 \pm 1,6 [97,2 \pm 1,0] ^{#*}	82,6 \pm 1,9 [79,4 \pm 1,8]	53,7 \pm 2,9 [44,2 \pm 2,2]
	10	97,5 \pm 2,0 [99,1 \pm 2,0]	102,1 \pm 0,9 [100 %]	103,6 \pm 1,6 [100,4 \pm 1,6]	77,6 \pm 1,7 [75,8 \pm 0,9]	56,3\pm2,8^{**} [44,2 \pm 2,2]
	25	99,6 \pm 1,4 [101,8 \pm 1,3]		101,6 \pm 0,6 [98,8 \pm 1,1]	84,0 \pm 1,8 [82,2 \pm 2,5]	55,1\pm2,1* [44,2 \pm 2,2]
Acy+Hy [$\mu\text{g/ml}$ + μM]	2,5+6,25		100,8 \pm 2,0* [92,9 \pm 2,0] ^{#*}			
	10+10	101,9 \pm 1,7 [103,5 \pm 2,6]		95,6 \pm 3,0 [98,3 \pm 3,5]	86,6 \pm 0,3 [80,9 \pm 1,8]	40,3 \pm 3,4 [42,4 \pm 0,8]
	25+6,25		96,2 \pm 1,6 [99,8 \pm 0,5]			
	25+25	102,0 \pm 1,2 [102,4 \pm 1,5]	92,4 \pm 1,2 [99,8 \pm 0,5]	101,4 \pm 4,2 [101,9 \pm 4,4]	87,8 \pm 0,8 [81,2 \pm 1,3]	39,1 \pm 3,0 [42,4 \pm 0,8]
	50+10	100,0 \pm 1,0 [104,5 \pm 1,8]	88,3\pm2,0* [99,6 \pm 0,3]	96,3 \pm 3,5 [101,4 \pm 3,8]	85,5 \pm 0,7 [79,1 \pm 2,9]	51,2 \pm 3,5 [42,4 \pm 0,8]
	50+25	101,4 \pm 1,6 [105,2 \pm 1,1] ^{#*}		94,1 \pm 1,9 [88,9 \pm 3,8] ^{#*}	91,1\pm2,6^{***} [77,3 \pm 1,6]	44,4 \pm 3,0 [42,4 \pm 0,8]

Konz: Konzentration; [#]* p <0,05, [#]** p <0,01, [#]*** p <0,001 vs. [mediumbehandelte Kontrolle (100 %)], one-sample t -Test; * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 vs. [Kontrolle in Klammern], 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; Lösungsmittelkontrollen: Hy und DOPAC: $\leq 0,1$ % H₂O (ATP_{24h}: Medium), Acy+Hy: $\leq 0,025$ % DMSO

Die Vorinkubation mit Hy konnte weiterhin auch in keiner Konzentration einen signifikanten Schutz vor der SNP-bedingten Beeinträchtigung des MMPs vermitteln (Tab. 4.2). Auch auf die basalen ATP-Spiegel zeigte die Hy-Behandlung wenig Effekt. Die Konzentration 2,5 μM konnte als einzige nach 24 h die ATP-Spiegel gegenüber der Mediumkontrolle und somit hier der Lösungsmittelkontrolle signifikant auf 104,4 % steigern ($p < 0,05$). Die höchste Konzentration, 50 μM , führte demgegenüber bei 24 h-Inkubation zu einer signifikanten Verminderung der ATP-Spiegel gegenüber der Mediumkontrolle ($p < 0,001$). Der Rückgang der ATP-Spiegel durch die SNP-Behandlung auf 42,5 % der ungestressten Kontrollzellen, konnte durch die Vorinkubation mit Hy-Konzentrationen von 2,5-50 μM signifikant auf 49,6-52,2 % reduziert werden (Tab. 4.2). Auch Hy konnte somit vor SNP-Stress schützen.

Die nähere Untersuchung der mitochondrialen Atmung im Oxygraph erfolgte mit der Hy-Konzentration 25 μM und der Lösungsmittelkontrolle (0,05 % H_2O) nach 24 h-Inkubation. Wie in Abb. 4.5 dargestellt ist, zeigte sich für die Zellzahl-normierte Auswertung eine signifikant erhöhte Atmung nach Entkopplung mit FCCP ($p < 0,05$) und somit erhöhte maximale Atmungskapazität (Elektronentransportsystem, ETS) sowie eine tendenziell höhere Komplex IV-Aktivität. Die RCR lag mit 4,95 nach Hy-Behandlung tendenziell erhöht gegenüber den Kontrollzellen mit 4,78 vor. Auch die CS als Indikator für die mitochondriale Masse wies nach Hy-Behandlung einen numerisch leicht höher liegenden Wert von 0,0433 IU gegenüber der Kontrolle mit 0,0408 IU, jedoch keine signifikante Steigerung auf (Abb. 4.5). Die mitochondriale Atmung normiert auf die CS und somit die Atmung des einzelnen Mitochondriums konnte keine signifikanten Unterschiede hervorbringen (Daten nicht gezeigt). Die Effekte auf die Zellzahl-normierte Atmung könnten somit zum einen teilweise auf die gering erhöhte mitochondriale Masse zurückzuführen sein, zum anderen auf die leicht erhöhte RCR, wodurch der Protonengradient besser zur ATP-Synthese genutzt werden kann. Diese Effekte auf die mitochondriale Atmung blieben jedoch ohne signifikanten Einfluss auf die gemessenen basalen ATP-Spiegel, die bei gleicher Inkubationskonzentration knapp unterhalb der 100 % lagen.

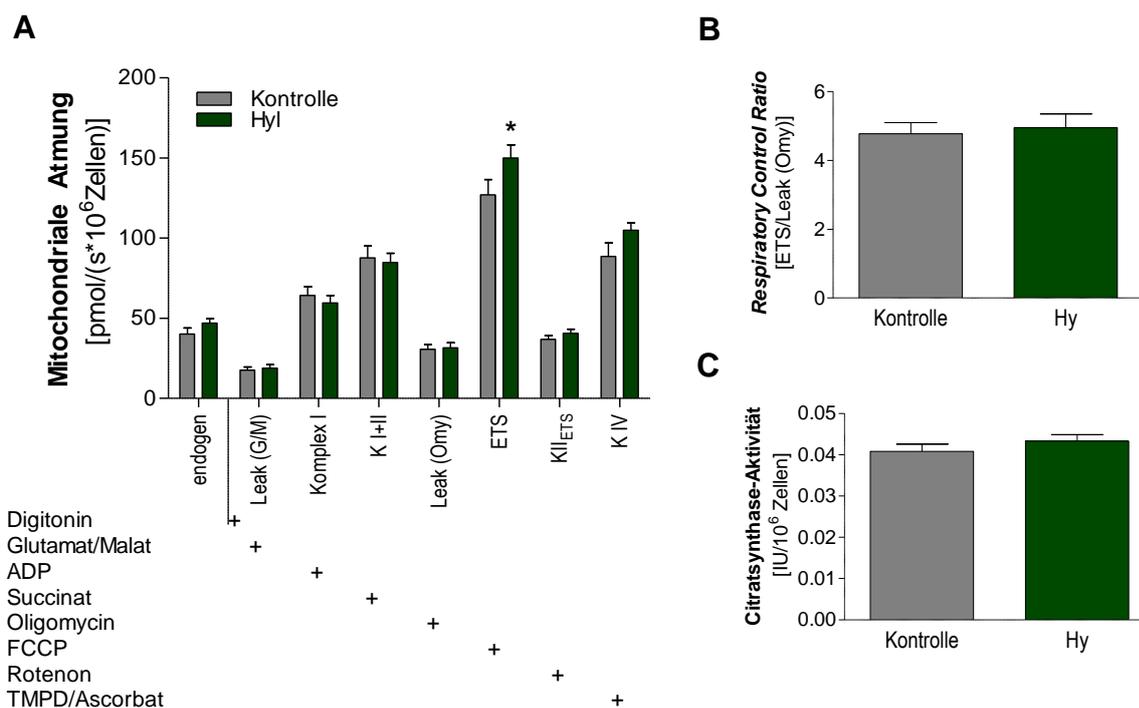


Abb. 4.5: Zellzahl-normierte mitochondriale Atmung und CS in PC12_{neo}-Zellen nach Hy-Inkubation. PC12_{neo}-Zellen wurden über 24 h mit 25 μ M Hy oder Lösungsmittel (0,05 % H₂O, Kontrolle) inkubiert und in einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml im Oxygraph-2k untersucht; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der mitochondrialen Atmung normiert auf 10⁶ Zellen, endogen sowie nach Permeabilisierung mit Digitonin und Zugabe von Substraten, Inhibitoren und Entkopplern (gekennzeichnet mit +) (A), der *Respiratory Control Ratio* berechnet aus Atmung des ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe (B), der CS in *International Units* (IU) normiert die Zellzahl (C) von n=12 unabhängigen Versuchen, **p*<0,05 vs. Kontrolle, 2-way ANOVA mit Bonferroni post Tests; Daten wurden unter Mithilfe von Sabrina Bothur erhoben.

Weiterhin sollte DOPAC als möglicher gemeinsamer Metabolit von Hy und der im Traubenextrakt enthaltenen Proanthocyanidine (erläutert in Kapitel 1.3.5.2 und 1.3.5.3) untersucht werden. Wie Hy zeigte auch DOPAC in den untersuchten Konzentrationen von 1-25 μ M keine signifikanten Effekte auf das MMP, basal sowie nach SNP-Stress (Tab. 4.2). Auch auf die basalen ATP-Spiegel hatte DOPAC in den untersuchten Konzentrationen 0,5-25 μ M über 7 h und 0,5-10 μ M über 24 h keine Effekte. Den Abfall der ATP-Konzentration nach SNP-Stress konnten die beiden höchsten DOPAC-Konzentrationen, 10 und 25 μ M, vermindern. Dieser Effekt fiel numerisch vergleichbar mit dem Effekt nach Inkubation mit Hy und dem Traubenextrakt Acy aus.

Mitochondriale Atmungsaktivitäten konnten durch DOPAC genauso wenig beeinflusst werden wie die CS (Tab. 4.3). DOPAC konnte somit nur den beobachteten protektiven Effekt von Hy und Acy gegenüber SNP reproduzieren, hatte aber weiterhin keinen Einfluss auf die mitochondrialen Parameter.

Tab. 4.3: Zellzahl-normierte mitochondriale Atmung und CS der PC12_{neo}-Zellen nach DOPAC-Inkubation.

PC12_{neo}-Zellen wurden über 24 h mit 10 µM DOPAC oder Lösungsmittel (0,02 % H₂O, Kontrolle) inkubiert und in einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml im Oxygraph-2k untersucht; RCR: *Respiratory Control Ratio* berechnet aus Atmung der ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe, CS: Citratsynthase-Aktivität in *International Units* (IU) normiert auf die Zellzahl, von n=12-14 unabhängigen Versuchen Daten wurden unter Mithilfe von Madeleine Müller erhoben.

		endo- gen	Leak (G/M)	KI	KI+II	Leak (Omy)	ETS	KII _{ETS}	KIV
DOPAC [10 µM]	Mitochondriale Atmung	→	→	→	→	→	→	→	→
	RCR [ETS/Leak(Omy)]	→							
	CS [IU/10 ⁶ Zellen]	→							

→: kein signifikanter Effekt

Potenziell additive oder synergistische Effekte der Kombination aus Acy und Hy (Acy+Hy) sollten in PC12_{neo}-Zellen anhand des MMPs und der ATP-Spiegel erfasst werden (Tab. 4.2). Die untersuchten Kombinationen Acy+Hy [µg/ml+µM] 10+10, 25+25, 50+10 und 50+25 hatten basal keinen Einfluss auf das MMP. Die Vorinkubation mit allen Kombinationen vor Induktion des SNP-Stresses führte zu einer tendenziellen bzw. für die 50+25 Acy+Hy-Variante zu einer signifikanten Erhöhung des MMPs ($p < 0,001$) und somit zu einem schützenden Effekt. Die ATP-Konzentrationen zeigten für die gleichen Acy+Hy-Kombinationen nach 7 h-Inkubation basal keine signifikanten Veränderungen (Tab. 4.3). Nach 24 h-Inkubation mit 50+25 Acy+Hy wurde, wie schon für Acy als Einzelsubstanz, eine verminderte ATP-Konzentration erfasst. Die Kombination geringerer Konzentrationen hatte weder einen erhöhenden noch vermindern Einfluss auf die basalen ATP-Spiegel. Im Gegensatz zu den Einzelsubstanzen Acy und Hy konnten die untersuchten Kombinationen in Hinblick auf die ATP-Spiegel nicht vor SNP-Stress schützen.

Da der NO-Donor SNP in Zellen zu nitrosativem und oxidativem Stress führt und Acy und Hy Mitochondrien vor SNP-induzierter Dysfunktion schützen konnten, sollten in PC12_{neo}-Zellen zusätzlich die Effekte auf das Ausmaß von oxidativen Schädigungen untersucht werden. Der Gehalt von Proteincarbonylen als Marker für oxidative Schäden wurde analog zum Inkubationsprotokoll der ATP-Messung nach 7 h-Inkubation mit den Testsubstanzen bzw. nach 1 h-Vorinkubation und 6 h zusätzlicher SNP-Behandlung erfasst. Die SNP-Konzentration musste aufgrund von deutlichen Toxizitätseffekten bei 0,5 mM SNP in diesem Versuchsaufbau auf 0,15 mM herabgesetzt werden. In Abb. 4.6 sind die Ergebnisse der Messungen nach Behandlung mit Acy und Hy, Syringasäure und DOPAC, sowie der Kombination Acy+Hy 50+25 normiert auf die mediumbehandelte Kontrolle (100 %) dargestellt.

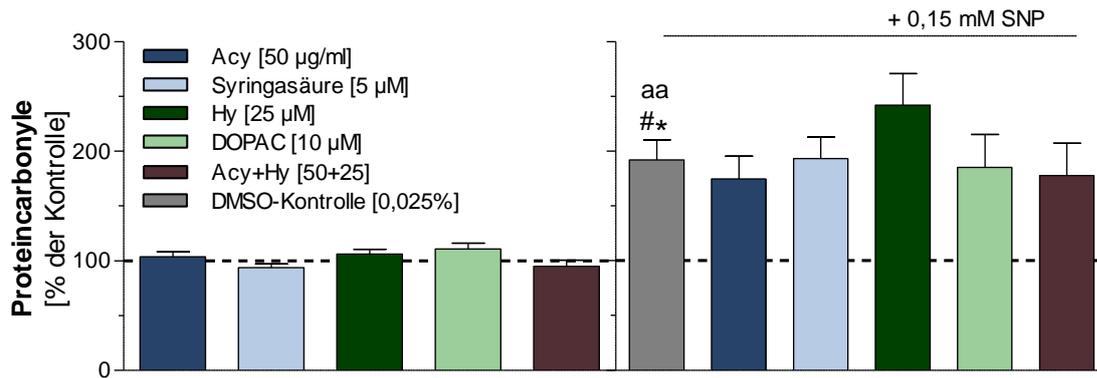


Abb. 4.6: Proteincarboxylgehalt in PC12_{neo}-Zellen. PC12_{neo}-Zellen wurden über einen Zeitraum von 7 h mit Acy [50 µg/ml], Syringasäure [5 µM], Hy [25 µM], DOPAC [10 µM], Acy+Hy Kombination [50 µg/ml+25 µM], einer DMSO-Kontrolle [0,025 %] oder einer Mediumkontrolle inkubiert. Nach 1 h-Vorinkubation erfolgte in einem Teil der Zellen die Zugabe von 0,15 mM SNP. Der Proteincarboxylgehalt wurde mittels Proteincarboxyl-Kit (Sigma) gemessen und auf den Proteingehalt bezogen. Dargestellt sind Mittelwert±SEM aus 6 unabhängigen Versuchen (in Dupletts) normiert auf die Mediumkontrolle; #* $p < 0,05$ vs. Lösungsmittelkontrolle DMSO [0,025 %], 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; ^{aa} $p < 0,01$ vs. Lösungsmittelkontrolle Medium (one-sample t -Test); die DMSO-Kontrolle unterschied sich nicht signifikant von der Mediumkontrolle (nicht dargestellt); Daten wurden unter Mithilfe von Marta Borchiellini erhoben.

Keine der untersuchten Testsubstanzen hatte einen signifikanten Einfluss auf den Proteincarboxylgehalt ungestresster PC12_{neo}-Zellen. Durch die Inkubation mit SNP wurde der Proteincarboxylgehalt signifikant auf nahezu das Doppelte (192,1 %) der ungestressten Zellen erhöht. Die Vorbehandlung mit den Testsubstanzen konnte die SNP-bedingten oxidativen Schädigungen nicht signifikant vermindern. Für Hy wurde eine numerische, aber nicht signifikante Erhöhung des Proteincarboxylgehalts auf 241,9 % beobachtet.

Es lässt sich festhalten, dass die Behandlung mit 0,15 mM SNP in PC12_{neo}-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung von oxidativen Schädigungen führt. Acy und Hy, Syringasäure und DOPAC, sowie die Kombination Acy+Hy 50+25 boten keinen signifikanten Schutz vor SNP-bedingten oxidativen Schädigungen. Dies galt somit auch für Testsubstanzen, die signifikant vor SNP-bedingter mitochondrialer Dysfunktion schützen konnten.

4.1.3 ExGrape Acy, Res und Hytolive in PC12_{neo}- und PC12_{sw}-Zellen

Zum späteren Einsatz im Tiermodell sollten die Effekte des Traubenextrakts Res mit anderem Polyphenolprofil sowie eines natürlichen hydroxytyrosolreichen OMWW-Extrakt in PC12_{neo}-Zellen sowie zusätzlich zu Acy im AD-Modell PC12_{sw} untersucht werden.

4.1.3.1 PC12_{neo}-Zellen

Der Traubenextrakt Res (5,0 % Anthocyane; 45,3 % Proanthocyanidine und 0,41 % Resveratrol) weist im Gegensatz zur Variante Acy (17,2 % Anthocyane; 35,2 % Proanthocyanidine und 0,007 % Resveratrol) einen geringeren Anteil an Anthocyanen und dafür höheren Anteil an Proanthocyanidinen und Resveratrol auf.

Für die Res-Variante zeigte sich insgesamt kein signifikanter Effekt auf das MMP. Eine tendenzielle basale Erhöhung des MMPs lag nach Inkubation mit 25 µg/ml Res vor (Abb. 4.7). Der SNP-bedingte Abfall des MMPs (auf 79-84 %) konnte durch die Vorinkubation mit Acy nur tendenziell vermindert werden.

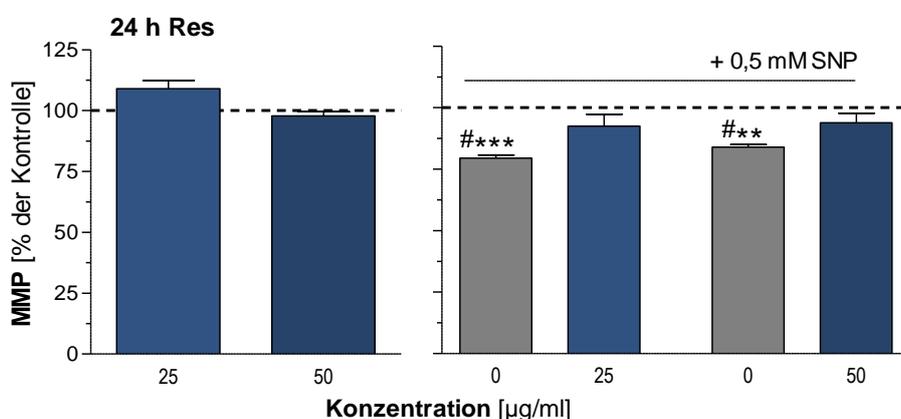


Abb. 4.7: MMP in PC12_{neo}-Zellen nach Res-Inkubation. Das mitochondriale Membranpotenzial (MMP) wurde mittels Rhodamin 123 in PC12_{neo}-Zellen nach Inkubation mit 25 und 50 µg/ml Res gemessen und auf die medienbehandelte Kontrolle normiert (100 %); dargestellt sind Mittelwerte±SEM von 6 unabhängigen Versuchen nach 24 h Res-Inkubation sowie nach 24 h-Schädigung mit 0,5 mM SNP (ohne [0 µg/ml] und mit Res beginnend 1 h vor SNP-Schädigung); #** $p < 0,01$, #*** $p < 0,001$ vs. Lösungsmittelkontrolle ($\leq 0,025$ % DMSO), 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; Lösungsmittelkontrollen unterschieden sich nicht signifikant von der medienbehandelten Kontrolle (100 %), one sample t -test (nicht dargestellt); Daten wurden unter Mithilfe von Marta Borchellini erhoben.

In Übereinstimmung mit dem Extrakt Acy zeigte auch Res keine signifikante Erhöhung der basalen ATP-Spiegel (Abb. 4.8). Vor dem SNP-bedingten Abfall der ATP-Konzentration konnte Res in der Konzentration 25 µg/ml, und noch stärker in der Konzentration 50 µg/ml, schützen. Im Vergleich zu der Inkubation mit 50 µg/ml Acy, welche die ATP-Konzentration nach SNP-Stress auf das 1,4-fache der gestressten Zellen ohne Vorbehandlung anheben konnte, war die ATP-Konzentrationen nach 50 µg/ml Res auf das 1,7-fache erhöht.

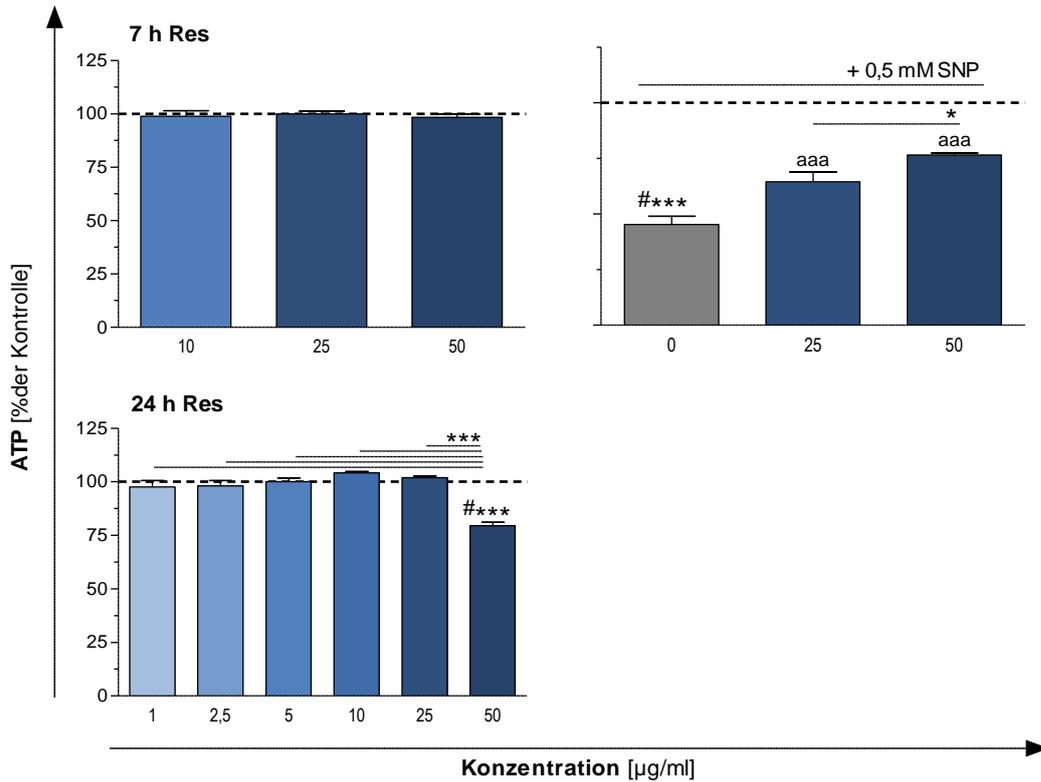


Abb. 4.8: ATP-Konzentration in PC12_{neo}-Zellen nach Res-Inkubation. ATP-Konzentrationen wurden mittels ViaLight Kit (Lonza) in PC12_{neo}-Zellen nach Inkubation mit 1-50 µg/ml Res gemessen und auf die mediumbehandelte Kontrolle normiert (100 %); dargestellt sind Mittelwerte±SEM von 3-8 unabhängigen Versuchen nach 7 h- und 24 h-Inkubation sowie nach 6 h-Schädigung mit 0,5 mM SNP (ohne [0 µ/ml] und mit Res beginnend 1 h vor SNP-Schädigung); * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ wie angezeigt, ### $p < 0,001$ vs. Lösungsmittelkontrolle ($\leq 0,025$ % DMSO), aaa $p < 0,001$ vs. SNP-Schädigung ohne Res [0 µg/ml], 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; Lösungsmittelkontrolle zu [50 µg/ml] (105,6 %) unterschied sich nach 7 h und Lösungsmittelkontrolle zu [5 µg/ml] (94,3 %) und [50 µg/ml] (95,6 %) nach 24 h signifikant von der mediumbehandelten Kontrolle (100 %, one sample *t*-test, nicht dargestellt); 7 h Daten wurden unter Mithilfe von Marta Borchiellini erhoben.

Wie schon für Acy beobachtet kam es auch nach 24 h-Behandlung mit 50 µg/ml Res zu einem signifikanten Abfall der basalen ATP-Konzentration, die auf eine beginnende Toxizität dieser hohen Konzentration oder Interaktion mit der Biolumineszenz-basierten ATP-Messung zurückzuführen sein könnte. Auch für Res zeigte sich hinsichtlich kleinerer Konzentrationen und somit größerer *in vivo* Relevanz kein günstiger Effekt auf die ATP-Spiegel. Res hatte somit bezogen auf die ATP-Spiegel einen stärkeren Schutzeffekt gegenüber SNP-Stress als Acy. Auf die basalen ATP-Konzentrationen hatte Res, wie Acy, keinen günstigen Einfluss.

Als weitere Olivenkomponente sollte neben dem synthetischen Reinstoff Hy der OMWW-Flüssigextrakt Ol untersucht werden, der zu 25,38 % aus Hy besteht. Die Konzentrationen wurden als Hy-Äquivalent (Hy_{Äq}) dargestellt und mit der Lösungsmittelkontrolle Medium (100 %) sowie mit der Hy-Reinsubstanz verglichen (Tab. 4.2).

Ergebnisse

Tab. 4.4: MMP und ATP-Konzentrationen in PC12_{neo}-Zellen nach Ol-, Hy- und Res+Ol-Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM normiert auf die mediumbehandelte Kontrolle (100 %) von 5-9 unabhängigen Versuchen nach Ol, Hy und Res+Ol-Inkubation (bei ATP_{24h}: 2,5-50 µM Ol oder Hy: n= 2-3); MMP_{24h}, ATP_{24h}, ATP_{7h}: basale Messung nach 7 h- und 24 h-Inkubation mit Testsubstanzen [Mediumkontrolle in Klammern]; MMP_{24h}SNP, ATP_{7h}SNP: nach zusätzlicher Schädigung mit 0,5 mM SNP beginnend 1 h nach Inkubationsstart [SNP-Kontrollen ohne Vorinkubation mit Testsubstanzen in Klammern], SNP-Kontrollen sind signifikant gegenüber jeweiliger Lösungsmittelkontrolle vermindert.

	Konz	MMP _{24h}	ATP _{24h}	ATP _{7h}	MMP _{24h} SNP	ATP _{7h} SNP
Ol [µM _{HyÄq}]	0,25		99,7±2,3 [100 %]			
	0,5 (0,625)		(97,4±2,6) [100 %]	98,8±1,7 [100 %]		54,0±3,4 [51,6±2,3]
	1 (1,25)		(99,8±2,2) [100 %]	97,0±2,5 [100 %]		59,0±2,1 [51,6±2,3]
	2,5		100,9±1,7 [100 %]	102,7±2,0 [100 %]		53,9±2,4 [51,6±2,3]
	6,25		99,8±0,9 [100 %]			
	10 (12,5)	98,97±3,2 [100 %]	(96,4±0,8) [100 %]	99,9±2,6 [100 %]	74,4±1,6 [73,7±1,5]	53,6±2,7 [51,6±2,3]
	25	91,2±2,0^{***} [100 %]	92,3±0,1^{#*} [100 %]	101,2±3,0 [100 %]	74,8±1,2 [72,9±1,3]	51,7±2,1 [51,6±2,3]
	50	92,7±2,0^{#*} [100 %]	84,3±1,7 [100 %]	100,1±2,6 [100 %]	79,9±1,4 [78,4±1,4]	42,6±3,2 [51,6±2,3]
Hy [µM]	25	96,0±2,7 [100 %]	93,4±3,0 [100 %]	100,0±3,2 [100 %]	74,4±0,8 [72,4±0,5]	51,8±2,5 [51,6±2,3]
Res+Ol [µg/ml + µM _{HyÄq}]	2,5+0,625		101,5±2,5 [94,8±2,6]			
	25+6,25		98,1±1,9 [100,9±2,1]			
	25+25		95,7±1,4 [100,9±2,1]			
	50+10		74,8±1,0^{***} [96,0±1,0]			

Konz: Konzentration; ^{#*}*p*<0,05, ^{***}*p*<0,01 vs. [mediumbehandelte Kontrolle (100 %)], one-sample *t*-Test; ^{***}*p*<0,001 vs. [Lösungsmittelkontrolle], 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; Lösungsmittelkontrollen für Ol und Hy: Medium, Res+Ol: ≤ 0,025 % DMSO

Weder Ol in den Konzentrationen 0,5-50 µM_{HyÄq} noch Hy (25 µM) konnte das MMP oder die ATP-Spiegel basal oder bei SNP-Stress erhöhen. Nach 24 h-Inkubation mit den beiden höchsten Konzentrationen, 25 und 50 µM_{HyÄq} Ol, wurde ein signifikanter Rückgang des basalen MMPs auf 91,2 % (*p*<0,01) und 92,7 % (*p*<0,05) sowie der basalen ATP-Spiegel auf 92,3 % (*p*<0,05) und 84,3 % (nicht signifikant) erfasst. Weiterhin deutete sich für die 6 h-Inkubation mit 50 µM_{HyÄq} Ol ein zusätzlicher ATP-Rückgang nach SNP Stress an. Es konnten somit weder die protektiven Eigenschaften von Hy reproduziert werden, noch ein günstiger Einfluss von Ol ermittelt werden. Weiterhin liegen nach 24 h-Inkubation Hinweise auf zytotoxische Eigenschaften von Ol ab 25 µM_{HyÄq} vor.

Der Einfluss verschiedener Kombinationen von Res und Ol (Res+Ol [$\mu\text{g/ml}+\mu\text{M}_{\text{HyÄq}}$]) auf die ATP-Spiegel der PC12_{neo}-Zellen wurde nach 24 h-Inkubation untersucht. Die Kombination 50+10 hatte, analog zu Res als Einzelkomponente, einen signifikant vermindernenden Effekt auf die ATP-Konzentration. Eine Erhöhung der ATP-Spiegel konnte durch keine Kombination erreicht werden (Tab. 4.4).

4.1.3.2 PC12_{sw}-Zellen

Die Traubenextrakte Acy und Res sowie Ol wurden weiterhin im AD-Zellmodell PC12_{sw} in Hinblick auf ihre Effekte auf das MMP und die ATP-Spiegel untersucht.

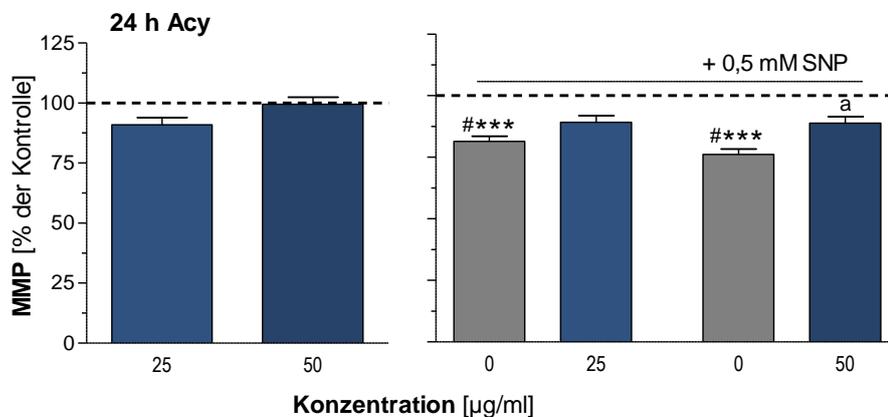


Abb. 4.9: MMP in PC12_{sw}-Zellen nach Acy-Inkubation. Das mitochondriale Membranpotenzial (MMP) wurde mittels Rhodamin 123 in PC12_{sw}-Zellen nach Inkubation mit 25 und 50 $\mu\text{g/ml}$ Acy gemessen und auf die mediumbehandelte Kontrolle normiert (100 %); dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Versuchen nach 24 h Acy-Inkubation (basal) sowie nach 24 h-Schädigung mit 0,5 mM SNP (ohne [0 $\mu\text{g/ml}$]) und mit Acy beginnend 1 h vor SNP-Schädigung); #*** p <0,001 vs. Lösungsmittelkontrolle (\leq 0,025 % DMSO), ^a p <0,05 vs. SNP-Schädigung ohne Acy [0 $\mu\text{g/ml}$], 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; Lösungsmittelkontrollen \leq 0,025 % DMSO unterschieden sich nicht signifikant von der mediumbehandelten Kontrolle (100 %), one sample t -test (nicht dargestellt); Daten wurden unter Mithilfe von Christina Plank erhoben.

Wie aus Abb. 4.9 ersichtlich wird, zeigte sich in PC12_{sw}-Zellen nach Inkubation mit 25 und 50 $\mu\text{g/ml}$ der Variante Acy ein ähnlicher Effekt wie im PC12_{neo}-Typ. Keine Acy-Konzentration hatte gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (\leq 0,025 % DMSO) einen signifikanten Einfluss auf das basale MMP. Auf die Zugabe des nitrosativen Stressors SNP reagierten PC12_{sw}-Zellen, ähnlich wie der neo-Typ, mit einem signifikanten Rückgang des MMP auf 76-82 %. Die Vorbehandlung mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Acy konnte den Rückgang des MMPs signifikant abschwächen.

Hinsichtlich der ATP-Spiegel zeigten sich für die kleinsten Acy-Konzentrationen, 12,5 und 25 $\mu\text{g/ml}$, nach 7 h-Inkubation basale ATP-Konzentrationen in PC12_{sw}-Zellen, die mit 106-107 % der mediumbehandelten Zellen leicht oberhalb der 100 % lagen, sich aber nicht signifi-

kant von der Lösungsmittelkontrolle unterschieden (Abb. 4.10). Der Rückgang der ATP-Spiegel durch die SNP-Schädigung auf 51,6 % konnte durch die Inkubation mit 50 $\mu\text{g/ml}$ signifikant vermindert werden ($p < 0,05$). Die niedrigeren Konzentrationen hatten diesbezüglich keinen signifikanten Einfluss (Abb. 4.10).

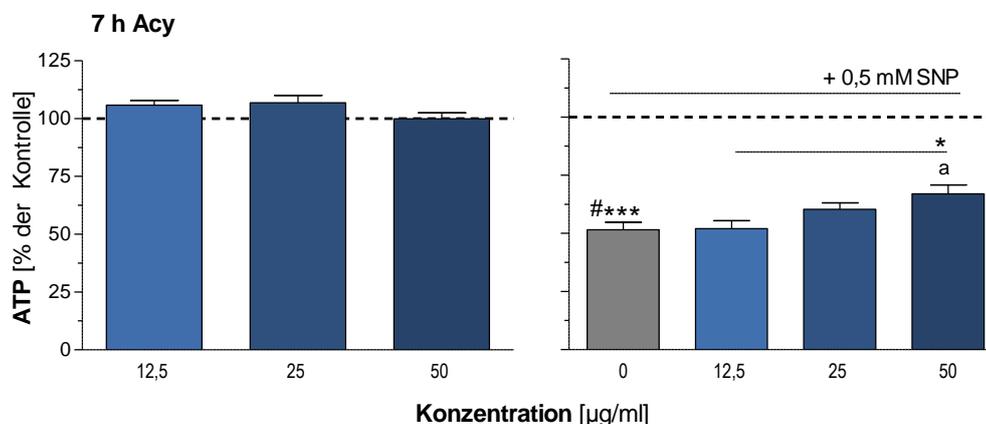


Abb. 4.10: ATP-Konzentration in PC12_{sw}-Zellen nach Acy-Inkubation. ATP-Konzentrationen wurden mittels ViaLight Kit (Lonza) in PC12_{sw}-Zellen nach Inkubation mit 12,5-50 $\mu\text{g/ml}$ Acy gemessen und auf die mediumbehandelte Kontrolle normiert (100 %); dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5-7 unabhängigen Versuchen nach 7 h- sowie nach 6 h-Schädigung mit 0,5 mM SNP (ohne [0 $\mu\text{g/ml}$] und mit Acy beginnend 1 h vor SNP-Schädigung); * $p < 0,05$ wie angezeigt, #*** $p < 0,001$ vs. Lösungsmittelkontrolle ($\leq 0,025$ % DMSO), ^a $p < 0,05$ vs. SNP-Schädigung ohne Acy [0 $\mu\text{g/ml}$], 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test, Lösungsmittelkontrollen unterschieden sich nicht signifikant von der mediumbehandelten Kontrolle (100 %, one sample *t*-test, Daten nicht gezeigt); Daten wurden unter Mithilfe von Christina Plank erhoben.

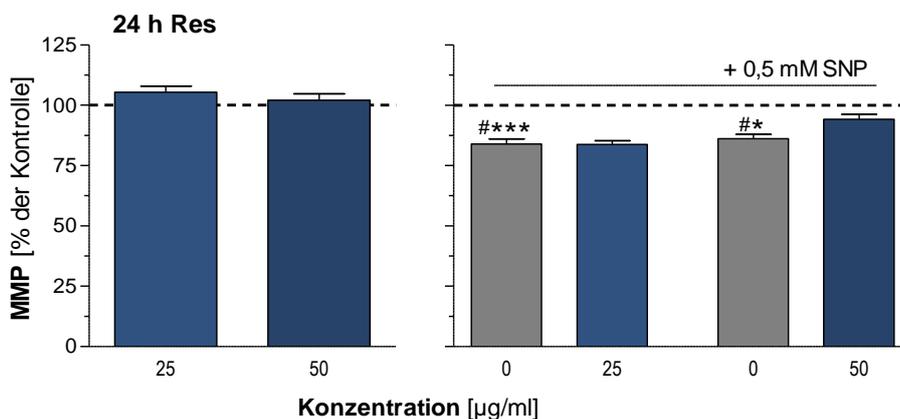


Abb. 4.11: MMP in PC12_{sw}-Zellen nach Res-Inkubation. Das mitochondriale Membranpotenzial (MMP) wurde mittels Rhodamin 123 in PC12_{sw}-Zellen nach Inkubation mit 25 und 50 $\mu\text{g/ml}$ Res gemessen und auf die mediumbehandelte Kontrolle normiert (100 %); dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5-6 unabhängigen Versuchen nach 24 h Res-Inkubation sowie nach 24 h-Schädigung mit 0,5 mM SNP (ohne [0 $\mu\text{g/ml}$] und mit Res beginnend 1 h vor SNP-Schädigung); #* $p < 0,05$, #*** $p < 0,001$ vs. Lösungsmittelkontrolle ($\leq 0,025$ % DMSO), 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test, Lösungsmittelkontrolle unterschieden sich nicht signifikant von der mediumbehandelten Kontrolle (100 %), one sample *t*-test (nicht dargestellt); Daten wurden unter Mithilfe von Carmina Schäfer erhoben.

Ergebnisse

Der Effekt von 25 und 50 $\mu\text{g/ml}$ Res in PC12_{sw} -Zellen ist in Abb. 4.11 und Abb. 4.12 dargestellt. Wie schon in den PC12_{neo} -Zellen beobachtet, konnte das basale MMP sowie das SNP-bedingt verminderte MMP auch durch die Variante Res nicht signifikant angehoben werden. Die basalen ATP-Spiegel der PC12_{sw} -Zellen zeigten nach 7 h Res-Inkubation (5-50 $\mu\text{g/ml}$) keine signifikante Erhöhung. Nach 24 h-Inkubation mit 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ Res wiesen PC12_{sw} -Zellen ATP-Spiegel minimal oberhalb der 100 % auf, die sich jedoch nicht signifikant von der Lösungsmittelkontrolle unterschieden. Vor dem SNP-bedingten Rückgang der ATP-Spiegel konnte die Vorbehandlung der PC12_{sw} -Zellen mit Res, analog zu PC12_{neo} -Zellen, in den Konzentrationen 25 und 50 $\mu\text{g/ml}$ signifikant schützen (Abb. 4.12).

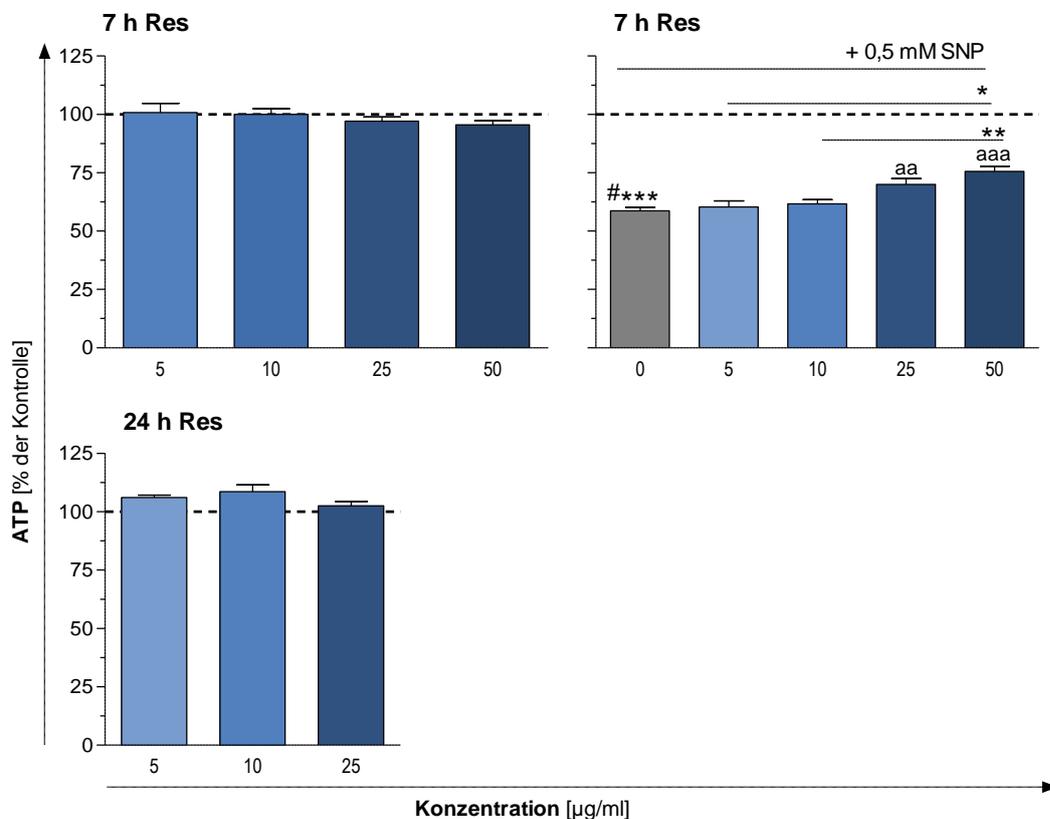


Abb. 4.12: ATP-Konzentration in PC12_{sw} -Zellen nach Res-Inkubation. ATP-Konzentrationen wurden mittels ViaLight Kit (Lonza) in PC12_{sw} -Zellen nach Inkubation mit 5-50 $\mu\text{g/ml}$ Res gemessen und auf die mediumbehandelte Kontrolle normiert (100 %); dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6-10 (3 für 5 $\mu\text{g/ml}$, 7 h) unabhängigen Versuchen nach 7 h- und 24 h-Inkubation sowie nach 6 h-Schädigung mit 0,5 mM SNP (ohne [0 $\mu\text{g/ml}$] und mit Res beginnend 1 h vor SNP-Schädigung); * p <0,05, ** p <0,01 wie angezeigt, *** p <0,001 vs. Lösungsmittelkontrolle (\leq 0,05 % DMSO), ^{aa} p <0,01, ^{aaa} p <0,001 vs. SNP-Schädigung ohne Res [0 $\mu\text{g/ml}$], 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; Lösungsmittelkontrollen zu \geq 50 $\mu\text{g/ml}$ lagen nach 7 h mit 90,2-94,7 % signifikant unterhalb der mediumbehandelten Kontrolle (100 %, one sample t -test, nicht dargestellt); Daten wurden unter Mithilfe von Carmina Schäfer erhoben.

Die Effekte von Ol in PC12_{sw}-Zellen sind im Vergleich zu 25 µM Hy in Tab. 4.5 dargestellt. In Übereinstimmung mit PC12_{neo}-Zellen wiesen Ol-behandelte PC12_{sw}-Zellen ein MMP unterhalb der 100 % auf. Für die Ol-Konzentrationen 25 und 50 µM_{HyÄq}, sowie 25 µM Hy war das MMP signifikant geringer als die Lösungsmittelkontrolle (Medium).

Auf die basale ATP-Konzentration zeigte Ol in den Konzentrationen 0,5-50 µM_{HyÄq} keine verminderten Effekte, konnte diese jedoch auch nicht signifikant erhöhen. Dies galt für die 7 h-Inkubation genauso wie für die 24 h-Inkubation sowie für die Vergleichssubstanz Hy. Eine Ausnahme bildete die 25 µM_{HyÄq} Ol-Behandlung, die nach 7 h die ATP-Spiegel signifikant auf 107,1 % der mediumbehandelten Zellen erhöhen konnte. Weder von Ol noch von Hy ging ein Schutz vor SNP-Stress aus. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der entsprechenden Untersuchung in PC12_{neo}-Zellen. In PC12_{sw}-Zellen führte zusätzlich die höchste Ol-Konzentration, 50 µM_{HyÄq}, zu einer weiteren Verminderung der ATP-Konzentration im Vergleich zur nicht vorbehandelten SNP-geschädigten Kontrolle.

Tab. 4.5: MMP und ATP-Konzentrationen in PC12_{sw}-Zellen nach Ol- und Hy-Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM normiert auf die mediumbehandelte Kontrolle [100 %] von 5-11 unabhängigen Versuchen; MMP_{24h}, ATP_{24h}, ATP_{7h}: basale Messung nach 7 h und 24 h-Inkubation mit Testsubstanzen [jeweilige Lösungsmittelkontrolle in Klammern]; MMP_{24h}SNP, ATP_{7h}SNP: nach zusätzlicher Schädigung mit 0,5 mM SNP beginnend 1 h nach Inkubationsstart, [SNP-Kontrollen ohne Vorinkubation mit Testsubstanzen in Klammern], SNP-Kontrollen sind signifikant gegenüber jeweiliger Lösungsmittelkontrolle vermindert.

	Konz	MMP _{24h}	ATP _{24h}	ATP _{7h}	MMP _{24h} SNP	ATP _{7h} SNP
Ol [µM _{HyÄq}]	0,5			99,8±3,0 [100 %]		53,8±3,5 [57,7±2,3]
	1			103,3±2,3 [100 %]		53,7±4,5 [57,7±2,3]
	2,5		103,1±2,4 [100 %]	104,7±3,1 [100 %]		60,1±3,2 [57,7±2,3]
	5		101,3±3,1 [100 %]			
	10	94,5±2,4 [100 %]	103,1±4,3 [100 %]	102,4±2,6 [100 %]	78,4±1,3 [77,3±2,3]	58,3±2,8 [57,7±2,3]
	25	90,6±0,9**** [100 %]	96,7±3,5 [100 %]	107,1±2,4** [100 %]	80,6±2,1 [78,2±2,1]	52,6±2,0 [57,7±2,3]
	50	87,4±2,2**** [100 %]		99,8±4,9 [100 %]	79,9±1,1 [81,0±1,5]	33,3±3,1**** [57,7±2,3]
Hy [µM]	25	92,7±2,7** [100 %]		101,4±3,2 [100 %]	77,6±2,0 [76,9±3,1]	51,9±2,4 [57,7±2,3]

Konz: Konzentration; ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$ vs. [mediumbehandelte Kontrolle (100 %)], one-sample t -Test; **** $p < 0,001$ vs. [SNP-Kontrolle], 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test

Res und Ol (Res+Ol) in den Kombinationen 25+10, 25+25, 50+12,5 µg/ml+µM_{HyÄq} führten in PC12_{sw}-Zellen zu MMP-Werten gering oberhalb der 100 %. Eine signifikante Erhöhung ge-

genüber der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle ($\leq 0,05$ % DMSO) bestand für keine Behandlungsvariante (Abb. 4.13). Das Ausmaß der Verminderung des MMPs durch SNP-Stress konnte durch die Vorinkubation mit 25+10 und 50+12,5 signifikant verringert werden. Somit konnten für die Res+Ol-Kombinationen hinsichtlich des MMPs bessere Ergebnisse erzielt werden als für ihre Einzelkomponenten.

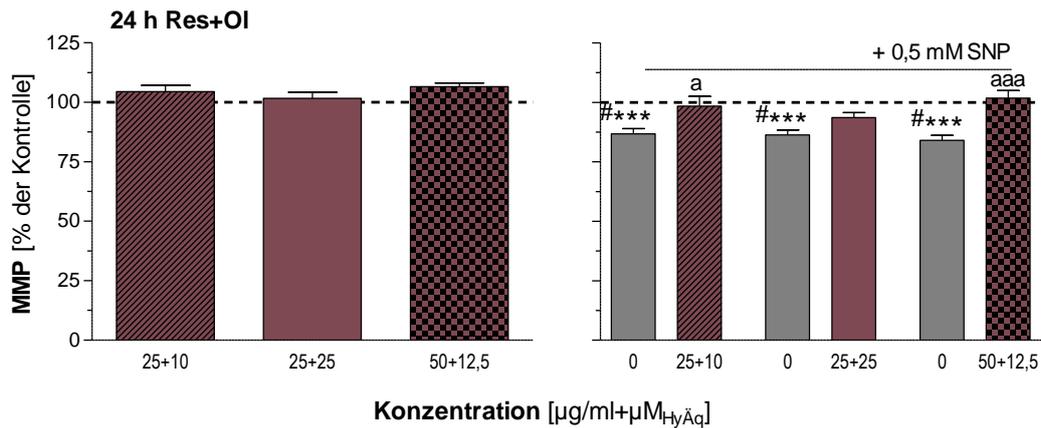


Abb. 4.13. MMP in PC12_{sw}-Zellen nach Res+Ol-Inkubation. Das mitochondriale Membranpotenzial (MMP) wurde mittels Rhodamin 123 in PC12_{sw}-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Kombinationen aus Res und Ol (Res+Ol) gemessen und auf die mediumbehandelte Kontrolle normiert (100 %); dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 10 unabhängigen Versuchen nach 24 h-Res+Ol-Inkubation sowie nach 24 h-Schädigung mit 0,5 mM SNP (ohne [0 $\mu\text{g/ml} + \mu\text{M}_{\text{ÄqHy}}$] und mit Res+Ol beginnend 1 h vor SNP-Schädigung); #### $p < 0,001$ vs. Lösungsmittelkontrolle ($\leq 0,05$ % DMSO), aaa $p < 0,001$ vs. SNP-Schädigung ohne Res+Ol [0 $\mu\text{g/ml} + \mu\text{M}_{\text{ÄqHy}}$], 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test, Lösungsmittelkontrollen ($\leq 0,05$ % DMSO) unterschieden sich nicht signifikant von der mediumbehandelten Kontrolle (100 %), mit Ausnahme der Lösungsmittelkontrolle 50+12,5 (106,6 %), one sample t -test (nicht dargestellt); Daten wurden unter Mithilfe von Carmina Schäfer erhoben.

Auf die basal gemessenen ATP-Spiegel hatten die Res+Ol-Kombinationen keinen Effekt. Der SNP-bedingte Abfall der ATP-Spiegel konnte durch die Kombination 50+12,5 signifikant vermindert werden (Abb. 4.14).

Zusammenfassend konnte die Res+Ol-Kombination 50+12,5 in PC12_{sw}-Zellen die besten Ergebnisse erzielen. Diese waren hinsichtlich des Schutzes vor SNP im Vergleich mit Res als Einzelkomponente für das MMP stärker, für das ATP schwächer ausgeprägt.

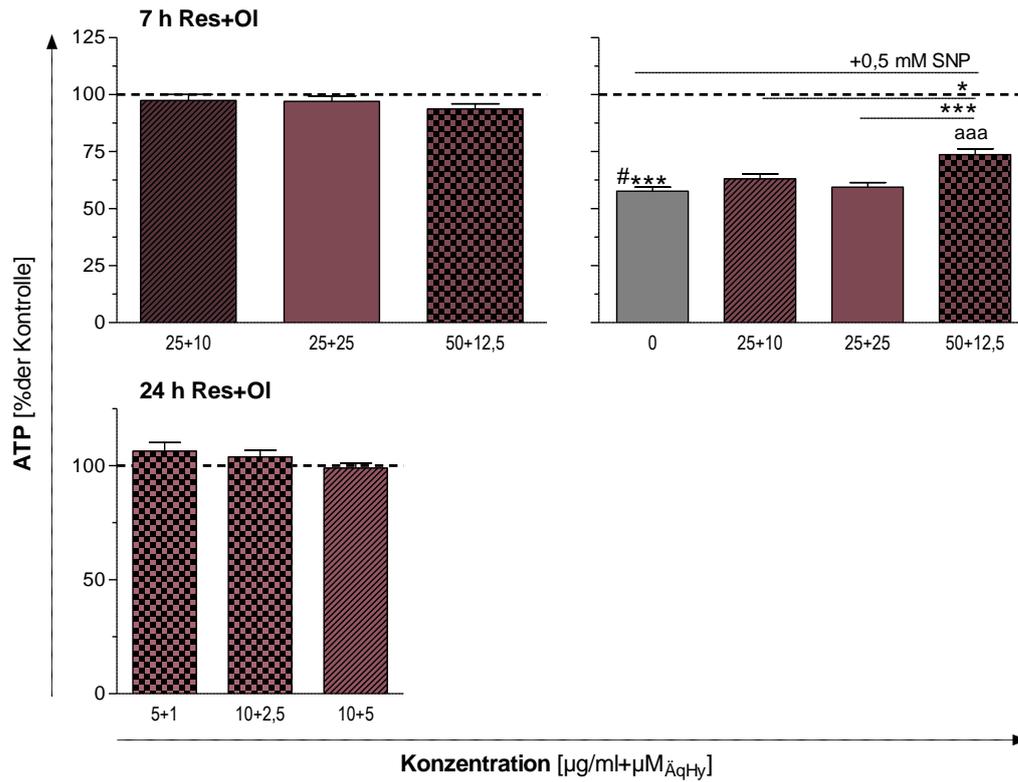


Abb. 4.14: ATP-Konzentration in PC12_{sw}-Zellen nach Res+Ol-Inkubation. ATP-Konzentrationen wurden mittels ViaLight Kit (Lonza) in PC12_{sw}-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Kombinationen aus Res und Ol (Res+Ol) gemessen und auf die mediumbehandelte Kontrolle normiert (100 %); dargestellt sind Mittelwerte±SEM von 8-10 unabhängigen Versuchen nach 7 h Res+Ol-Inkubation sowie nach 6 h-Schädigung mit 0,5 mM SNP (ohne [0 µg/ml+µM_{ÄqHy}] und mit Res+Ol beginnend 1 h vor SNP-Schädigung); * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ wie angezeigt; #*** $p < 0,001$ vs. Lösungsmittelkontrolle ($\leq 0,05$ % DMSO); aaa $p < 0,001$ vs. SNP-Schädigung ohne Res+Ol [0 µg/ml+µM_{ÄqHy}]. 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; Lösungsmittelkontrollen unterschieden sich nicht signifikant von der mediumbehandelten Kontrolle, mit Ausnahme der Lösungsmittelkontrolle 25+10 (0,0125 % DMSO) mit 96,0 % (one sample t -test, nicht dargestellt); Daten wurden unter Mithilfe von Carmina Schäfer erhoben.

4.2 ExGrape Acy zur Prävention der Alterung im C57BL/6J-Mausmodell

In einer mehrteiligen Untersuchung wurde der Traubenextrakt Acy hinsichtlich seines Potenzials zur Prävention der Alterung im Mausmodell C57BL/6J geprüft (Asseburg et al. 2016). Der Schwerpunkt der Untersuchung lag auf der Erfassung der mitochondrialen Funktion im Gehirn gealterter Mäuse, die durch Verhaltenstests zur kognitiven und motorischen Funktion ergänzt wurden. Zusätzlich sollte mit einer Lebenszeitstudie ein möglicher Einfluss von Acy auf die Lebensspanne der Mäuse ermittelt werden. Die Untersuchung umfasste drei Studien:

1. Kurzzeitstudie mit 3-wöchiger Acy-Verabreichung über die Knopfkanüle und anschließender Erfassung der mitochondrialen Funktion
2. Langzeitstudie mit 6-monatiger Acy-Verabreichung in Futterpellets, Verhaltenstests und anschließender Erfassung der mitochondrialen Funktion
3. Lebenszeitstudie mit lebenslanger Acy-Verabreichung im Trinkwasser, Verhaltenstests und Erstellung von Überlebenskurven

Zur Erfassung altersbedingter mitochondrialer Dysfunktionen als Hauptaugenmerk der Untersuchung wurden Mäuse im Alter von ca. 19-22 Monaten herangezogen und mit jungen Mäusen im Alter von 3 Monaten verglichen.

4.2.1 Kurzzeitstudie

Um den kurzfristigen Effekt von Acy auf die mitochondriale Funktion bei der Hirnalterung zu untersuchen erhielten 9 männliche 18-21 Monate alte C57BL/6J-Mäuse mittels Knopfkanüle über einen Zeitraum von 3 Wochen 200 mg/kg KG/Tag ExGrape (Alt Acy). Als Kontrollen dienten 9 gleichaltrige Mäuse (Alt) und 9 Mäuse im Alter von 2 Monaten (Jung), die für einen Monat eine Lösungsmittelkontrolle mittels Knopfkanüle erhielten. Nach dem Verabreichungszeitraum und somit im Alter von 19-22 Monaten für die alten Gruppen und im Alter von 3 Monaten für die junge Gruppe wurde die mitochondriale Funktion über das MMP und die ATP-Konzentration in dissoziierten Hirnzellen der Tiere gemessen. Die Parameter wurden basal sowie nach *ex vivo* Behandlung mit dem Stressor SNP erhoben. Weiterhin wurde eine detaillierte Untersuchung der mitochondrialen Atmungsaktivitäten mittels hochauflösender Respirometrie im Oxygraph-2k an isolierten Hirnmitochondrien vollzogen.

Abb. 4.15 zeigt, dass in den 19-22 Monate alten Mäusen eine altersbedingte mitochondriale Dysfunktion mit signifikant erniedrigten ATP-Spiegeln und veränderter Reaktion auf SNP-Stress, sowie ein tendenziell vermindertes MMP in dissoziierten Hirnzellen nachgewiesen werden konnte, jedoch kein Effekt der Acy-Fütterung. Die basalen Werte des MMPs wiesen zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 4.15A). Das MMP nach *ex vivo*

Schädigung mit dem nitrosativen Stressor SNP zeigte hingegen kleine, aber signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 4.15C). Die SNP-Behandlung verursachte in allen drei Gruppen eine Verminderung des MMPs auf 77-82 % bezogen auf das jeweilige basale MMP. Die Gruppe Jung reagierte im Vergleich zur Gruppe Alt und Alt Acy stärker und somit mit einem signifikant geringeren MMP. Für die ATP-Spiegel der dissoziierten Hirnzellen konnte eine deutliche Verminderung in den alten Gruppen festgestellt werden (Abb. 4.15B). Junge Mäuse zeigten mit 1,66 nmol/mg Protein eine signifikant höhere ATP-Konzentration gegenüber der Gruppe Alt mit 1,15 nmol/mg Protein. Ein signifikanter Einfluss von Acy wurde jedoch auch hier nicht festgestellt; mit einem ATP-Spiegel von 1,24 nmol/mg Protein konnte in der Gruppe Alt Acy keine signifikante Verbesserung erreicht werden. Auf die SNP-Schädigung reagierten alle Gruppen mit einer deutlichen Verminderung der ATP-Konzentration (Abb. 4.15D). Die Gruppe Jung zeigte mit 80,7 % des Basalwerts analog zum MMP gegenüber der Gruppe Alt mit 68,8 % einen signifikant niedrigeren ATP-Level. Die Gruppe Alt Acy wies mit 74,2 % eine Tendenz in Richtung der Gruppe Jung auf, jedoch ohne Signifikanz.

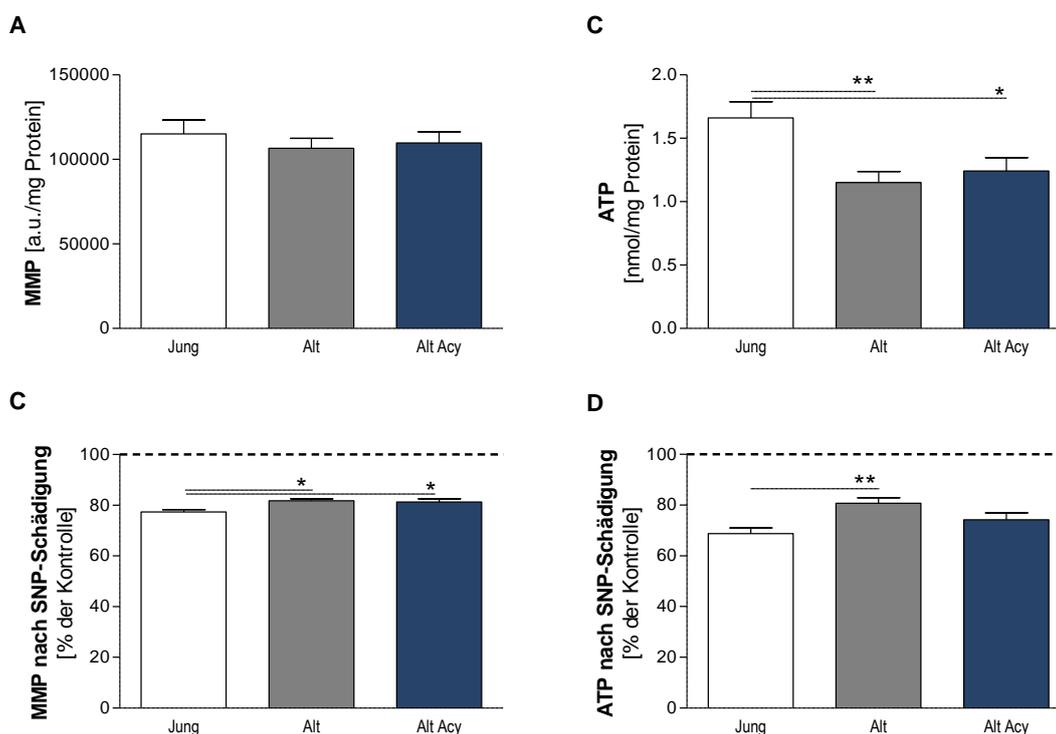


Abb. 4.15: MMP und ATP-Konzentrationen in dissoziierten Hirnzellen der C57BL/6J-Mäuse nach 3-wöchiger Acy-Verabreichung. 18-21 Monate alte C57BL/6J Mäuse erhielten mittels Knopfkanüle 200 mg/kg KG/Tag Acy (Alt Acy) über 3 Wochen und wurden mit gleichaltrigen Tieren (Alt) oder 3 Monate alten Tieren (Jung), die Kontrolllösung erhielten, verglichen; dargestellt sind Mittelwerte±SEM des basalen mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) (A), der basalen ATP-Konzentrationen (B), jeweils normiert auf mg Protein, sowie Mittelwerte±SEM des MMPs nach 2 mM SNP-Schädigung (C) und der ATP-Konzentration nach 0,1 mM SNP-Schädigung (D), normiert auf den jeweiligen basalen Wert (100 %), n=9 Männchen, $p^*<0,05$, $p^{**}<0,01$, 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test.

Die Untersuchung der mitochondrialen Atmung in isolierten Hirnmitochondrien mittels Respirometrie unter Einsatz von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren des Atmungssystems ergab für die proteinnormierten Werte keine signifikanten Unterschiede in den Studiengruppen (proteinnormierte Daten nicht gezeigt). Der Bezug der mitochondrialen Atmung auf die CS, als Marker der mitochondrialen Masse, deckte im Gegensatz zu den proteinnormierten Werten eine gegenüber der jungen Gruppe signifikant verminderte Komplex IV-Aktivität des einzelnen Mitochondriums in den beiden alten Gruppen auf (Abb. 4.16B). Weiterhin zeigte die Komplex I- und Komplex I+II-Atmung in der Gruppe Alt eine tendenzielle Verminderung, die in der Gruppe Alt Acy weniger stark ausgeprägt war. Ein signifikanter Einfluss von Acy konnte nicht ermittelt werden. Die mitochondriale Masse, gemessen als CS, zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Studiengruppen (Abb. 4.16A).

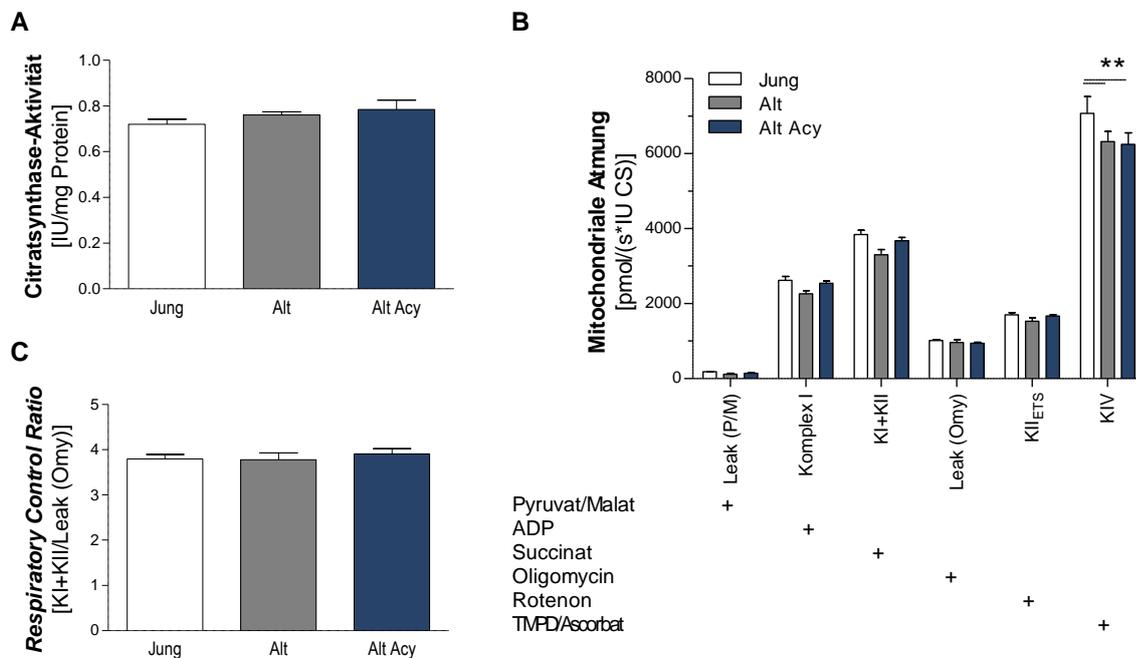


Abb. 4.16: CS und CS-normierte mitochondriale Atmung isolierter Hirnmitochondrien der C57BL/6J-Mäuse nach 3-wöchiger Acy-Verabreichung. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.15; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der Citratsynthase-Aktivität (CS) in *International Units* (IU) normiert auf mg Protein (A), der mitochondrialen Atmung im Oxygraph-2k nach Zugabe von Substraten, Inhibitoren und Entkopplern (gekennzeichnet mit +) normiert CS (B) und der *Respiratory Control Ratio* berechnet aus Atmung von Komplex I+II/Leak nach Oligomycin-Zugabe (C); n=8-9 Männchen; **p<0,01, 2-way ANOVA mit Bonferroni post Tests.

Auch für die RCR berechnet über den Quozienten (Komplex I + II Atmung/Leak-Atmung nach Oligomycin-Zugabe), ergaben sich keine Unterschiede (Abb. 4.16C).

Zusammenfassend zeigten 19-22 Monate alte C57BL/6J-Mäuse der Kurzzeitstudie gegenüber 3 Monate jungen Mäusen signifikant verminderte ATP-Konzentrationen in dissoziierten Hirnzellen und eine veränderte Reaktion auf nitrosativen Stress sowie eine verminderte Komplex IV-Atmung bezogen auf das einzelne Mitochondrium. Die Acy-Verabreichung hatte keinen Einfluss auf diese altersbedingte mitochondriale Dysfunktion. Es ließen sich lediglich minimale Trends hinsichtlich einer verbesserten Atmung erkennen.

4.2.2 Langzeitstudie

In einer folgenden Studie sollte untersucht werden, ob eine Langzeit-Verabreichung von Acy einen stärkeren Einfluss auf altersbedingte mitochondriale Dysfunktionen von männlichen C57BL/6J-Mäusen hat. Acy wurde in einer Konzentration von 2 g/kg in Futterpellets verpresst und für 6 Monate beginnend im Alter von 13 Monaten verabreicht (Alt Acy). Als Vergleichsextrakt wurde der Heidelbeerextrakt Actiplants Bilberry in der Konzentration 2 g/kg in Futterpellets verpresst und einer weiteren Gruppe ab einem Alter von 13 Monaten verabreicht (Alt HBE). Als Basisfutter diente ein antioxidanzienarmes Futter (Altromin. C1000 mod. mit 2.500 IU/kg Vitamin A; 20 mg/kg Vitamin E; 0 mg/kg Vitamin C; 0,150 mg/kg Selen), welches als Basis zur Extraktanreicherung diente und in unangereicherter Form als Kontrollfutter an eine gleichaltrige Gruppe (Alt) und eine junge Gruppe (Jung) verfüttert wurde. Die junge Gruppe wurde nach den ersten vier Verabreichungsmonaten in einem Alter von 1 Monat in die Studie aufgenommen, um zum Studienende ein Alter von 3 Monaten zu erreichen. In der Langzeitstudie wurde die Erfassung der mitochondrialen Funktion durch Verhaltenstests zur kognitiven Dysfunktion ergänzt sowie der Gewichtsverlauf und die Lebenszeit protokolliert. Weiterhin wurde die Genexpression mittels qPCR in Hirn- und Leberhomogenat untersucht.

4.2.2.1 Überlebensrate und Gewichtsverlauf

Über die Fütterungsperiode kam es weder in der jungen noch in der alten Gruppe, die Kontrollfutter erhielten, zu Sterbefällen (Abb. 4.17A). In der Gruppe Alt Acy waren 2 Sterbefälle und somit eine Überlebensrate von 86,7 % zu verzeichnen. Die geringste Überlebensrate wurde mit 79,4 % in der Gruppe Alt HBE mit 4 Sterbefällen beobachtet. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe Alt wurden aber weder für die Überlebenskurve der Gruppe Alt Acy noch Alt HBE festgestellt. Hinsichtlich des Gewichtsverlaufs zeigte sich in den drei alten Gruppen ein ähnlicher Verlauf (Abb. 4.17B). Im 6. Fütterungsmonat und somit im Alter von 19 Monaten deutete sich in allen Gruppen eine beginnende Gewichtsabnahme an. In der

Gruppe Jung war erwartungsgemäß ein Anstieg des Körpergewichts über die Studienmonate zu verzeichnen.

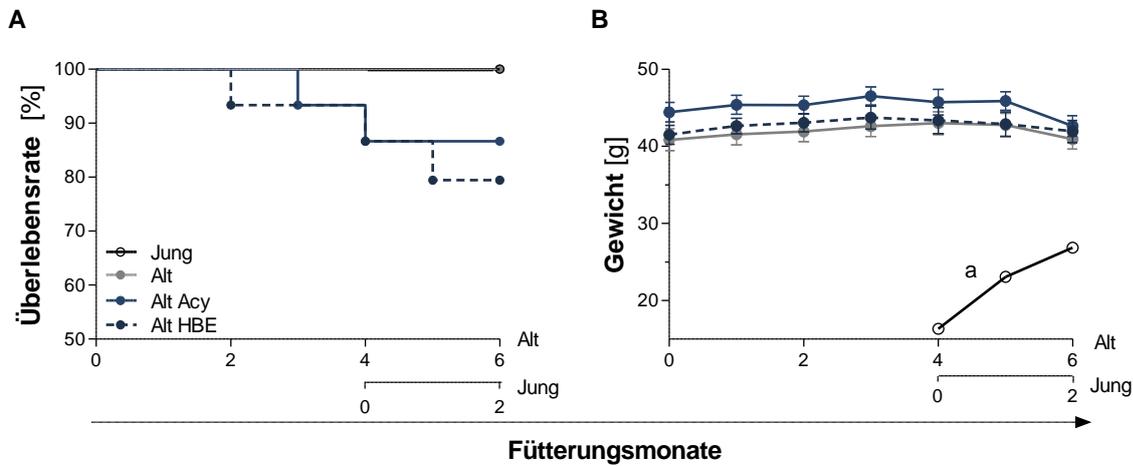


Abb. 4.17: Überlebensraten und Gewichtsverlauf der C57BL/6J-Mäuse über die 6-monatige Fütterung mit Acy und HBE. 13 Monate alte C57BL/6J-Mäuse erhielten antioxidanzienarme Basisfutterpellets die mit 2 g Acy (Alt Hy) oder 2 g Heidelbeerextrakt (Alt HBE) angereichert waren und wurden mit gleichaltrigen (Alt) sowie jungen Mäusen (Jung) verglichen, die unangereichertes antioxidanzienarmes Basisfutter erhielten; die junge Gruppe wurde mit Ablauf des 4. Interventionsmonats hinzugezogen; dargestellt sind Überlebensraten (Kaplan-Meier-Kurven) (A) und der Verlauf des Körpergewichts als Mittelwerte \pm SEM (B) von n=15 Männchen bei Fütterungsbeginn, a: die Gruppe Jung wurde mit Ablauf des 4. Fütterungsmonats hinzugezogen (Vergleich der Überlebensraten ab 4. Monat mit Ausgangswert 100 % bei Gruppe Alt); Daten wurden unter Mithilfe von Madeleine Müller erhoben.

4.2.2.2 Genexpression im Gehirn und der Leber

Anhand von Genexpressionsanalysen sollte untersucht werden, inwieweit die Alterung bzw. die Extraktfütterung einen Einfluss auf die Expression von Genen hat, die in Zusammenhang mit der mitochondrialen Funktion bzw. der Hormesis stehen. Die Genexpression sollte nicht nur im Hirnhomogenat der Mäuse gemessen werden, sondern auch im Homogenat der Leber, als wichtiges Organ des Energiestoffwechsels und des Polyphenol-Metabolismus. Da das Hauptaugenmerk auf dem Traubenextrakt Acy lag, wurden die Analysen nicht für HBE-gefütterte Tiere durchgeführt. Tab. 4.6 fasst die Ergebnisse der ermittelten Expressionen aller untersuchten Gene normiert auf die Expression der jungen Gruppe (100 %) zusammen.

Eine altersbedingte Verminderung der Expression im Gehirn wurde für Komplex I (Untereinheit Ndufv1) ($p < 0,01$), aber nicht Komplex IV (Untereinheit Cox5A) ermittelt. Hinsichtlich der Expression von Genen, die mit der mitochondrialen Biogenese assoziiert sind, zeigte Nrf1, aber nicht PGC1 α oder Tfam eine signifikant verminderte Expression ($p < 0,05$). Eine tendenzielle Abnahme wurde weiterhin für die Genexpression von SIRT1 mit 90,3 %, aber nicht SIRT3,

gefunden sowie für die Gene der antioxidativen Enzyme SOD2 mit 90,4 %, Katalase (KAT) mit 86,1 % und Glutathionperoxidase 1 (GPx1) mit 85,7 %.

Tab. 4.6: mRNA-Expression in Hirn- und Lebergewebe der C57BL/6J-Mäuse nach 6-monatiger Acy-Fütterung. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.17; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM normalisiert auf die mittlere mRNA-Expression junger Mäuse [100 %], ermittelt durch qPCR.

	Jung, Gehirn [100 %]	Alt, Gehirn [% Jung]	Alt Acy, Gehirn [% Jung]	Jung, Leber [100 %]	Alt, Leber [% Jung]	Alt Acy, Leber [% Jung]
SIRT1	100,0 \pm 4,3	90,3 \pm 4,0 (↓)	104,9 \pm 2,2 (↑#*)	100,0 \pm 7,0	74,1 \pm 9,7 (↓)	108,7 \pm 10,3 (↑#*)
SIRT3	100,0 \pm 5,7	95,6 \pm 4,3	90,4 \pm 5,6	100,0 \pm 7,7	87,4 \pm 4,4 (↓)	73,6 \pm 7,7 (↓#*)
AMPK (beta)	100,0 \pm 5,1	106,3 \pm 8,1	90,4 \pm 3,2 (↓#)	100,0 \pm 9,2	87,4 \pm 5,5 (↓)	95,0 \pm 10,3 (↑#)
KI (Ndufv1)	100,0 \pm 3,7	81,7 \pm 2,0 (↓**)	88,1 \pm 4,4	100,0 \pm 8,2	78,8 \pm 3,6 (↓)	88,7 \pm 10,9 (↑#)
KIV (Cox5A)	100,0 \pm 5,8	97,3 \pm 8,9	78,4 \pm 6,9 (↓#)	100,0 \pm 7,4	85,4 \pm 2,7 (↓)	85,4 \pm 5,0
CREB	100,0 \pm 4,0	98,8 \pm 5,0	92,8 \pm 3,2	100,0 \pm 15,9	61,5 \pm 6,0 (↓)	94,8 \pm 16,4 (↑#)
PGC1 α	100,0 \pm 4,8	94,4 \pm 3,8	91,0 \pm 5,2	100,0 \pm 14,4	59,5 \pm 8,0 (↓)	81,4 \pm 12,2 (↑#)
Nrf1	100,0 \pm 5,0	83,9 \pm 2,4 (↓*)	92,3 \pm 5,4 (↑#)	100,0 \pm 7,2	86,5 \pm 9,5 (↓)	100,3 \pm 11,1 (↑#)
Tfam	100,0 \pm 2,9	96,4 \pm 3,5	97,4 \pm 6,2	100,0 \pm 6,8	79,0 \pm 5,8 (↓)	81,9 \pm 7,5
SOD2	100,0 \pm 13,4	90,4 \pm 4,3 (↓)	95,3 \pm 6,7	100,0 \pm 15,4	76,0 \pm 9,5 (↓)	87,3 \pm 11,9 (↑#)
KAT	100,0 \pm 12,6	86,1 \pm 6,1 (↓)	90,7 \pm 7,5	100,0 \pm 20,4	46,7 \pm 11,4 (↓)	60,6 \pm 15,9 (↑#)
GPx1	100,0 \pm 11,2	85,7 \pm 6,5 (↓)	83,1 \pm 5,3	100,0 \pm 29,4	36,1 \pm 14,2 (↓)	75,2 \pm 24,8 (↑#)

n=10, * p <0,05, ** p <0,01, Jung vs. Alt, #* p <0,05 Alt vs. Alt Acy, one-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison post test, (↑/↓) tendenzielle Erhöhung/Verminderung gegenüber der Gruppe Jung, (↑#/↓#) tendenzielle Erhöhung/Verminderung gegenüber der Gruppe Alt

In der Leber wurde eine numerisch stärkere altersbedingte Abnahme der Genexpression für alle untersuchten Gene festgestellt, die jedoch aufgrund höherer Variationen innerhalb der Gruppen nur zu tendenziellen Unterschieden gegenüber der Gruppe Jung (100 %) führten. Die deutlichsten Abnahmen in der Genexpression wurden für SIRT1, CREB, PGC1 α , SOD2, KAT, und GPx1 mit Genexpressionen von 74,1 %, 61,5 %, 59,5 %, 76,0 %, 46,7 % und 36,1 % beobachtet. Hinsichtlich des Effekts von Acy zeigte sich im Gehirn eine signifikante Erhöhung der SIRT1 Expression auf 104,8 % gegenüber der Kontrollgruppe Alt mit 90,3 % (p <0,05, Abb 4.18, Tab. 4.6). Dieser Effekt zeigte sich auch in der Leber mit einer Expression von 74,1 % in der Gruppe Alt und 108,7 % in der Gruppe Alt Acy (p <0,05). Demgegenüber wurde für SIRT3 im Hirnhomogenat kein Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt. Im Leberhomogenat wurde für SIRT3 darüber hinaus eine signifikante Verminderung der Expression nach Acy-Fütterung auf 73,6 % gegenüber der Gruppe Jung beobachtet. Daneben wurde im Lebergewebe der Gruppe Alt Acy, mit Ausnahme von Tfam und Komplex IV, für alle untersuchten Gene

eine tendenzielle Steigerung der Expression gegenüber der Gruppe Alt festgestellt, die bei PGC1 α , CREB und GPx1 besonders ausgeprägt war.

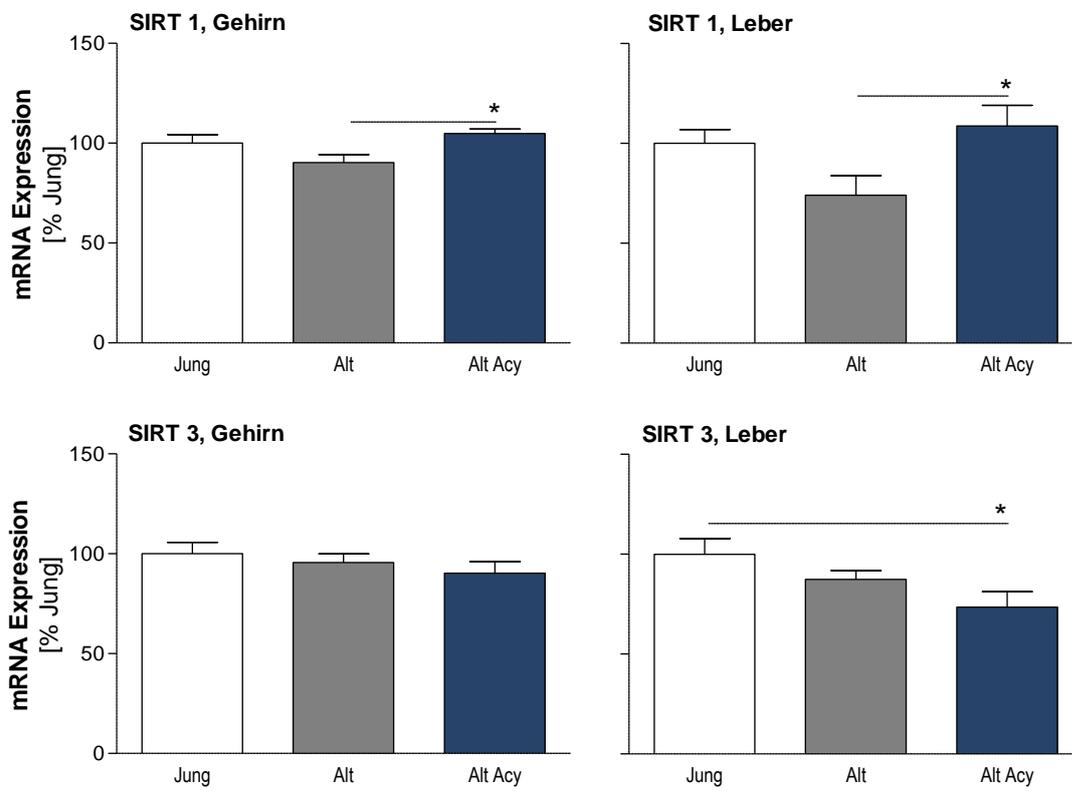


Abb 4.18.: mRNA-Expression von SIRT1 und SIRT3 im Hirn- und Leberhomogenat der C57BL/6J-Mäuse nach 6-monatiger Acy-Fütterung. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.17; dargestellt sind Mittelwerte der mRNA-Expression von n=9-10 männlichen Mäusen normiert auf die mRNA-Expression der Gruppe Jung (100 %) ermittelt durch qPCR; * p <0,05, 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; Daten wurden unter Mithilfe von Carmina Schäfer erhoben.

4.2.2.3 Mitochondriale Funktion im Gehirn

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, inwieweit neben den Effekten auf die Genexpression auch mitochondriale Funktionen im Gehirn durch die Fütterungsmaßnahmen beeinflusst werden können.

In dissoziierten Hirnzellen der Langzeitstudie zeigte sich eine mitochondriale Dysfunktion wie sie auch in ähnlicher Ausprägung für die Kurzzeitstudie beschrieben wurde. Auch in der Langzeitstudie konnten hinsichtlich des basalen MMPs keine signifikanten Unterschiede zwischen der 3 Monate alten Gruppe Jung und der 19 Monate alten Kontrollgruppe Alt festgestellt werden (Abb. 4.19A). Ein tendenziell erniedrigtes MMP in der Gruppe Alt war auch hier zu verzeichnen, begleitet von einem tendenziell höheren MMP nach Fütterung mit Acy und HBE. Zusätzlich zu den basalen Werten wurden dissoziierte Hirnzellen *ex vivo* dem nitrosativen Stressor SNP ausgesetzt. Hier zeigte sich eine Reduktion des MMPs in allen vier Gruppen, die

in der Gruppe Jung mit 81,2 % des Basalwerts leicht höher lag als in den alten Gruppen mit 84,2–84,7 % (Abb. 4.19C). Für die Gruppe Alt HBE, mit dem höchsten Wert, war der Unterschied gegenüber der Gruppe Jung signifikant.

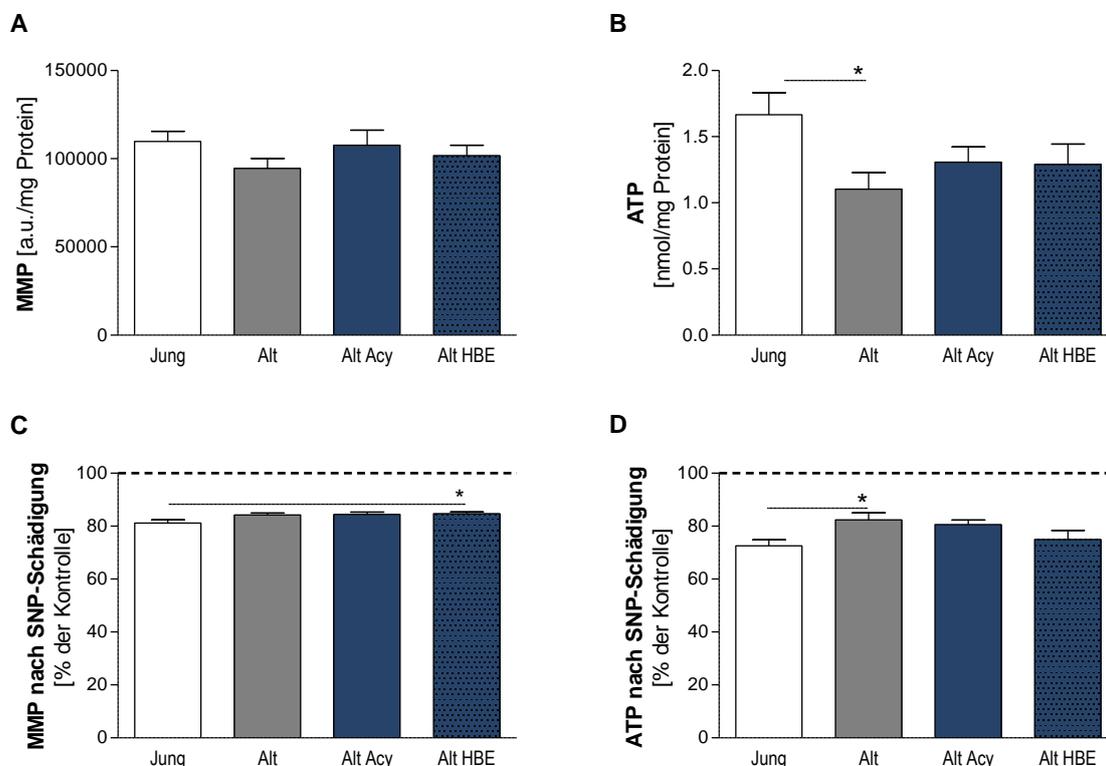


Abb. 4.19: MMP und ATP-Konzentrationen in dissoziierten Hirnzellen der C57BL/6J-Mäuse nach 6-monatiger Fütterung mit Acy und HBE. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.17; dargestellt sind Mittelwerte±SEM des basalen mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) (A), der basalen ATP-Konzentrationen (B), jeweils normiert auf mg Protein, sowie Mittelwerte±SEM des MMPs nach 2 mM SNP-Schädigung (C) und der ATP-Konzentration nach 0,1 mM SNP-Schädigung (D) normiert auf den jeweiligen basalen Wert (100 %); n=8-10 Männchen, * $p < 0,05$, 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test.

Eine deutliche, altersbedingte Verminderung der ATP-Konzentrationen ähnlich der Kurzzeitstudie konnte auch in dissoziierten Hirnzellen der Langzeitstudie beobachtet werden. Die Gruppe Jung wies mit 1,66 nmol/mg Protein eine signifikant höhere ATP-Konzentration auf als die Kontrollgruppe Alt mit 1,10 nmol/mg Protein (Abb. 4.19B). Die Fütterung mit Acy und HBE führte zu numerisch, aber nicht signifikant erhöhten Werten von 1,31 und 1,30 nmol/mg Protein. Hinsichtlich der Reaktion auf nitrosativen Stress zeigte die Gruppe Jung mit 72,5 % des Basalwerts, wie in der Kurzzeitstudie, den höchsten SNP-bedingten Abfall der ATP-Spiegel (Abb. 4.19D) und wich von der Kontrollgruppe Alt mit 82,4 % signifikant ab ($p < 0,05$). Ein signifikanter Einfluss der Fütterung mit Acy oder HBE wurde, mit ATP-Spiegeln von 80,6 % und 74,9 %, nicht nachgewiesen, wenn auch die Gruppe Alt HBE eine Tendenz in Richtung der Gruppe Jung zeigte.

Die detaillierte Untersuchung der mitochondrialen Atmung zeigte normiert auf die Proteinwerte keine signifikanten Unterschiede und somit weder eine mitochondriale Dysfunktion noch einen Einfluss der beiden Extrakte (proteinnormierte Daten nicht gezeigt). Auch konnte kein Effekt auf die CS als Marker der mitochondrialen Masse nachgewiesen werden (Abb. 4.20A).

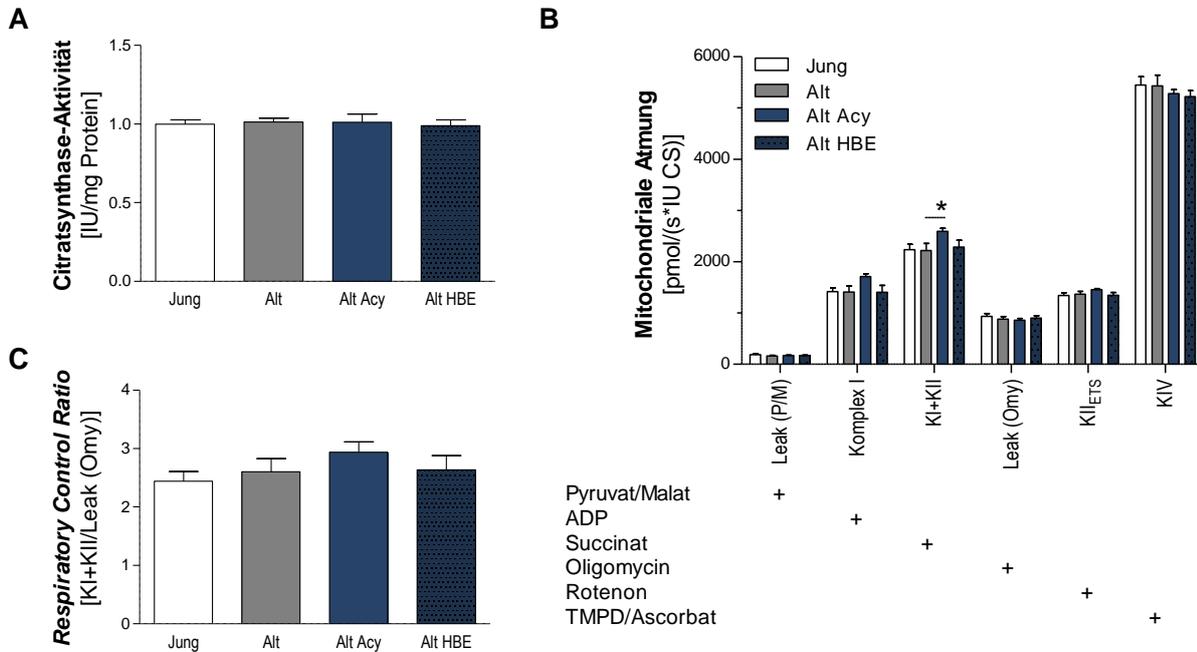


Abb. 4.20: CS und CS-normierte mitochondriale Atmung isolierter Hirnmitochondrien der C57BL/6J-Mäuse nach 6-monatiger Fütterung mit Acy und HBE. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.17; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der Citratsynthase-Aktivität (CS) in *International Units* (IU) normiert auf mg Protein (A), mitochondrialen Atmung im Oxygraph-2k nach Zugabe von Substraten, Inhibitoren und Entkopplern (gekennzeichnet mit +) normiert auf CS (B) und die *Respiratory Control Ratio* berechnet aus Atmung von Komplex I+II/Leak nach Oligomycin-Zugabe (C); n=7-11 Männchen; * $p<0,05$, 2-way ANOVA mit Bonferroni post Tests; Daten wurden unter Mithilfe von Madeleine Müller erhoben.

Werden die Atmungsaktivitäten auf die CS normiert, zeigt sich im Gegensatz zur Kurzzeitstudie keine signifikante Verminderung der Atmungsaktivität mit dem Alter (Abb. 4.20B). Für alle Untersuchungsparameter der respiratorischen Analyse wiesen die Gruppe Jung und die Kontrollgruppe Alt vergleichbare Werte auf. Die Gruppe Alt Acy hingegen verfügte gegenüber der Kontrollgruppe Alt über eine signifikant höhere Komplex I+II-Atmung ($p<0,05$) und numerisch erhöhte Komplex I-Atmung. Keine signifikanten Unterschiede konnten hinsichtlich der RCR (Quotient der KI+KII-Atmung und Leak nach Oligomycin-Zugabe) ermittelt werden, wenn gleich eine tendenzielle Erhöhung für Acy vorlag (Abb. 4.20C).

Zusammenfassend konnte in der Langzeitstudie eine mitochondriale Dysfunktion nur partiell nachgewiesen werden. Während in der Kurzzeit- und Langzeitstudie gleichermaßen signifikant

erniedrigte ATP-Spiegel und eine geringere Reaktion auf nitrosativen Stress in dissoziierten Hirnzellen alter Mäuse gefunden wurde, war eine verminderte Komplex IV-Atmung nur in der Kurzzeit- und nicht in der Langzeitstudie vorhanden. Hinsichtlich eines Effekts der Extraktfütterung konnte die Langzeitbehandlung mit Acy eine Erhöhung der KI+KII-Atmung erbringen, die sich in der Kurzzeitstudie bereits tendenziell angedeutet hatte. Die HBE-Verabreichung zeigte keinen signifikanten Effekt.

4.2.2.4 Gedächtnisleistung

Der Einfluss der Alterung und der Fütterung mit Acy und dem Vergleichsextrakt HBE auf die Gedächtnisleistung sollte mit drei Verhaltenstests näher untersucht werden. Dazu gehörte der *Social Recognition* Test, der *1-Trial-Y-Maze* Test und der *Passive Avoidance* Test. In keinem der drei Tests konnte eine Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung alter Tiere gegenüber der jungen Gruppe festgestellt werden. Die Ergebnisse des *Social Recognition* Tests und des *1-Trial Y-Maze* Tests sind in Tab. 4.7 zusammenfassend dargestellt sowie die Ergebnisse des *Passive Avoidance* Test eigenständig in Abb. 4.21.

Der *Social Recognition* Test, der auf der sozialen Wiedererkennung beruht, wurde sowohl vor Fütterungsbeginn (basal) als auch zum Fütterungsende (post) durchgeführt. Der Testaufbau besteht aus einem 3-Kompartimentmodell im *open field*. In den beiden äußeren Kompartimenten ist jeweils in der Mitte ein Gitterkäfig aufgestellt unter den eine Maus platziert werden kann. Es wird untersucht inwieweit die Testmaus in einer zweiten Testphase nach 15-minütiger Pause mehr Kontakte oder eine höhere Aufenthaltszeit im Kompartiment einer unbekanntem Maus (S2) gegenüber einer in der ersten Phase schon kennengelernten Maus (S1) hat. Eine höhere Aufenthaltszeit bzw. Kontaktzeit mit der unbekanntem Maus (S2) verglichen mit der bekannten Maus (S1) in der zweiten Phase wird mit einer sozialen Wiedererkennungsleistung und somit mit einer Gedächtnisleitung assoziiert. Für diese Beurteilung stellte sich die Kontaktzeit als konstanterer Parameter als die Aufenthaltszeit heraus, sodass diese in Tab. 4.7 zusammen mit dem *Social Recognition* Index, berechnet aus $[\text{Kontaktzeit S2}/(\text{S1}+\text{S2})]*100$ angegeben ist. Es konnte weder eine altersbedingte Beeinträchtigung der sozialen Wiedererkennungsleistung vor und nach der Fütterungsphase ermittelt werden, noch ein Einfluss von der Fütterung mit Acy und HBE. Der *Recognition*-Index lag zu keinem Zeitpunkt signifikant über dem Zufallslevel von 50 %. Insgesamt konnte mit dem *Social Recognition* Test somit weder eine Gedächtnisleistung noch ein Einfluss der Extraktfütterungen ermittelt werden.

Nach Fütterungsende wurde mit dem *Y-Maze* Test ein weiterer Verhaltenstest eingeführt, welcher das räumliche Gedächtnis der Mäuse erfassen sollte. Basale Werte lagen für diesen Test

nicht vor, da dieser zum gegebenen Zeitpunkt noch nicht etabliert war. Das *Y-Maze* besteht aus drei identischen Armen, die in einem Winkel von 180° angeordnet sind. Die spontane Alternationsrate im *Y-Maze*, d. h. der Besuch aller drei Arme ohne vorher zum wiederholten Male einen der zwei anderen Arme besucht zu haben, wird als Parameter des räumlichen Gedächtnisses erfasst. Zusätzlich gibt die Anzahl der Gesamteintritte in die drei Arme Aufschluss über die lokomotorische Aktivität der Mäuse.

Tab. 4.7: Ergebnisse der Verhaltenstests in der Langzeitstudie mit Acy in C57BL/6J-Mäusen. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.17; Daten wurden unter Mithilfe von Madeleine Müller und Marta Borchiellini erhoben.

Social Recognition		1: Kontaktzeit S2 vs. S1 2: MW±SEM des Recognition-Index [%]			
	Jung	Alt	Alt Acy	Alt HBE	
Basal	1: → 2: 49,0±2,9 (n=13)	1: → 2: 53,3±3,9 (n=12)	1: → 2: 54,6±4,8 (n=12)	1: → 2: 54,3±5,5 (n=10)	
Post	1: → 2: 49,4±3,5 (n=13)	1: → 2: 53,1±4,6 (n=12)	1: → 2: 53,5±2,8 (n=12)	1: → 2: 53,0±4,2 (n=10)	
1-Trial-Y-Maze		MW±SEM der Alternationsrate [%]			
	Jung	Alt	Alt Acy	Alt HBE	
Post	61,3±2,7 (n=15)	51,0±4,6 (n=14)	55,8±4,8 (n=13)	57,5±4,8 (n=12)	
Lokomotorik (Y-Maze)		MW±SEM der Eintritte im 1-Trial-Y-Maze			
	Jung	Alt	Alt Acy	Alt HBE	
Post	28,3±1,5 (n=15)	16,5±1,2*** (n=15)	14,4±0,9*** (n=13)	17,0±1,1*** (n=12)	

S1: bekannte Maus, S2: unbekannte Maus, S2 vs. S1 ↑: Erinnerungsleistung, → keine Erinnerungsleistung; Recognition-Index [%]: [Kontaktzeit S2/(S1+S2)]*100; *p<0,05, ungepaarter-Test Kontrolle vs. Acy; Alternation: Eintritt in alle drei Arme des *Y-Mazes* ohne wiederholten Besuch eines anderen Armes innerhalb der 5-minütigen Testphase, Alternationsrate: [Anzahl Alternationen/(Gesamteintritte-2)]*100; ***p<0,001 vs. Jung, 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test

Wie aus Tab. 4.7 hervorgeht, zeigte die 3 Monate alte Gruppe Jung mit einer Alternationsrate von 61,3 % die höchste Leistung im *Y-Maze* und die 19 Monate alte mit Kontrollgruppe Alt mit 51,0 % die niedrigste Leistung. Mit Alternationsraten von 55,8 % und 57,5 % zeigten die Gruppen Alt Acy und Alt HBE im Alter von 19 Monaten eine tendenziell höhere Leistung. Ein signifikanter Unterschied zwischen den vier Gruppen konnte allerdings nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wiesen die jungen Mäuse eine signifikant höhere Anzahl an Eintritten im *Y-Maze* und somit lokomotorische Aktivität gegenüber allen drei alten Gruppen auf

($p < 0,001$), die sich untereinander nicht unterschieden. Es konnte somit eine altersbedingte Verminderung der lokomotorischen Aktivität ermittelt werden, auf die weder die Fütterung mit Acy noch die Fütterung mit HBE einen Einfluss hatte.

Das Langzeitgedächtnis der Mäuse sollte mit dem *Passive Avoidance* Ansatz erfasst werden, bei dem die Erinnerung an einen elektrischen Schock getestet wird. Aufgrund einer starken Erinnerungsleistung der Mäuse an einen solchen Schock, erfolgte die Untersuchung nur zum Studienende. In dem *Passive Avoidance* Testsetting wird die Maus in ein 2-Kammersystem gesetzt, bei dem eine hell erleuchtete Kammer von einer abgedunkelten Kammer durch ein verschließbares Tor getrennt sind. Setzt man die Maus in die erleuchtete Kammer flüchtet sie ihrer Natur entsprechend in die dunkle Kammer. Bei dem Eintritt in die dunkle Kammer wird die Tür geschlossen und ein leichter elektrischer Schock (hier 0,2 mA) über den aus Gitter bestehenden Boden verabreicht (Konditionierung). Zu einem späteren Zeitpunkt, üblicherweise nach 24 h, wird das Erinnerungsvermögen an den Schock getestet, in dem die Maus erneut in die erleuchtete Kammer gesetzt wird. Die Zeit bis zum Übertritt in die dunkle Kammer (*Step-through latency*) nach dem Schock (post) wird mit der Zeit bis zum Übertritt vor dem Schock (prä) verglichen. Eine hohe *Step-through latency* wird mit einem hohen Langzeiterinnerungsvermögen verbunden. Verbleibt die Maus beim post Test 300 s in der erleuchteten Kammer wird der Test abgebrochen und die 300 s als Höchstwert erfasst.

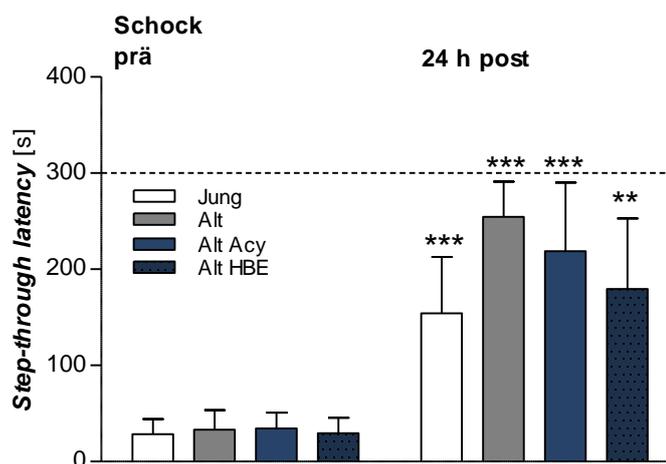


Abb. 4.21: Step-through latency im Passive Avoidance Test mit C57BL/6J-Mäusen nach 6-monatiger Fütterung mit Acy und HBE. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.17; dargestellt ist der Mittelwert der *Step-through latency* im *Passive Avoidance* Test ± 95 % Konfidenzintervall von $n=12-15$ Männchen. Prä: vor dem Schock, 24 h post: 24 h nach dem Schock (0,2 mA); *Step-through latencies* von 300 s im post Test führten zum Abbruch und dem Maximalwert im Testergebnis; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. prä Wert, Wilcoxon matched-pairs signed rank Test; Acy: Fütterung mit 2 g/kg ExGrape Acy; HBE: Fütterung mit 2 g/kg Heidelbeerextrakt; Daten wurden unter Mithilfe von Madeleine Müller erhoben.

Wie Abb. 4.21 zu entnehmen ist, zeigten alle vier Gruppen eine vergleichbar kurze mittlere prä *Step-through latency* von weniger als 35 s. Vierundzwanzig Stunden nach der Vermittlung des Schocks wiesen alle Gruppen verglichen mit ihrem jeweiligen prä Wert eine signifikant höhere Übertrittszeit auf. Die Gruppe Jung erreichte den niedrigsten und die Kontrollgruppe Alt den höchsten 24 h post Wert. Die Gruppen Alt Acy und Alt HBE zeigten Werte zwischen denen der Gruppe Jung und Gruppe Alt. Ein signifikanter Unterschied der 24 h post Werte lag zwischen den vier Gruppen nicht vor.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Verhaltenstests zur Gedächtnisleistung keine altersbedingte Dysfunktion hervorbringen konnten. Im *Social Recognition* Test wurde für keine Gruppe eine soziale Wiedererkennungslleistung nachgewiesen. Der *1-Trial Y-Maze* Test erfasste eine tendenziell schlechtere räumliche Gedächtnisleistung und signifikant niedrigere lokomotorische Aktivität der Kontrollgruppe Alt gegenüber der Gruppe Jung. Im *Passive Avoidance* Test dagegen konnte eine 24 h post und somit Langzeitgedächtnisleistung für alle Gruppen ermittelt werden, die jedoch für die Gruppe Jung gegenüber der Kontrollgruppe Alt tendenziell geringer ausfiel. Ein signifikanter Effekt der Acy- oder HBE-Fütterung blieb in allen Tests aus.

4.2.3 Lebenszeitstudie

In der Lebenszeitstudie mit Acy wurden jeweils 50 Männchen des C57BL/6J-Mausstamms ab einem Alter von 6 Monaten mit 2 g/l Acy und somit einer Dosis von 200 mg/kg KG oder Kontrolllösung im Trinkwasser behandelt. Das Gewicht der Tiere wurde monatlich kontrolliert und die Lebensdauer protokolliert. Die kognitive und motorische Leistung wurde in einer Untergruppe von jeweils 15 Tieren mittels Verhaltenstests (*Rotarod*, *Passive Avoidance*, *Social Recognition* und *Y-Maze*) untersucht.

Wie in Abb. 4.22 dargestellt, zeigte sich in der Acy-Gruppe und der Kontrollgruppe ein vergleichbarer mittlerer Gewichtsverlauf, der durch einen Anstieg bis zu einer Behandlungsdauer von 10 Monaten und somit einem Alter von 16 Monaten gekennzeichnet war, gefolgt von einer Gewichtsabnahme bis zum Ende der Lebenszeit.

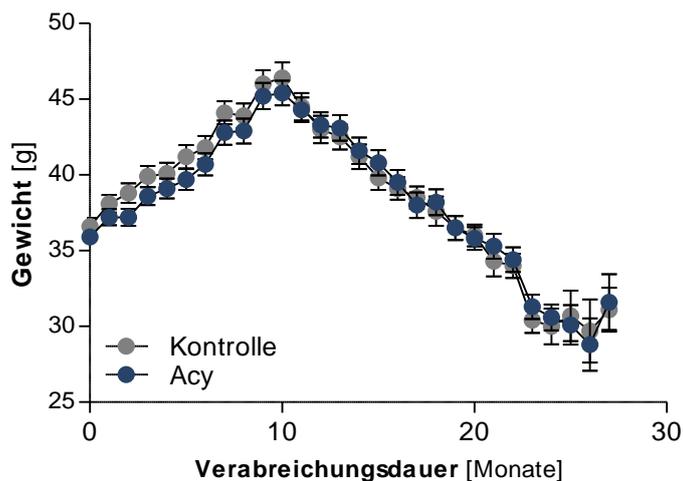


Abb. 4.22: Gewichtsverlauf der C57BL/6J-Mäuse in der Acy-Lebenszeitstudie. Dargestellt sind Mittelwerte der Körpergewichte [g] \pm SEM der Tiere über die lebenslange Verabreichungsdauer von 2 g/l Acy oder Kontrolle im Trinkwasser beginnend im Alter von 6 Monaten; n=50 Männchen zu Studienbeginn; Daten wurden unter Mithilfe von Christina Plank, Marta Borchiellini, Madeleine Müller und Carmina Schäfer erhoben.

Die motorische Leistung der Tiere wurde anhand des Rotarod Tests untersucht, für den auch eine basale Leistung vor Fütterungsbeginn erfasst wurde. Der Rotarod Test beruht auf der Fortbewegung auf einer zunehmend schneller rotierenden Stange. Die *Latency to fall* gibt dabei an, wie lange sich die Testmaus auf der rotierenden Stange halten kann und gibt somit Auskunft über Kondition, Koordination und Balance. Das Intervall der Tests wurde auf 3 Monate festgelegt. In Abb. 4.23 ist der Verlauf der Leistung der Mäuse auf dem Rotarod im Alter von 6 Monaten (basal, vor Beginn der Verabreichung) sowie im 3-Monatsintervall bis zu einem Alter von 21 Monaten dargestellt. Aufgrund der zunehmenden Gebrechlichkeit der Mäuse wurde der Test nach diesem Zeitpunkt eingestellt. Die Kontrollgruppe wies im Alter von 6-18 Monaten eine konstante mittlere *Latency to fall* von 16-18 s auf. Es zeigte sich weder eine Verbesserung nach Beginn des Tests noch eine Verschlechterung mit zunehmendem Alter. Im Alter von 21 Monaten war ein numerischer, aber nicht signifikanter Anstieg auf 20 s zu verzeichnen. Wird die Kontrollgruppe in eine schwache Gruppe (*Latency to fall* > 15 s) und eine starke Gruppe (*Latency to fall* > 15 s) gemessen am Basalwert im Alter von 6 Monaten unterteilt, konnte im Zeitverlauf mit Ausnahme der höheren Leistung zum Ende (mit 21 Monaten) eine tendenzielle Abnahme der Leistung in der starken Gruppe (bis 12 Monate) und eine tendenzielle Zunahme der Leistung (bis 15 Monate) in der schwachen Gruppe festgestellt werden. In der Acy-Gruppe war zwischen dem basalen Wert mit 6 Monaten und der Leistung mit 9 Monaten und somit nach dreimonatiger Acy-Verabreichung ein signifikanter Anstieg der Leistung auf ein Level zu verzeichnen, welches über die weiteren Untersuchungszeitpunkte stabil blieb und mit Ausnahme von 18 Monaten signifikant höher als der Basalwert lag.

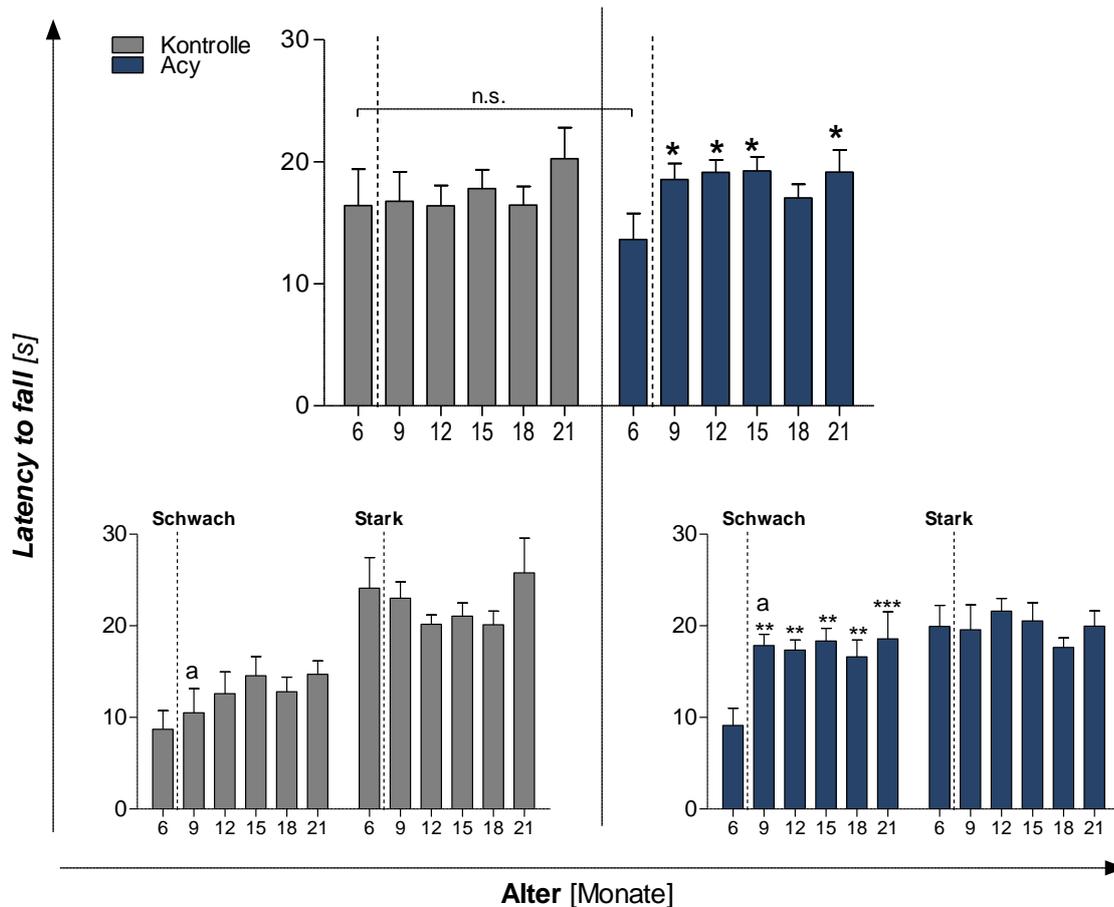


Abb. 4.23: Motorische Leistung (*Latency to fall*) im Rotarod Test mit C57BL/6J-Mäusen in der Acy-Lebenszeitstudie. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.22; dargestellt sind Mittelwerte der *Latency to fall* im Rotarod Test \pm SEM in der Kontrollgruppe und Acy-Gruppe gesamt sowie aufgeteilt in eine starke Gruppe (*Latency to fall* > 15 s) und eine schwache Gruppe (*Latency to fall* < 15 s) gemessen am Basalwert im Alter von 6 Monaten; n=12 Männchen; * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 vs. 6 Monate, 2-way ANOVA (repeated measures) mit Bonferroni post Tests; ^a p <0,05 Kontrolle vs. Acy, gepaarter t -Test; ausgeschlossen wurden Mäuse, für die nicht über den gesamten Testverlauf Daten vorlagen; Daten wurden unter Mithilfe von Christina Plank, Marta Borchiellini und Madeleine Müller erhoben.

Bei der differenzierten Betrachtung der schwachen und starken Gruppe wird deutlich, dass der Leistungsanstieg der Acy-Gruppe in einer signifikanten Verbesserung der Leistung der schwachen Untergruppe begründet lag. Die starke Gruppe hingegen zeigte eine relativ konstante Leistung im Zeitverlauf. Wie die Kontrollgruppe wies auch die Acy-Gruppe insgesamt keinen altersassoziierten Rückgang der Leistung auf.

Im Vergleich der beiden Behandlungsgruppen wird deutlich, dass der Leistungsanstieg in der Acy-Gruppe zum Alterszeitpunkt 9 Monate mit einer signifikant besseren Leistung der schwachen Acy Gruppe im direkten Vergleich zur schwachen Kontrollgruppe verbunden war, der tendenziell auch im Zeitverlauf erkennbar blieb. Diese Beobachtung schlägt sich jedoch nicht

in der Gesamtbetrachtung der beiden Gruppen nieder, die eine ähnliche Leistung beider Gruppen zeigte. Die Basalwerte der Kontrollgruppe und der Acy-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant, unterlagen jedoch kleineren Abweichungen, die durch den generellen Ausschluss von Mäusen, die während des Untersuchungsverlaufs gestorben sind, verstärkt wurden. Ausgenommen des Leistungsanstiegs der schwachen Acy-Gruppe zeigten sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikant unterschiedliche Leistungen in den beiden Behandlungsgruppen und somit kein Effekt der Acy-Verabreichung auf die motorische Leistung auf dem Rotarod.

Das Langzeitgedächtnis der Mäuse sollte mit dem *Passive Avoidance* Ansatz erfasst werden. Das Intervall des Tests wurde auch hier beginnend mit dem Basalwert auf 3 Monate festgelegt. Aufgrund einer technischen Störung des zu Beginn genutzten *Passive Avoidance* Apparats konnte eine einheitliche Konditionierung der Mäuse durch die Induktion des elektrischen Schocks zu Beginn der Studie jedoch nicht mit Sicherheit gewährleistet werden. Zudem zeigte sich ein Erinnerungsvermögen der Mäuse über das dreimonatige Intervall, sodass der Test zunächst eingestellt wurde. In einem Alter von 18 Monaten, ein Zeitpunkt zudem sich in früheren Studien Alterungserscheinungen in der mitochondrialen Funktion gezeigt haben, wurde der *Passive Avoidance* Test in einer neuen Untergruppe von 15 Mäusen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.24 dargestellt.

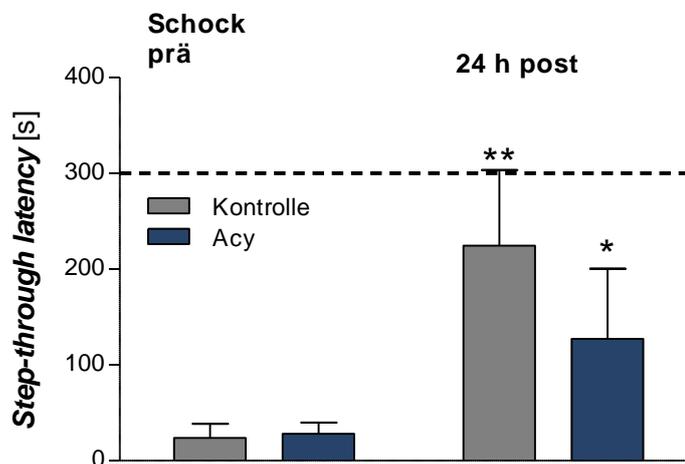


Abb. 4.24: Step-through latency im Passive Avoidance Test mit C57BL/6J-Mäusen in der Acy-Lebenszeitstudie. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.22; dargestellt ist der Mittelwert der *Step-through latency* im *Passive Avoidance* Test \pm 95 % Konfidenzintervall von n=12-14 Männchen im Alter von 18 Monaten. Prä: vor dem Schock, 24 h post: 24 h nach dem Schock (0,2 mA); *Step-through latencies* von 300 s im post Test führen zum Abbruch und dem Maximalwert im Testergebnis; * p <0,05, ** p <0,01 vs. prä Wert, Wilcoxon matched-pairs signed rank Test; Daten wurden unter Mithilfe von Madeleine Müller erhoben.

Vor der Induktion des elektrischen Schocks (prä) zeigten beide Behandlungsgruppen eine geringe und nicht signifikant unterschiedliche mittlere Übertrittszeit (*Step-through latency*) von

unter 30 s. Der post Test nach 24 h ließ im Vergleich zum jeweiligen prä Wert in beiden Gruppen eine signifikant höhere *Step-through latency* und somit eine Gedächtnisleistung erkennen. Die beiden Behandlungsgruppen unterschieden sich weder in ihrem prä noch 24 h post Wert. Die Acy-Gruppe wies jedoch eine numerisch geringere 24 h post *Step-through latency* auf.

In Ergänzung zu den vorgestellten Verhaltenstests wurden während des Studienverlaufs mit dem *Social Recognition* und dem *Y-Maze* zwei weitere Verhaltenstests eingeführt deren Ergebnisse in Tab. 4.8 dargestellt sind. Im *Social Recognition* Test war für die Kontrollgruppe zu keinem Testzeitpunkt (Alter 12-21 Monate) eine soziale Wiedererkennungslleistung festzustellen, da keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontaktzeiten mit der bekannten Maus (S1) und der unbekannt Maus (S2) vorlagen. Die Acy-Gruppe hingegen zeigte im Alter von 12 Monaten eine signifikant höhere Kontaktzeit mit der unbekannt Maus S2 verglichen mit S1 und somit eine soziale Wiedererkennungslleistung. Dieser Effekt stellte sich im weiteren Verlauf als temporärer Effekt heraus; im Test nach 15, 18 und 21 Monaten konnten keine signifikanten Unterschiede in den Kontaktzeiten zwischen S1 und S2 festgestellt werden. Die temporär höhere Gedächtnisleitung der Acy Gruppe mit 12 Monaten führte auch zu einem tendenziell höheren *Recognition-Index*, berechnet aus dem Quozienten $[\text{Kontaktzeit S2}/(\text{S1}+\text{S2})]*100$, gegenüber der Kontrollgruppe. Ein signifikant höherer *Recognition-Index* gegenüber dem Zufallslevel von 50 % (one-sample *t*-Test) oder der Kontrollgruppe wurde allerdings für keine Gruppe und zu keinem Testzeitpunkt gefunden.

Die spontane Alternationsrate im *1-Trial-Y-Maze*, d. h. der Besuch aller drei Arme ohne vorher zum wiederholten Male einen der zwei anderen Arme besucht zu haben, wird als Parameter des räumlichen Gedächtnisses erfasst. Signifikante Unterschiede in der Alternationsrate des *1-Trial-Y-Mazes* zwischen der Kontrollgruppe und der Acy-gefütterten Gruppe konnten im untersuchten Alter von 21 und 24 Monaten nicht ermittelt werden (Tab. 4.8). Im Alter von 24 Monaten wurde eine tendenziell höhere Leistung der Acy-Gruppe beobachtet. Die Alternationsraten mit 24 Monaten unterlagen jedoch besonders in der Kontrollgruppe größeren Schwankungen, welche auf eine hohe Sterberate und somit kleinere Gruppengröße zurückgeführt werden könnte. Die Anzahl der Gesamteintritte in die Arme des *Y-Mazes* als ein Maß für die lokomotorische Aktivität lag in der Acy-Gruppe höher und unterschied sich im Alter von 24 Monaten signifikant von der Kontrollgruppe (Tab. 4.8) ($p<0,05$).

Tab. 4.8: Ergebnisse der ergänzenden Verhaltenstests in der Acy-Lebenszeitstudie mit C57BL/6J-Mäusen. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.22; Daten wurden unter Mithilfe von Madeleine Müller und Marta Borchiellini erhoben.

<i>Social Recognition</i>		
	1: Kontaktzeit S2 vs. S1 2: MW±SEM des <i>Recognition</i> -Index [%]	
Alter [Monate]	Kontrolle	Acy
12	1: → 2: 50,3±2,3 (n=12)	1: ↑** 2: 59,6±4,4 (n=13)
15	1: → 2: 47,6±5,0 (n=15)	1: → 2: 52,7±4,7 (n=13)
18	1: → 2: 46,6±6,7 (n=14)	1: → 2: 57,3±8,0 (n=10)
21	1: → 2: 56,4±6,6 (n=12)	1: → 2: 44,1±5,7 (n=12)
<i>1-Trial-Y-Maze</i>		
	MW±SEM der Alternationsrate [%]	
Alter [Monate]	Kontrolle	Acy
21	58,5±7,5 (n=10)	56,3±3,8 (n=11)
24	51,4±16,7 (n=5)	62,7±6,3 (n=11)
<i>Lokomotorik (Y-Maze)</i>		
	MW±SEM der Eintritte im <i>1-Trial Y-Maze</i>	
Alter [Monate]	Kontrolle	Acy
21	9,9±1,7 (n=12)	13,2±2,1 (n=12)
24	5,4±1,2 (n=7)	9,9±1,4* (n=11)

S1: bekannte Maus, S2: unbekannte Maus, Kontaktzeit S2 vs. S1 ↑** $p < 0,05$ (gepaarter t -Test); Erinnerungsleistung, → keine Erinnerungsleistung; Recognition-Index [%]: $[\text{Kontaktzeit S2}/(\text{S1}+\text{S2})]*100$; * $p < 0,05$, ungepaarter t -Test vs. Kontrolle; Alternation: Eintritt in alle drei Arme des *Y-Mazes* ohne wiederholten Besuch eines anderen Armes innerhalb der 5-minütigen Testphase, Alternationsrate: $[\text{Anzahl Alternationen}/(\text{Gesamteintritte}-2)]*100$

Nach dem Ableben aller Mäuse erfolgte die Erstellung von Überlebenskurven (Kaplan-Meier) anhand der erfassten Lebenszeit der einzelnen Mäuse. Die Gesamtauswertung der Kurven ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Überlebenskurve der Kontrolltiere und der Tiere mit Acy-Verabreichung ($p=0,31$, Log-rank Test) (Abb. 4.25, Tab. 4.9). Auch die Analyse der Überlebenskurven mit dem Gehan–Breslow–Wilcoxon Test der mehr Gewicht auf die frühen Sterbefälle legt, führte zu keinem signifikanten Unterschied ($p=0,10$). Dennoch konnte eine deutliche Rechtsverschiebung der Überlebenskurve der Acy-Gruppe zwischen einem Alter von

80 und 120 Wochen (18-27 Monate) verzeichnet werden. Dies ist ein Alterszeitpunkt der für C57BL/6J-Mäuse laut dem *Jackson Laboratory* in die Lebensphase C „gealtert“ eingeordnet werden kann bzw. über diese hinausgeht.

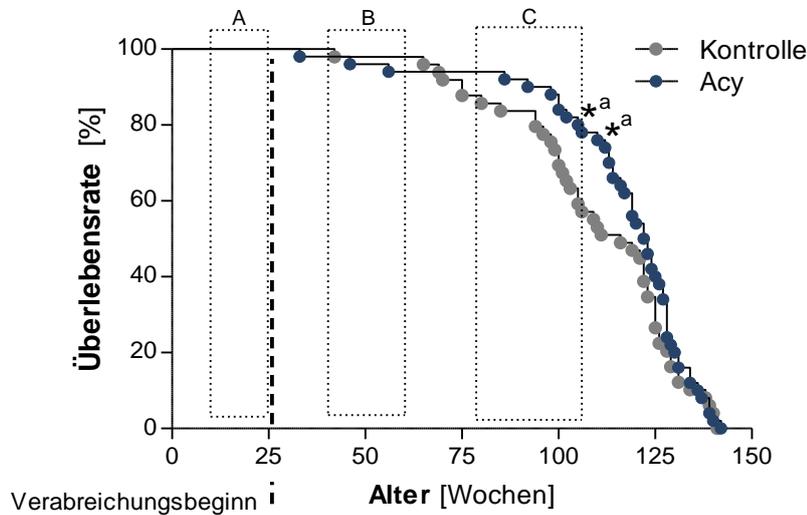


Abb. 4.25: Überlebensraten der C57BL/6J-Mäuse in der Acy-Lebenszeitstudie. Männliche C57BL/6J-Mäuse erhielten ab einem Alter von 6 Monaten (gestrichelte Linie) bis zu ihrem natürlichen Tod mit 2 g/l Acy angereichertes Trinkwasser und die Lebenszeit wurde erfasst; dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven von n=49-50 Männchen bei Studienbeginn; ^a $p < 0,05$ Log-rank Test bei dem Vergleich der Überlebenskurven zum Alterszeitpunkt 24 und 25 Monate. Lebensphasen in gestrichelten Bereichen (*Jackson Laboratory* 2017a), A: erwachsen, B: im mittleren Alter, C: gealtert; Daten wurden unter Mithilfe von Christina Plank, Marta Borchiellini, Madeleine Müller und Carmina Schäfer erhoben.

Tab. 4.9: Kennzahlen der Acy-Lebenszeitstudie mit C57BL/6J-Mäusen. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.25; Daten wurden unter Mithilfe von Christina Plank, Marta Borchiellini, Madeleine Müller und Carmina Schäfer erhoben.

	Kontrolle	Acy
Mediane Lebensspanne	116,0	122,5
Mittleres Alter der letzten 10 %	138,6	139,4
Log-rank Test Gehan-Breslow-Wilcoxon Test	$p=0,31$ nach Studienende, ^a $p < 0,05$ im Alter von 24 und 25 Monaten $p=0,10$ nach Studienende	

Die Lebensphasen A-C sind in Abb. 4.25 durch gestrichelte Bereiche dargestellt. Die selektive Analyse der Überlebenskurven zum Alterszeitpunkt 24 und 25 Monate brachte eine signifikant höhere Überlebensrate nach Acy-Verabreichung hervor ($p < 0,05$, Log-rank Test), mit einer Überlebensrate im Alter von 25 Monaten von 76 % in der Acy Gruppe und 53 % in der Kontrollgruppe (Abb. 4.25). Nach Erreichen der medianen Lebensspanne von 122,5 Wochen in der Acy-Gruppe und 116 Wochen in der Kontrollgruppe (Tab. 4.9) glichen sich beide Überlebenskurven an. Das mittlere Überlebensalter der letzten 10 % lebenden Tiere unterschied sich mit 139,4 und 138,6 Wochen jeweils in der Acy- und Kontrollgruppe nicht signifikant (Tab. 4.9).

4.3 ExGrape und Olivenpolyphenole zur Prävention der Gehirnalterung

4.3.1 ExGrape Acy und Hydroxytyrosol in C57BL/6J-Mäusen

Neben der Untersuchung des Effekts des Traubenextrakts Acy sollte auch eine Kombination mit dem Olivenpolyphenol Hy sowie dessen alleiniger Einfluss auf altersbedingte kognitive und mitochondriale Dysfunktionen im Mausmodell untersucht werden. Analog zur Langzeitstudie mit Acy wurden 15-17 männliche C57BL/6J-Mäuse über einen Zeitraum von 6 Monaten mit 2 g Acy/0,9 g Hy (Alt Acy+Hy) oder 0,9 g Hy (Alt Hy) pro kg angereicherten Futterpellets gefüttert. Als Basisfutter diente wiederum das antioxidanzienarme Futter (Altromin. C1000 mod. mit 2.500 IU/kg Vitamin A; 20 mg/kg Vitamin E; 0 mg/kg Vitamin C; 0,150 mg/kg Selen), welches als Basis zur Extraktanreicherung diente und in unangereicherter Form als Kontrollfutter an eine gleichaltrige Gruppe (Alt) und eine junge Gruppe (Jung) verfüttert wurde. Der Fütterungsstart erfolgte für die alten Gruppen um einen Monat versetzt zur Langzeitstudie mit Acy und somit im Alter von 14 Monaten. Die Gruppe Jung wurde analog zur Langzeitstudie mit Acy im Alter von 1 Monat nach den ersten vier Fütterungsmonaten in die Studie aufgenommen, um ein Alter von 3 Monaten zum Studienende zu erreichen.

4.3.1.1 Überlebensrate und Gewichtsverlauf

Innerhalb der sechs Fütterungsmonate kam es in den vier Gruppen insgesamt zu wenigen Sterbefällen (Abb. 4.26A). In der jungen und alten Kontrollgruppe sowie der Alt Acy+Hy-Gruppe wurde jeweils 1 Sterbefall beobachtet und folglich eine Überlebensrate von 94 %. In der Alt Hy Gruppe führten 2 Sterbefälle zu einer leicht niedrigeren Überlebensrate von 88 %. Signifikante Unterschiede zwischen den Überlebenskurven traten nicht auf. Der Gewichtsverlauf über die sechs Fütterungsmonate wies innerhalb der drei alten Gruppen einen ähnlichen Verlauf auf (Abb. 4.26B). Es deutete sich eine Gewichtsabnahme beginnend mit dem 5. Fütterungsmonat und somit im Alter von 19 Monaten an. Das Gewicht der jungen Mäuse im Alter von 3 Monaten lag erwartungsgemäß deutlich unterhalb des Gewichts der alten Gruppen.

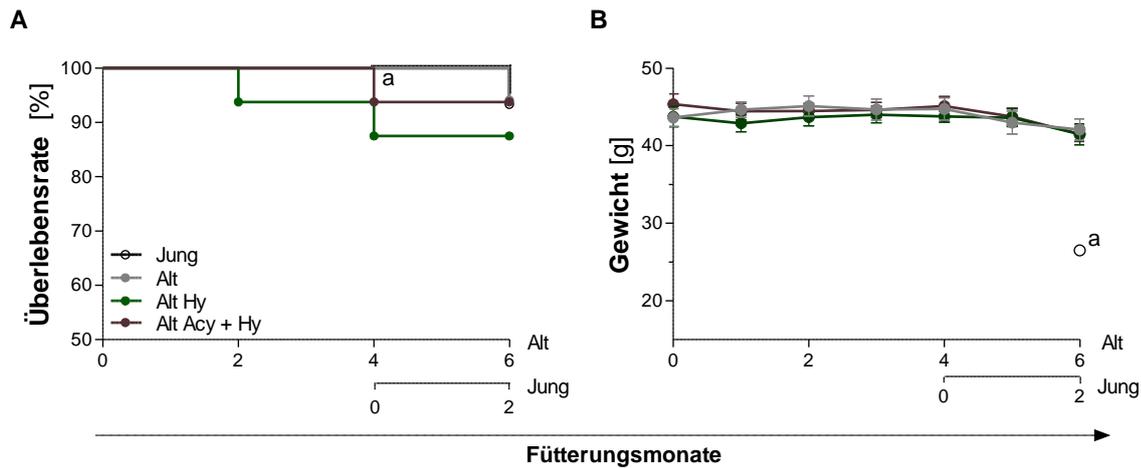


Abb. 4.26: Überlebensraten und Gewichtsverlauf der C57BL/6J-Mäuse über die 6-monatige Fütterung mit Hy und Acy+Hy. 14 Monate alte C57BL/6J-Mäuse erhielten mit 0,9 g Hy allein (Alt Hy) oder in Kombination mit 2 g Acy (Alt Acy+Hy) angereicherte Futterpellets und wurden mit gleichaltrigen (Alt) sowie jungen Mäusen (Jung) verglichen, die Basisfüttererhielten; die junge Gruppe wurde mit Ablauf des 4. Interventionsmonats hinzugezogen, dargestellt sind Überlebensraten (Kaplan-Meier Kurven) (A) und der Verlauf des Körpergewichts als Mittelwerte±SEM (B) von n=15-17 Männchen bei Fütterungsbeginn; a: Vergleich der Überlebensrate der Gruppe Jung ab 4. Monat mit Ausgangswert 100 % bei Gruppe Alt, Gewichtsdaten der Gruppe Jung liegen nur für Fütterungsmonat 6 vor; Daten wurden unter Mithilfe von Madeleine Müller erhoben.

4.3.1.2 Mitochondriale Funktion

Der Einfluss der Alterung und der mögliche Effekt einer Fütterung mit Hy und der Kombination von Acy mit Hy auf mitochondriale Funktionen wurde in dissoziierten Hirnzellen über die ATP-Spiegel und das MMP sowie in isolierten Hirnmitochondrien mittels hochauflösender Respirometrie im Oxygraph-2k untersucht. Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen den 20 Monate und 3 Monate alten Kontrollmäusen für das MMP basal sowie nach SNP-Schädigung festgestellt werden (Abb. 4.27A und C). Auch die Fütterung mit Hy und Acy+Hy zeigte keinen Effekt. Im Gegensatz dazu konnte hinsichtlich der ATP-Spiegel in den dissoziierten Hirnzellen eine deutliche, altersassoziierte mitochondriale Dysfunktion gefunden werden. Die 20 Monate alten Mäuse wiesen mit 1,1-1,2 nmol/mg Protein signifikant geringere ATP-Spiegel gegenüber den 3 Monate alten Mäusen mit 1,6 nmol/mg Protein auf (Abb. 4.27B). Dies betraf die Kontrollgruppe Alt genauso wie die gefütterten Gruppen Alt Hy und Alt Acy+Hy. Eine Verbesserung der ATP-Spiegel durch die Fütterungen konnte somit nicht erreicht werden. Auf die Schädigung mit dem nitrosativen Stressor SNP reagierten alle vier Gruppen mit einer Verminderung der ATP-Spiegel bezogen auf ihren Basalwert (Abb. 4.27D). Den niedrigsten Wert wies mit 69,4 % die Gruppe Jung auf, der sich gegenüber dem höchsten beobachteten Wert in der Gruppe Alt Hy mit 79,7 % signifikant unterschied.

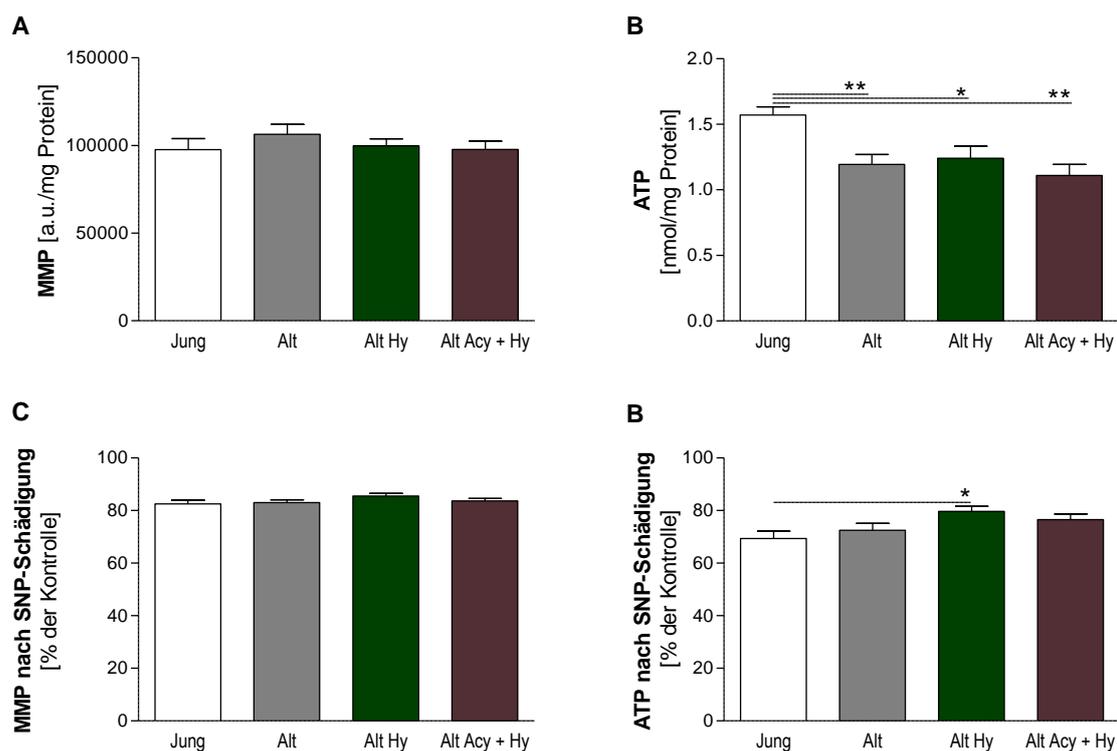


Abb. 4.27: MMP und ATP-Konzentrationen in dissoziierten Hirnzellen der C57BL/6J-Mäusen nach 6-monatiger Fütterung mit Hy und Acy+Hy. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.26; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM des basalen mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) (A), der basalen ATP-Konzentrationen (B), jeweils normiert auf mg Protein, sowie Mittelwerte \pm SEM des MMP nach 2 mM SNP-Schädigung (C) und der ATP-Konzentration nach 0,1 mM SNP-Schädigung (D), normiert auf den jeweiligen basalen Wert (100 %), von n=8-12 Männchen; * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; Daten wurden unter Mithilfe von Madeleine Müller erhoben.

Die detaillierte Untersuchung der mitochondrialen Atmung im Oxygraph-2k ergab entgegen der verminderten ATP-Spiegel, wie schon in der vorangegangenen Studie mit Acy, keine signifikant verschlechterte Atmung der 20 Monate alten Tiere gegenüber der 3 Monate alten Tiere (Abb. 4.28B). Während die proteinnormierten Atmungsaktivitäten keine Unterschiede zeigten (Daten nicht gezeigt), wurde hinsichtlich der CS-normierten Daten und somit der Atmung des einzelnen Mitochondriums eine gegenüber der Kontrollgruppe Alt signifikant verminderte Komplex IV-Aktivität nach Acy+Hy-Fütterung beobachtet (Abb. 4.28B). Die CS als Marker der mitochondrialen Masse wies mit Werten von 0,91-0,94 IU/mg Protein in den vier Gruppen einheitliche Werte auf (Abb. 4.28A). Auch die RCR wies keinen Unterschied auf (Abb. 4.28C).

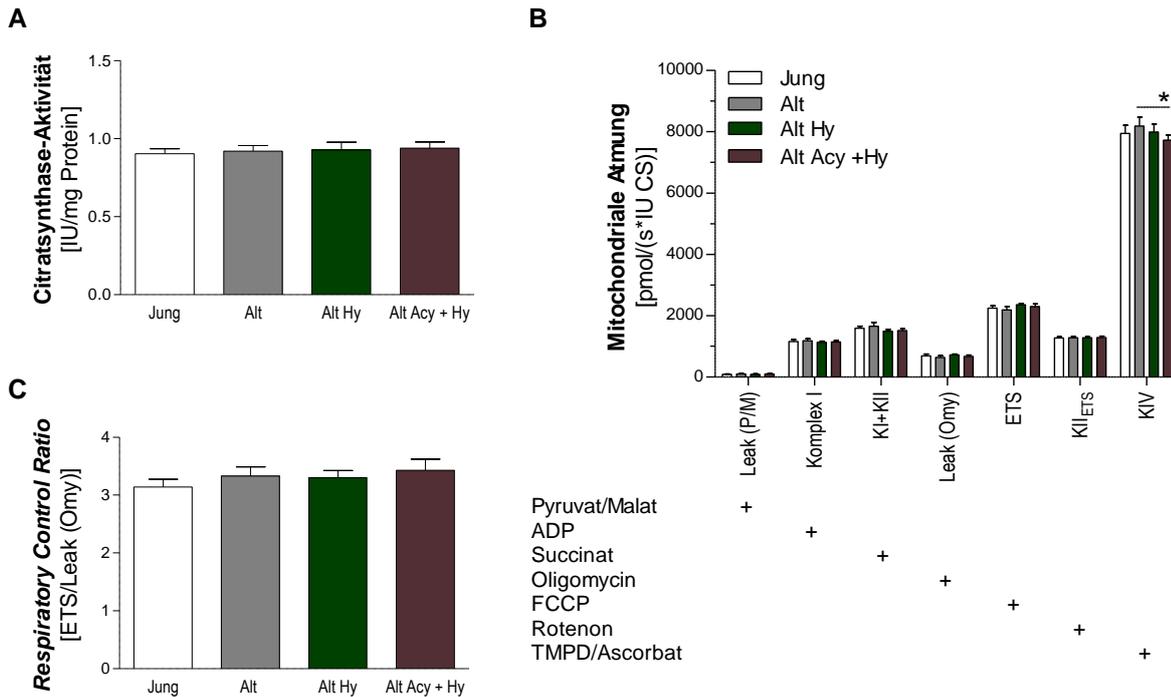


Abb. 4.28: CS und CS-normierte mitochondriale Atmung isolierter Hirnmitochondrien der C57BL/6J-Mäusen nach 6-monatiger Fütterung mit Hy und Acy+Hy. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.26; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der Citratsynthase-Aktivität (CS) in *International Units* (IU) normiert auf mg Protein (A), der mitochondrialen Atmung im Oxygraph-2k nach Zugabe von Substraten, Inhibitoren und Entkopplern (gekennzeichnet mit +) normiert auf CS (B), der *Respiratory Control Ratio* berechnet aus Atmung von Komplex I+II/Leak nach Oligomycin-Zugabe (C); n=7-10 Männchen; * p <0,05, 2-way ANOVA mit Bonferroni post Tests; Daten wurden unter Mithilfe von Madeleine Müller erhoben.

4.3.1.3 Gedächtnisleistung

Die Gedächtnisleistung und deren Beeinflussung durch die Alterung und Fütterung mit Hy und Acy wurde mittels des 1-Trial-Y-Maze Tests, *Social Recognition* Tests und des *Passive Avoidance* Tests erfasst. Der *Social Recognition* Test wurde sowohl vor Fütterungsbeginn als auch zum Ende der Fütterungsperiode durchgeführt, wohingegen der *Passive Avoidance* Test nur zum Ende erfolgte. Der 1-Trial-Y-Maze Test befand sich zum Studienbeginn in der Etablierungsphase und wurde daher als Ergänzung in die Testbatterie nach der Fütterung mit aufgenommen. Die Ergebnisse des 1-Trial-Y-Maze und des *Social Recognition* Tests sind in Tab. 4.10 zusammengefasst. Im *Social Recognition* Test zeigte sich vor der Fütterung (basal) für die Gruppe Jung im Alter von 1 Monat eine signifikant längere Kontaktzeit mit der unbekanntem Maus (S2) sowie ein *Recognition*-Index über dem Zufallslevel (50 %). Diese Gedächtnisleistung wurde in keiner der 14 Monate alten Gruppen beobachtet. Nach der Fütterung konnten keine signifikanten Gedächtnisleistungen in der reinen Auswertung der Kontaktzeiten oder signifikanten Unterschiede zwischen den *Recognition*-Indexen der nun 3 Monate und 20 Monate alten Mäusen aller Gruppen festgestellt werden.

Ergebnisse

Tab. 4.10: Ergebnisse der Verhaltenstests in der Langzeitstudie mit Hy und Acy+Hy in C57BL/6J-Mäusen. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.26; Daten wurden unter Mithilfe von Madeleine Müller und Marta Borchiellini erhoben.

<i>Social Recognition</i>	1: Kontaktzeit S2 vs. S1 2: MW±SEM des <i>Recognition</i> -Index [%]			
	Jung	Alt	Alt Hy	Alt Acy + Hy
Basal	1: ↑*** 2: 65,9±4,2 ^a (n=13)	1: → 2: 55,2±4,7 (n=13)	1: → 2: 52,9±3,1 (n=14)	1: → 2: 52,9±3,2 (n=15)
Post	1: → 2: 50,6±5,5 (n=14)	1: → 2: 57,2±5,2 (n=13)	1: → 2: 46,9±3,3 (n=13)	1: → 2: 55,2±4,7 (n=15)
1-Trial-Y-Maze	MW±SEM der Alternationsrate [%]			
	Jung	Alt	Alt Hy	Alt Acy + Hy
Post	59,2±2,7 (n=15)	54,4±4,5 (n=14)	59,5±4,1 (n=14)	56,8±5,4 (n=13)
Lokomotorik (Y-Maze)	MW±SEM der Eintritte im 1-Trial-Y-Maze			
	Jung	Alt	Alt Hy	Alt Acy + Hy
Post	30,3±1,2 (n=15)	15,0±1,0*** (n=13)	15,9±1,2*** (n=14)	14,9±1,3*** (n=13)

S1: bekannte Maus, S2: unbekannte Maus, Kontaktzeit S2 vs. S1 ↑*** $p < 0,05$ (gepaarter t -Test): Erinnerungsleistung, →: keine Erinnerungsleistung, *Recognition*-Index [%]: [Kontaktzeit S2/(S1+S2)]*100; Alternation: Eintritt in alle drei Arme des *Y*-Mazes ohne wiederholten Besuch eines anderen Armes innerhalb der 5-minütigen Testphase, Alternationsrate: [Anzahl Alternationen/(Gesamteintritte-2)]*100; *** $p < 0,001$ vs. Jung, 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; ^a $p < 0,05$, one sample t -Test (vs. Zufallslevel 50 %)

Im 1-Trial *Y*-Maze-Test wiesen die 20 Monate alten Mäuse der Kontrollgruppe Alt mit einer Alternationsrate von 54,4 % die geringste räumliche Gedächtnisleistung (Tab. 4.10). Diese lag numerisch, aber nicht signifikant unter der Leistung der 3 Monate alten Gruppe Jung mit 59,2 %. Die 20 Monate alte Gruppe Alt Hy erreichte mit 59,5 % eine ähnlich hohe Alternationsrate wie die Gruppe Jung. Signifikante Effekte konnten jedoch weder zwischen den Altersgruppen noch zwischen den Fütterungsgruppen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte hinsichtlich der lokomotorischen Aktivität, ermittelt als die Gesamteintritte in die Arme des *Y*-Mazes, wie schon in der Studie mit Acy und HBE, eine signifikant höhere Aktivität der Gruppe Jung gegenüber den drei alten Gruppen festgestellt werden ($p < 0,001$). Die Fütterung mit Hy oder Acy+Hy hatte keinen Einfluss auf diese verminderte Aktivität.

Das Langzeitgedächtnis wurde mit Hilfe des *Passive Avoidance* Tests am Ende der Fütterungsperiode untersucht (Abb. 4.29). Die *Step-through latency* der Mäuse vor dem induzierten Schock wies keine signifikanten Unterschiede auf, lag jedoch höher als in den vorangegangenen Studien. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Tiere eine Woche zuvor schon einem

Passive Avoidance Test unterlagen, der zusätzlich die *Step-through latency* nach 30 s erfasste. Da dies jedoch zu einer deutlich verminderten *Step-through latency* in den post Tests führte, wurde der Test nach einer Woche mit dem üblichen Ablauf wiederholt. Die *Step-through latency* 24 h post nach dem zweiten Test zeigte in allen Gruppen eine signifikante Erhöhung und somit Gedächtnisleistung (Abb. 4.29). Die alten Gruppen wiesen ähnlich der Langzeitstudie mit Acy und HBE eine numerisch höhere Leistung gegenüber der Gruppe Jung auf.

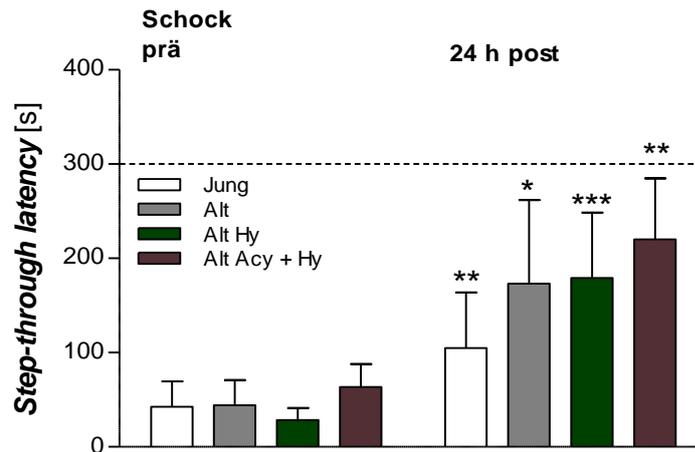


Abb. 4.29: *Step-through latency* im *Passive Avoidance* Test mit C57BL/6J-Mäusen nach 6-monatiger Fütterung mit Hy und Acy+Hy. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.26; dargestellt ist der Mittelwert der *Step-through latency* im *Passive Avoidance* Test \pm 95 % Konfidenzintervall von n=12-14 Männchen. Prä: vor dem Schock, 24 h post: 24 h nach dem Schock (0,2 mA); *Step-through latencies* von 300 s im post Test führen zum Abbruch und dem Maximalwert im Testergebnis; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. prä Wert, Wilcoxon matched-pairs signed rank Test; Hy: Fütterung mit 0,9 g Hy, Acy+Hy: Fütterung mit Hy in Kombination mit 2 g Acy; Daten wurden unter Mithilfe von Madeleine Müller erhoben.

4.3.2 ExGrape Res, Hytolive und *Enrichment* in NMRI-Mäusen

Aufgrund der mangelnden Konsistenz hinsichtlich der Erfassung einer mitochondrialen Dysfunktion bei den C57BL/6J-Mäusen in der respiratorischen Messung sowie der kognitiven Dysfunktion, sollte für weitere Untersuchungen auf einen anderen Mausstamm zurückgegriffen werden. Die NMRI-Maus wurde ausgewählt, da diese in vorherigen Versuchen konstante altersabhängige mitochondriale Dysfunktionen sowohl in dissoziierten Hirnzellen als auch in der Respirometrie gezeigt hatte. Weiterhin zeigten NMRI-Mäuse in vorangegangenen Verhaltensuntersuchungen eine geringere Variabilität gegenüber C57BL/6J-Mäusen. In Reaktion auf die nur moderaten Effekte von Acy und Hy wurde für folgende Untersuchungen eine Modifizierung des Extraktgemisches vorgenommen. Der anthocyanreiche Traubenextrakt Acy wurde durch die resveratrolreiche Variante Res ersetzt sowie die synthetische Reinsubstanz Hy durch Ol, ein natürlicher OMWW-Extrakt. Die beiden Extrakte wurden in einer Konzentration von 1,6 g

Res/1,6 g Ol in Futterpellets verpresst und über einen Zeitraum von 6 Monaten verfüttert. Zusätzlich zu der nutritiven Intervention sollte untersucht werden, inwieweit die zusätzliche Stimulierung über ein *Environmental Enrichment* inklusive eines Laufrads im Käfig altersbedingte kognitive und mitochondriale Dysfunktionen vermindern bzw. verhindern kann. Dazu erhielten je 12-16 Weibchen und 12-16 Männchen ab einem Alter von 12 Monaten eine alleinige Intervention mit Res+Ol (Alt RO) oder in Kombination mit *Enrichment* (Alt ROEn). Als Kontrollen dienten eine gleichaltrige Gruppe (Alt) und eine junge Gruppe aus je 10 Weibchen und 10 Männchen (Jung), die während der Interventionsphase Kontrollfutter ohne *Enrichment* erhielten. Da die Gruppe Jung zum Studienende ein Alter von 3 Monaten aufweisen sollte, wurde diese Gruppe in einem Alter von 1 Monat nach Ablauf der ersten vier Interventionsmonate in die Studie aufgenommen.

4.3.2.1 Überlebensrate und Gewichtsverlauf

Während der Interventionsphase kam es in den alten Gruppen zu einer für NMRI-Mäuse alters-typischen hohen Sterberate (Abb. 4.30). In der Kontrollgruppe Alt lag die Überlebensrate bei 60,7 %. Wird die Überlebenskurve in den Interventionsmonaten 4-6 mit denen der Gruppe Jung verglichen, unterschieden sich diese signifikant voneinander (Abb. 4.30A). In der Studien-gruppe Jung kam es, bis auf 1 Sterbefall infolge eines Rankampfes mit einem stark aggressiven Männchen, der aus der Auswertung ausgeschlossen wurde, zu keinem Sterbefall und somit zu einer Überlebensrate von 100 %. Die niedrigste Überlebensrate wies die Gruppe RO mit 44,4 % auf, ein signifikanter Unterschied zur Überlebenskurve der Gruppe Alt lag jedoch nicht vor (Abb. 4.30B). Mit 75,0 % wurde die höchste Überlebensrate der alten Gruppen in der Gruppe Alt ROEn beobachtet, die sich signifikant von der Alt RO-Gruppe ($p < 0,05$), nicht aber von der Gruppe Alt unterschied (Abb. 4.30B).

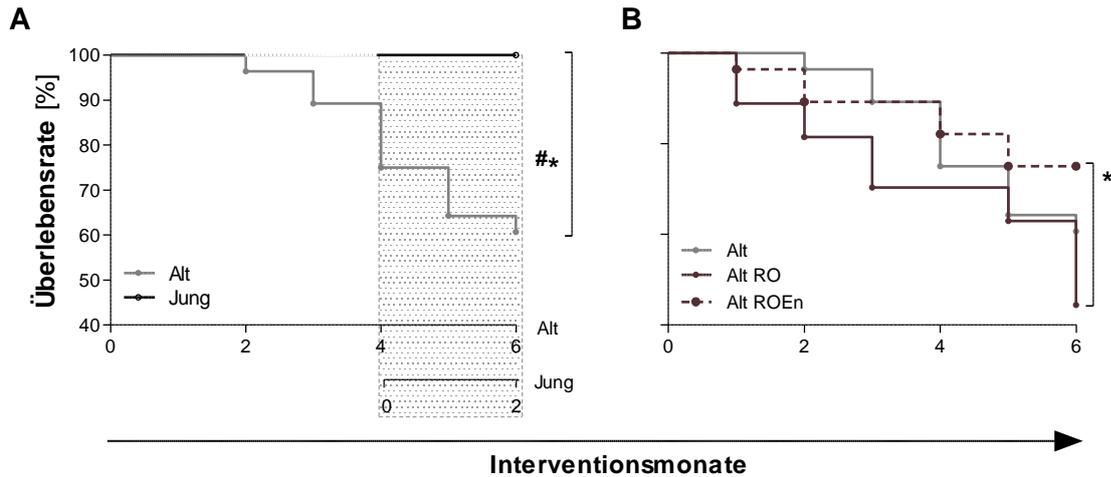


Abb. 4.30: Überlebensraten der NMRI-Mäuse über die 6-monatige Interventionsperiode mit RO und ROEn. 12 Monate alte NMRI Mäuse erhielten mit 1,6 g Res/1,6 g Ol angereicherte Futterpellets allein (Alt RO) oder in Kombination mit *Enrichment* (Alt ROEn) und wurden mit gleichaltrigen (Alt) sowie jungen Mäusen (Jung) verglichen, die Basisfutter und kein *Enrichment* erhielten; die Gruppe Jung wurde mit Ablauf des 4. Interventionsmonats hinzugezogen; dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven von n=27-29 in den alten Gruppen und n=20 in der jungen Gruppe bei Interventionsbeginn; $^{*}p < 0,05$, Vergleich der Überlebensrate von Gruppe Jung mit Gruppe Alt (ab 4. Monat, Ausgangswert der Gruppe Alt auf 100 % gesetzt) (A), Vergleich der Überlebensrate der drei alten Gruppen, $^{*}p < 0,05$ (B), Log-rank Test.

Der Verlauf des Körpergewichts der Tiere wies in den alten Gruppen über die Interventionsphase keine größeren Unterschiede auf (Abb. 4.31). In der Gruppe Alt und Alt RO konnte ab dem 4.-5. Interventionsmonat eine abnehmende Tendenz beobachtet werden. Die Gruppe Jung zeigte erwartungsgemäß eine Gewichtszunahme über die Interventionsphase.

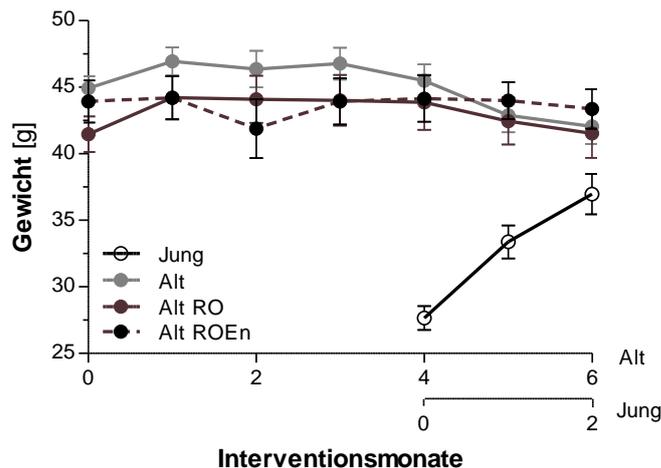


Abb. 4.31: Gewichtsverlauf der NMRI-Mäuse über die 6-monatige Interventionsperiode mit RO und ROEn. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.30; dargestellt sind Mittelwerte des Körpergewichts \pm SEM von n=27-29 Mäusen in den alten Gruppen bzw. n=20 in der jungen Gruppe bei Interventionsbeginn; die Gruppe Jung wurde mit Ablauf des 4. Interventionsmonats hinzugezogen.

4.3.2.2 Genexpression im Gehirn

Anhand von Genexpressionsanalysen im Hirnhomogenat der Mäuse sollte geklärt werden, inwieweit die Alterung bzw. die Intervention mit RO und ROEn einen Einfluss auf die Expression von Genen hat, die in Zusammenhang mit der mitochondrialen Funktion bzw. Hormesis stehen. Aufgrund einer beobachteten stärker ausgeprägten mitochondrialen Dysfunktion der Männchen, wurden die Genexpressionsanalysen auf den männlichen Teil der Studiengruppe beschränkt. Die Expressionsraten wurden jeweils relativ zur Gruppe Jung (100 %) angegeben. Hinsichtlich der mitochondrialen Atmungskomplexe wurden Komplex I (Untereinheit Ndufv1) und IV (Untereinheit Cox5A) untersucht.

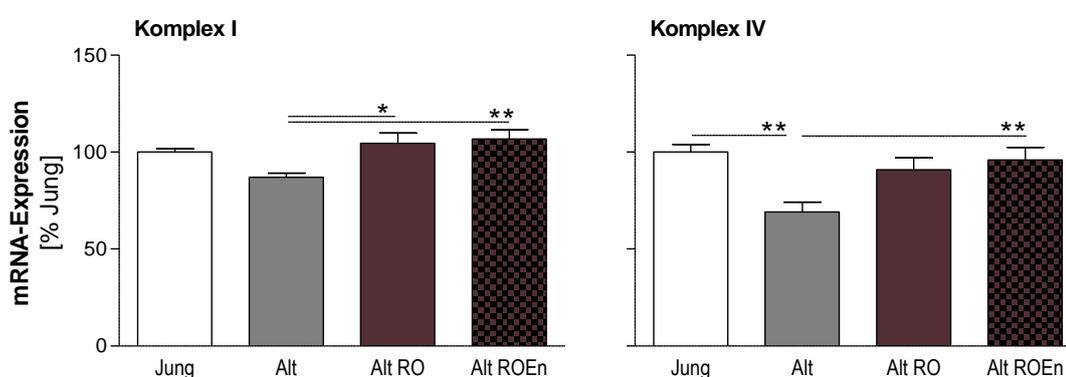


Abb. 4.32: mRNA-Expression von Komplex I und IV im Hirnhomogenat der NMRI-Mäuse nach 6-monatiger Interventionsperiode mit RO und ROEn. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.30; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der mRNA-Expression von $n=6-8$ männlichen Mäusen normiert auf die mRNA-Expression der Gruppe Jung (100 %) ermittelt durch qPCR; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test.

Eine signifikante Verminderung der Genexpression der Kontrollgruppe Alt gegenüber der Gruppe Jung wurde für Komplex IV nachgewiesen sowie eine numerische Verminderung für Komplex I (Abb. 4.32). Die Intervention mit RO und ROEn konnte diesem Alterseffekt entgegenwirken. Die RO- und ROEn-Gruppen zeigten mit 104,6 % und 106,9 % eine signifikant höher liegende Komplex I-Genexpression gegenüber der alten Kontrollgruppe ($p<0,01$). Die Komplex IV-Genexpression konnte gegenüber der Kontrollgruppe Alt (69,2 %) durch RO numerisch auf 90,9 % und durch ROEn signifikant ($p<0,01$) auf 96,0 % gesteigert werden.

Auch für PGC1 α , CREB, BDNF und Synaptophysin 1 wurde im Hirnhomogenat der alten Kontrollgruppe eine deutlich verminderte Genexpression gegenüber der Kontrollgruppe Jung festgestellt, die mit Ausnahme von BDNF signifikant war (Abb. 4.33). Dieser Alterseffekt konnte durch die Interventionen mit RO tendenziell und ROEn zum Teil signifikant verbessert bzw. aufgehoben werden. Für den Masterregulator PGC1 α fiel der Effekt am deutlichsten aus. Die

RO-Intervention konnte die Genexpression von 65,7 % in der Kontrollgruppe Alt numerisch auf 91,8 % erhöhen. Die Intervention mit ROEn führte zu einer Expression auf 126,1 % und einer signifikanten Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe Alt und der Gruppe Alt RO. Auch die verminderte CREB-Genexpression alter Tiere wurde durch die RO-Intervention numerisch von 61,2 % auf 82,3 % erhöht sowie durch die ROEn-Intervention signifikant auf 91,3 % angehoben. Eine ähnliche Tendenz konnte für BDNF gefunden werden, allerdings ohne Signifikanz. Keinen Einfluss hatte die RO- und ROEn-Intervention auf die altersbedingte Verminderung der Genexpression von Synaptophysin 1 (Abb. 4.33).

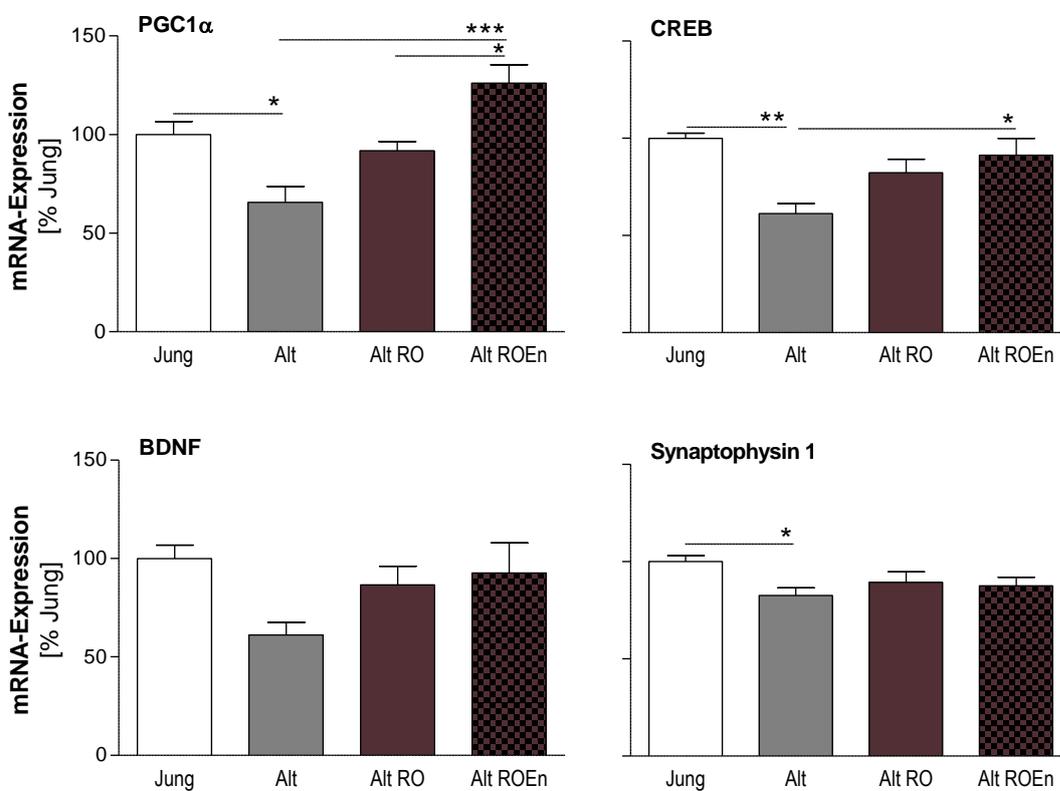


Abb. 4.33: mRNA-Expression von PGC1 α , CREB, BDNF und Synaptophysin 1 im Hirnhomogenat der NMRI-Mäuse nach 6-monatiger Interventionsperiode mit RO und ROEn. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.30; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der mRNA-Expression von n=6-8 männlichen Mäusen normiert auf die mRNA-Expression der Gruppe Jung (100 %) ermittelt durch qPCR; * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test.

Weder ein Alterungseffekt noch ein Effekt der Interventionen konnte hinsichtlich der Expression der mitogeneseassoziierten Gene Nrf1 und Tfam gefunden werden (Abb. 4.34).

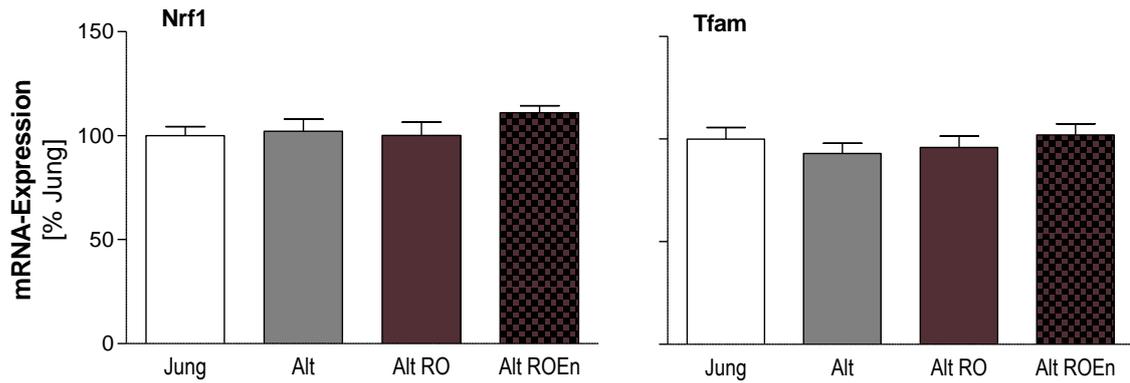


Abb. 4.34: mRNA-Expression Nrf1 und Tfam im Hirnhomogenat der NMRI-Mäuse nach 6-monatiger Interventionsperiode mit RO und ROEn. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.30; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der mRNA-Expression von n=6-8 männlichen Mäusen normiert auf die mRNA-Expression der Gruppe Jung (100 %) ermittelt durch qPCR.

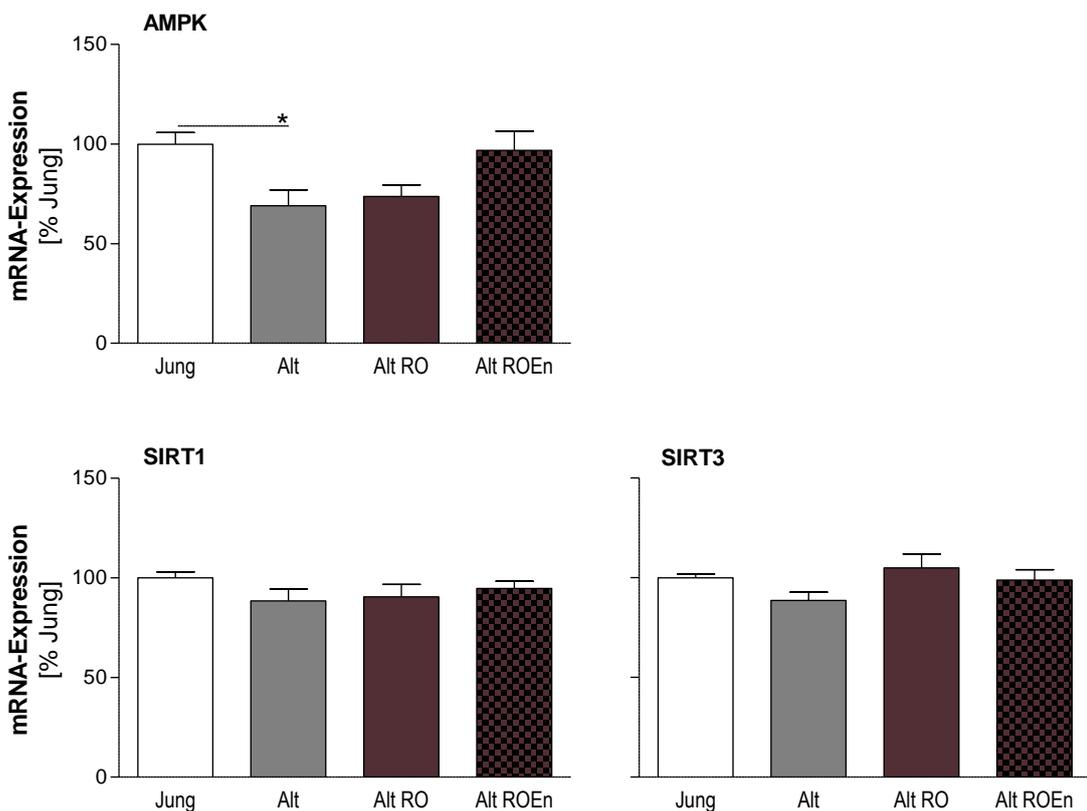


Abb. 4.35: mRNA-Expression von AMPK, SIRT1 und SIRT3 im Hirnhomogenat der NMRI-Mäuse nach 6-monatiger Interventionsperiode mit RO und ROEn. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.30; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der mRNA-Expression von n=6-8 männlichen Mäusen normiert auf die mRNA-Expression der Gruppe Jung (100 %) ermittelt durch qPCR; * p <0,05, 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test.

Eine altersbedingte Verminderung der Genexpression im Gehirn konnte weiterhin für AMPK nachgewiesen werden (p <0,05) und mit leichter Tendenz für die Sirtuine SIRT1 mit 88,4 %

und SIRT3 mit 88,5 % (Abb. 4.35). Die RO-Intervention konnte die SIRT3-Genexpression numerisch auf 104,8 % erhöhen. Die verminderte AMPK-Expression der alten Kontrollgruppe konnte durch die ROEn-Intervention numerisch auf 96,8 % erhöht werden. Auch die SIRT3-Expression stieg in der ROEn-Gruppe auf 98,8 % (Abb. 4.35).

Zusammenfassend zeigte sich somit hinsichtlich der Genexpression ein ausgeprägter Alterseffekt für viele Gene, die mit der mitochondrialen Funktion und Hormesis assoziiert sind. Die Intervention mit RO, und in stärkerem Ausmaß mit ROEn, konnte die erniedrigten Werte der alten Mäuse zum großen Teil vermindern bzw. sogar aufheben.

4.3.2.3 Mitochondriale Funktion im Gehirn

Inwieweit die beobachteten Effekte des Alters und der Intervention mit RO und ROEn auch auf Ebene der mitochondrialen Funktion widerspiegelt werden, sollte über die Messung des MMPs und der ATP-Spiegel in dissoziierten Hirnzellen der Tiere geklärt werden sowie mittels Respirometrie an isolierten Hirnmitochondrien (Abb. 4.36).

Eine numerisch deutliche Verminderung des MMPs konnte für die Kontrollgruppe Alt gegenüber der Gruppe Jung beobachtet werden. Die Intervention mit RO und in größerem Ausmaß die Intervention mit ROEn konnte diesen numerischen Rückgang tendenziell vermindern (Abb. 4.36A). Analog zum MMP wies die Kontrollgruppe Alt mit 1,6 nmol ATP/mg Protein gegenüber der Gruppe Jung mit 1,9 nmol ATP/mg Protein auch verminderte ATP-Konzentrationen in dissoziierten Hirnzellen auf (Abb. 4.36B). Die Gruppen Alt RO und Alt ROEn wiesen mit 1,7 und 1,8 nmol/mg Protein tendenziell aufsteigende ATP-Level auf. Signifikante Unterschiede der vier Gruppen konnten jedoch auch hier nicht ermittelt werden. Im geschlechtsspezifischen Vergleich zeigte sich, dass der tendenzielle Unterschied zwischen alten und jungen Tieren besonders auf die Männchen zurückzuführen ist, die in der Gruppe Jung mittlere ATP-Spiegel von 2,0 nmol/mg Protein im Vergleich zu 1,4 nmol/mg Protein in der Gruppe Alt aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Nach *ex vivo* Schädigung mit SNP zeigte sich eine Verminderung des MMPs und der ATP-Spiegel in allen Gruppen gegenüber dem Basalwert, der auf 100 % gesetzt wurde (Abb. 4.36). Für das MMP war diese Verminderung in der Gruppe Jung mit 77,7 % des Basalwerts signifikant stärker als in den alten Gruppen mit 82-84 %. Die Intervention hatte keinen Einfluss hinsichtlich der Reaktion auf die SNP-Schädigung. Die ATP-Spiegel nach SNP-Behandlung unterschieden sich in den vier Gruppen mit 77-83 % nicht signifikant voneinander.

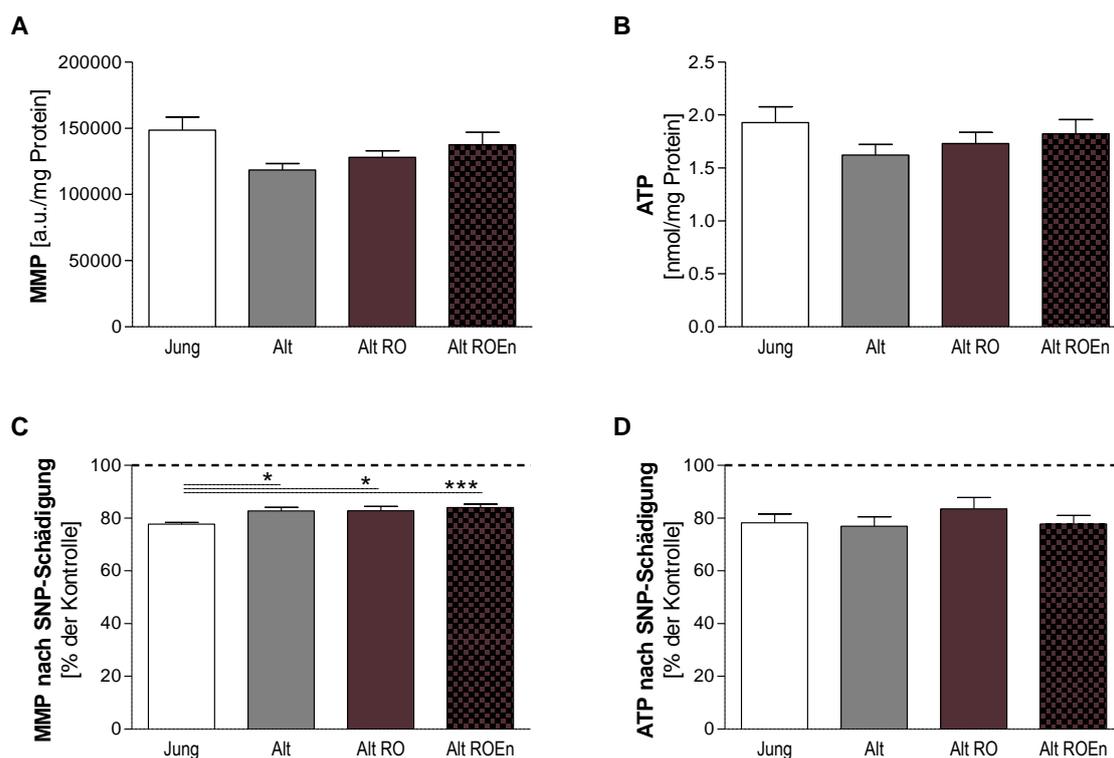


Abb. 4.36: MMP und ATP-Konzentrationen in dissoziierten Hirnzellen der NMRI-Mäuse nach 6-monatiger Interventionsperiode mit RO und ROEn. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.30; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM des MMPs (**A**) und der ATP-Konzentration (**B**) jeweils normiert auf mg Protein sowie Mittelwerte des MMPs nach 2 mM SNP-Schädigung (**C**) und der ATP-Konzentration nach 0,1 mM SNP-Schädigung (**D**), normiert auf den jeweiligen basalen Wert (100 %), von n=13-16 Tieren; * p <0,05, *** p <0,001, 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test.

Die detaillierte Untersuchung der Atmung in isolierten Hirnmitochondrien mittels Substraten, Entkopplern und Inhibitoren des Atmungssystems ließ eine signifikant verminderte proteinnormierte Komplex IV-Atmung in der Kontrollgruppe Alt gegenüber der Gruppe Jung erkennen (p <0,001, Abb. 4.37A). Dieser Effekt deckt sich mit der beobachteten signifikant geringeren Komplex IV-Genexpression. Ein Entgegenwirken dieses Alterseffekts durch die Intervention mit RO und ROEn, wie es für die Genexpression beschrieben wurde, konnte auf funktionaler Ebene nicht bestätigt werden. Alle 18 Monate alten Gruppen wiesen eine Komplex IV-Aktivität auf dem gleichen Niveau auf. Hinsichtlich der RCR, berechnet über den Quozienten (ETS-Atmung/Leak-Atmung nach Oligomycin-Zugabe), konnten keine Unterschiede zwischen alten und jungen Mäusen oder den Interventionen festgestellt werden (Abb. 4.37B). Auch die CS, als Marker für die mitochondriale Masse, wies in isolierten Hirnmitochondrien der vier Gruppen normiert auf den Proteingehalt keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich auf, mit Ausnahme der Gruppe Alt ROEn, die eine CS signifikant unterhalb der Gruppe Jung aufwies (p <0,05, Abb. 4.37C).

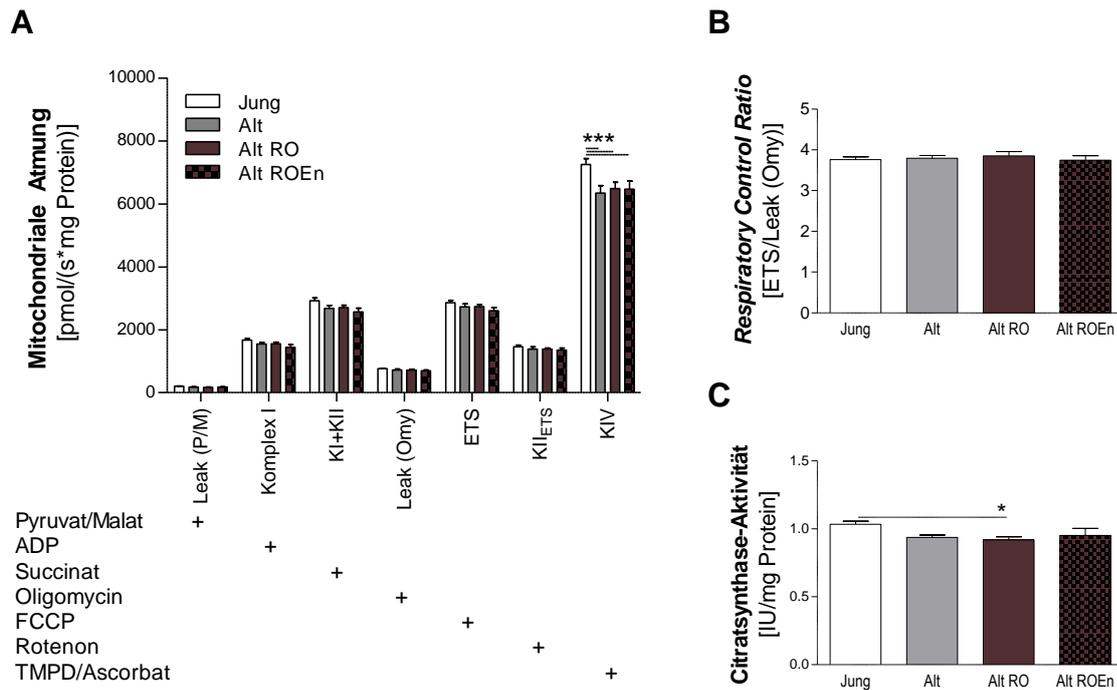


Abb. 4.37: Protein-normierte mitochondriale Atmung und CS isolierter Hirnmitochondrien der NMRI-Mäuse nach 6-monatiger Interventionsperiode mit RO und ROEn. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.30; dargestellt sind Mittelwerte der mitochondrialen Atmung im Oxygraph-2k nach Zugabe von Substraten, Inhibitoren und Entkopplern (gekennzeichnet mit +) normiert auf mg Protein (A), der *Respiratory Control Ratio* (RCR) berechnet aus Atmung von Komplex I+II/Leak nach Oligomycin-Zugabe (B) und Citratsynthase-Aktivität (CS) in *International Units* (IU) normiert auf mg Protein (C), n=14; *p<0,05, 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; ***p<0,001, 2-way ANOVA mit Bonferroni post Tests.

Generell lag eine höhere CS für die Gruppe Jung mit 1,03 IU/mg Protein gegenüber 0,92-0,95 IU/mg Protein in den 18 Monate alten Gruppen vor. Normiert auf die CS konnten keine Unterschiede in der mitochondrialen Atmung der vier Gruppen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt lässt sich sagen, dass die NMRI-Mäuse eine altersassoziierte mitochondriale Dysfunktion hinsichtlich der mitochondrialen Komplex IV-Aktivität zeigten, die sich in einer deutlichen Tendenz hin zu niedrigeren ATP-Spiegeln und MMP-Werten in dissoziierten Hirnzellen der Mäuse widerspiegelt. Der beobachtete Alterseffekt war für den männlichen Teil der beiden gemischten Gruppen ausgeprägter vorhanden und zeigte eine deutliche altersbedingte Verminderung der Expression mitochondrialer Gene. Die Interventionen mit RO und ROEn konnten entgegen der günstigen Beeinflussung auf Ebene der Genexpression keinen signifikanten Effekt auf die mitochondriale Funktion erzielen. Es wurde lediglich eine Tendenz hin zu höheren basalen ATP-Spiegeln und MMP-Werten gegenüber alten Kontrolltieren ermittelt.

4.3.2.4 Gedächtnisleistung und Motorik

In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, inwieweit alters- und interventionsbedingte Einflüsse in Verhaltenstests zur Gedächtnisleistung (*1-Trial* und *2-Trial-Y-Maze* und *Passive Avoidance*) und Motorik (*1-Trial-Y-Maze* und Rotarod) erfasst werden können. Mit Ausnahme des *Passive Avoidance* Tests, der alleinig nach der Interventionsphase stattfand, wurde die Leistung vor und nach der Interventionsphase untersucht. Die basale Leistung sollte neben einem basal-post Vergleich u.a. zur möglichst gleichen Leistungsverteilung in die Gruppen vor Interventionsbeginn dienen.

Die motorische Leistung der Mäuse wurde über die Anzahl der Eintritte im *1-Trial Y-Maze* und die Leistung auf dem Rotarod erfasst (Abb. 4.38). Die Gesamteintritte in die Arme während der 5-minütigen Testphase im *1-Trial-Y-Maze* können als Parameter für die lokomotorische Aktivität der Mäuse herangezogen werden. Hier zeigte sich vor Studienbeginn für die Auswertung aller Tiere (Basal gesamt) eine signifikant verminderte Aktivität der drei 12 Monate alten Gruppen gegenüber der Gruppe Jung mit einem Alter von 1 Monat sowie keine Unterschiede innerhalb der Gruppen (Abb. 4.38A). Bei alleiniger Betrachtung der Leistung der Mäuse, die bis zum Studienende überlebten und in die Endauswertung eingegangen sind (Basal), ist der signifikante Unterschied ebenso vorhanden, wobei sich hier eine leichte Tendenz zur höheren Aktivität in der RO- und ROEn-Gruppe ergibt. Nach der 6-monatigen Interventionsperiode ist weiterhin eine signifikant geringere lokomotorische Aktivität der nun 18 Monate alten Kontrollgruppe Alt gegenüber der 3 Monate alten Gruppe Jung festzustellen. Für die Gruppen Alt RO und ROEn lag hier kein signifikanter Unterschied vor.

Hinsichtlich der motorischen Leistung auf dem Rotarod konnte im Alter von 1 Monat für die jungen Mäuse eine signifikant höhere Leistung gegenüber derer der 12 Monate alten Mäuse insgesamt, nach Einteilung in ihre Gruppen sowie bei alleiniger Auswertung der überlebenden Mäuse festgestellt werden ($p < 0,001$) (Abb. 4.38B). Im Alter von 18 Monaten lag die Leistung der Kontrollgruppe Alt und Gruppe Alt RO weiterhin signifikant unterhalb der Leistung der Gruppe Jung. Alleinig die Gruppe Alt ROEn wies eine motorische Leistung auf, die sich nicht mehr signifikant von derer der 3 Monate alten Mäuse unterschied. Im basal-post Vergleich wird deutlich, dass die Alt ROEn-Gruppe mit 18 Monaten eine signifikant höhere Leistung zeigte als im Alter von 12 Monaten ($p < 0,001$). Dies traf auch für die Kontrollgruppe Alt zu, jedoch in geringerem Umfang ($p < 0,05$).

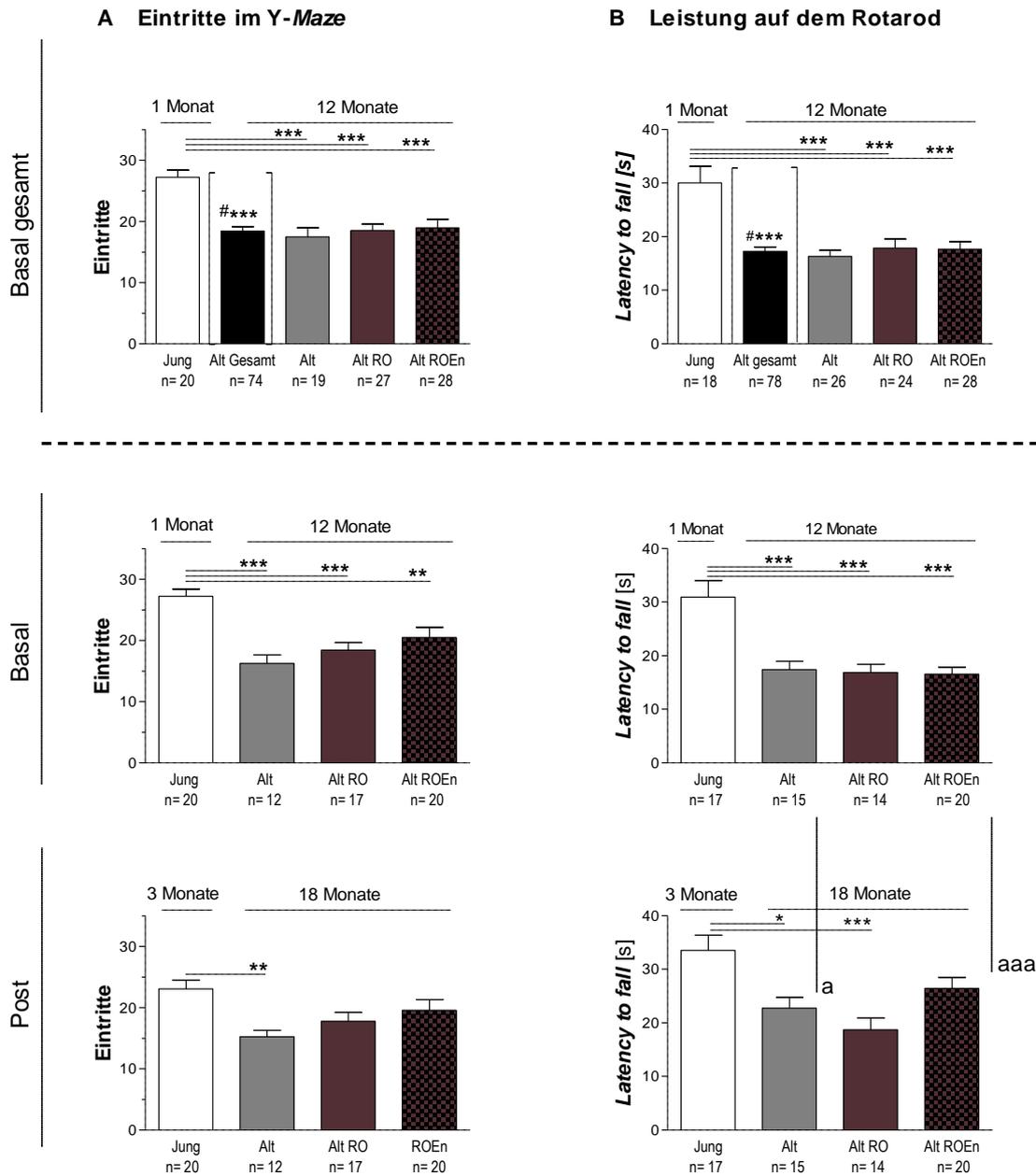


Abb. 4.38: Motorische Leistung von NMRI-Mäusen über die 6-monatige Interventionsperiode mit RO und ROEn. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.30; dargestellt sind Mittelwerte der Gesamteintritte im 1-Trial Y-Maze (A) und der Latency to fall auf dem Rotarod±SEM (B) von n=18-28 weiblichen und männlichen Mäusen vor Beginn der Studie (Basal), *** $p < 0,001$, 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; **** $p < 0,001$, ungepaarter t -Test gegenüber der Gruppe Jung; von n=14-20 in die Auswertung eingeschlossenen Tiere vor der Intervention (Basal) und nach der Intervention (Post), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test, ^a $p < 0,05$, ^{aaa} $p < 0,001$, gepaarter t -Test Basal vs. Post; RO: Intervention mit 1,6 g Res/1,6 g Ol angereicherten Futterpellets, ROEn: RO in Kombination mit Enrichment, Alt gesamt: alle Tiere im Alter von 12 Monaten vor der Einteilung in die Interventionsgruppen.

Das räumliche Gedächtnis wurde im 1-Trial und 2-Trial-Y-Maze untersucht (Abb. 4.39). Im 1-Trial-Y-Maze zeigten die 12 Monate alten Mäuse vor Studienbeginn (Basal gesamt) insgesamt mit einer spontanen Alternationsrate von 59,1 % gegenüber der Gruppe Jung im Alter von 1 Monat mit 65,2 % eine leicht, aber signifikant verminderte räumliche Gedächtnisleistung (Abb. 4.39A, $p < 0,05$). Dieser Unterschied war bei Einteilung der alten Gruppe in die Interventionsgruppen nicht mehr vorhanden. Bei Betrachtung der basalen Daten der Mäuse, die über die Interventionsphase überlebt haben (Basal) und somit auch in die Endauswertung miteingegangen sind, ergeben sich basal leichte, aber nicht signifikante Schwankungen in den alten Gruppen mit Alternationsraten von 56-63 % und der höchsten Leistung in der Gruppe Alt RO. Nach der Interventionsphase und somit im Alter von 18 Monaten (alte Gruppen) bzw. 3 Monaten (junge Gruppe) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Vergleicht man weiterhin die basale und post Leistung der einzelnen Gruppen miteinander, so sind keine signifikanten Veränderungen zu erkennen.

Im 2-Trial-Y-Maze zeigte die Gruppe Jung mit 58,4 % eine Diskriminierungsleistung die signifikant über dem Zufallslevel von 50 % lag ($p < 0,05$, one-sample t -Test) und somit als einzige Gruppe eine Erinnerungsleistung (Abb. 4.39B). Die Gruppe der 12 Monate alten Tiere insgesamt vor Studienbeginn lag mit 51,2 % nahe dem Zufallslevel. Ein signifikanter alt-jung Unterschied konnte nicht festgestellt werden. Nach Einteilung in die Interventionsgruppen schwankten die Diskriminierungsraten nicht signifikant. Eine leicht ungleiche Leistungsverteilung in den alten Gruppen mit einer tendenziell höheren Leistung der Kontrollgruppe Alt ergab sich in der Endauswertung der basalen Leistung nach Ausschluss der innerhalb der Interventionsphase gestorbenen Tiere (Basal). Nach der Interventionsphase zeigten die nun 3 Monate alten Mäuse der Gruppe Jung mit 58,3 % erneut eine signifikant erhöhte Leistung gegenüber dem Zufallslevel. Die alten Interventionsgruppen erreichten eine geringere Leistung, was besonders die Gruppe Alt ROEn mit 40,9 % betraf, dessen Leistung sich aber nicht signifikant vom Zufallslevel unterschied. Signifikante Unterschiede im Vergleich der post Leistungen der vier Gruppen oder im basal-post Vergleich und somit eine Beeinflussung durch die Intervention ergaben sich nicht.

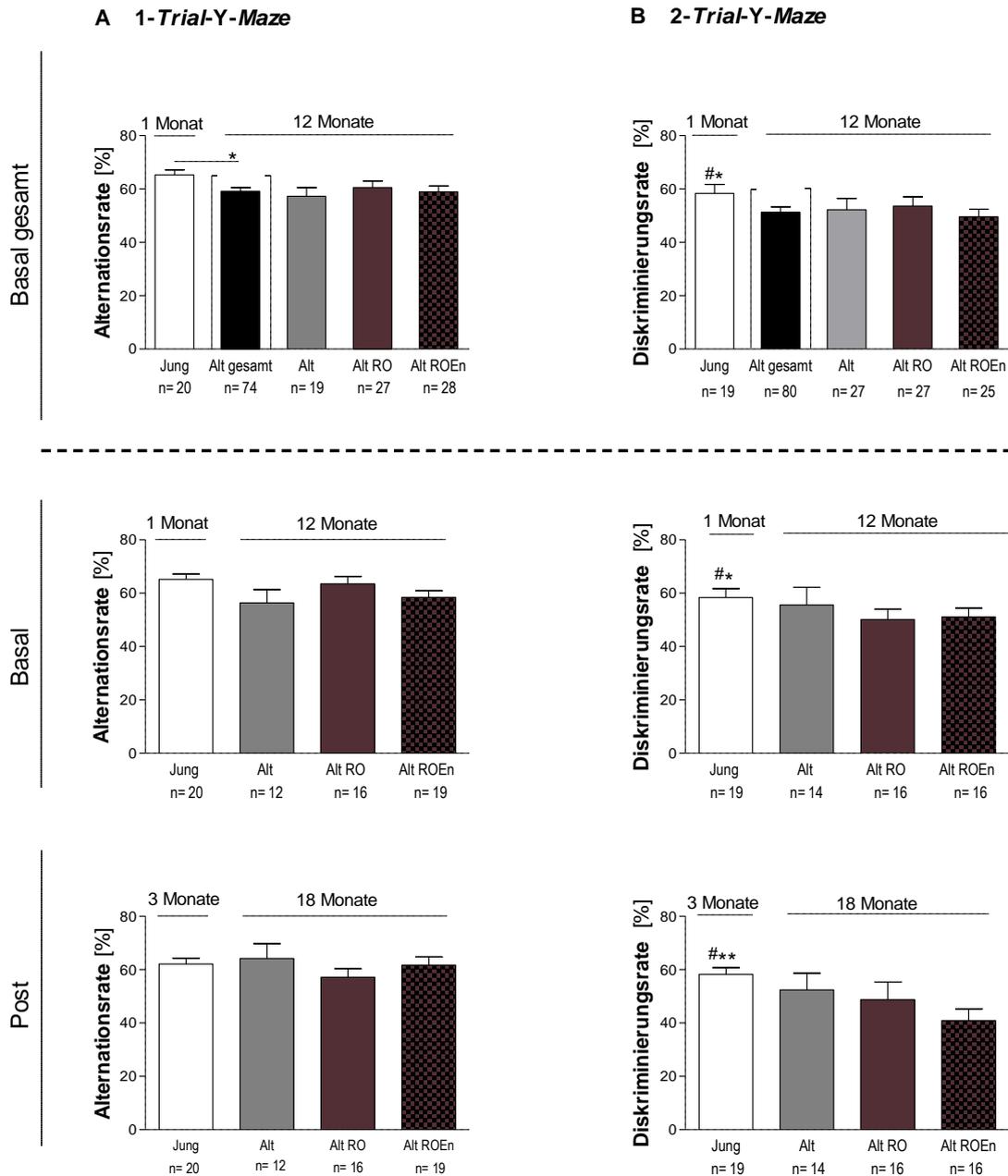


Abb. 4.39: Gedächtnisleistung im Y-Maze mit NMRI-Mäusen über die 6-monatige Interventionsperiode mit RO und ROEn. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.30; dargestellt sind Mittelwerte der Alternationsraten \pm SEM im 1-Trial-Y-Maze (A) und Diskriminierungsraten im 2-Trial-Y-Maze (B) von n= 19-28 weiblichen und männlichen Mäusen vor Beginn der Studie (Basal), n=12-20 in die Auswertung eingeschlossenen Tiere vor der Intervention (Basal) und nach der Intervention (Post), * $p < 0,05$ ungepaarter t -Test, ** $p < 0,05$ one-sample t -Test vs. 50 % Zufallslevel; Alternation: Eintritt in alle drei Arme des Y-Mazes ohne wiederholten Besuch eines anderen Armes, Alternationsrate: $[\text{Anzahl Alternationen} / (\text{Gesamteintritte} - 2)] * 100$; Diskriminierungsrate: $[\text{Aufenthaltszeit neuer Arm} / (\text{Aufenthaltszeit alter Arm} + \text{neuer Arm})] * 100$; RO: Intervention mit 1,6 g Res/1,6 g Ol angereicherten Futterpellets, ROEn: RO in Kombination mit Enrichment, Alt gesamt: alle Tiere im Alter von 18 Monaten vor der Einteilung in die Interventionsgruppen.

Das Langzeitgedächtnis wurde mit Hilfe des *Passive Avoidance* Tests am Ende der Interventionsperiode untersucht. Der Test wurde aufgrund des vergleichbar hohen Stresslevels am Ende der Verhaltenstestphase durchgeführt. Wie in Abb. 4.40 zu sehen ist, waren die mittleren Übertrittszeiten (*Step-through latency*) in die abgedunkelte Box vor dem Schock (prä) niedrig. Die Gruppe Alt wies gegenüber der Gruppe Jung eine signifikant höhere *Step-through latency* auf. Vierundzwanzig Stunden nach der Vermittlung des Schocks in Reaktion auf den Übertritt in die abgedunkelte Kammer, zeigten alle Gruppen eine signifikant längere Übertrittszeit gegenüber dem prä-Wert, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung. Die Gruppe Jung zeigte zusammen mit der Gruppe Alt RO eine im Vergleich mit der Gruppen Alt und Alt ROEn kürzere *Step-through latency*. Es zeigte sich somit keine bessere Erinnerungsleistung der Gruppe Jung. Zudem wies die Gruppe Alt RO gegenüber der Kontrollgruppe Alt eine signifikant kürzere *Step-through latency* auf.

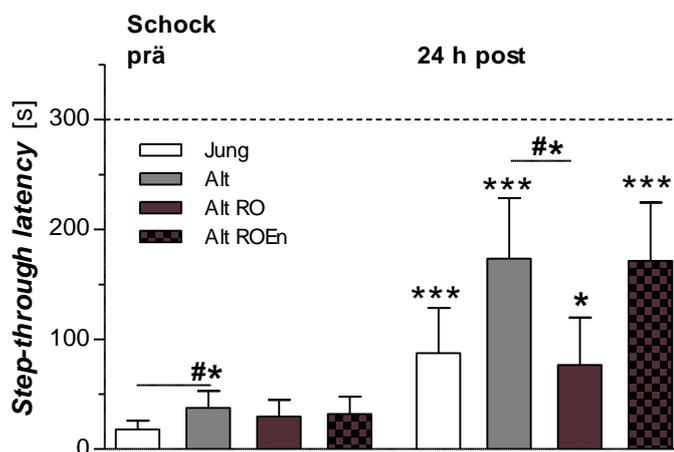


Abb. 4.40: *Step-through latency* im *Passive Avoidance* Test mit NMRI-Mäusen nach 6-monatiger Interventionsperiode mit RO und ROEn. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.30; dargestellt ist der Mittelwert der *Step-through latency* im *Passive Avoidance* Test \pm 95 % Konfidenzintervall von n=15-19 Männchen und Weibchen. Prä: vor dem Schock, 24 h post: 24 h nach dem Schock (0,5 mA); *Step-through latencies* von 300 s im *post* Test führen zum Abbruch und dem Maximalwert im Testergebnis; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. prä Wert, Wilcoxon matched-pairs signed rank Test; ** $p < 0,05$, Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Multiple Comparison Test; RO: Intervention mit 1,6 g Res/1,6 g Ol angereicherten Futterpellets, ROEn: RO in Kombination mit *Enrichment*.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Alterungseffekte in den Verhaltenstests in unterschiedlicher Ausprägung gefunden wurden. Eine deutlich verminderte Leistung konnte bei den motorischen Parametern (Rotaord und Eintritte im 1-Trial-Y-Maze) nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Gedächtnisleistung zeigten sich in beiden Y-Maze Tests geringere Unterschiede sowie im *Passive Avoidance* Test eine umgekehrte Tendenz. Die Interventionen mit RO und ROEn hatten insgesamt keinen signifikanten Einfluss. Im *Passive Avoidance* Test zeigte sich ein verschlechtertes Abschneiden nach RO-Intervention. Hinsichtlich des Ausmaßes des Effektes der

Alterung und der Interventionen lässt sich somit generell eine absteigende Tendenz in folgender Reihenfolge der untersuchten Parameter feststellen: Genexpression > mitochondriale Funktion > kognitive Funktion. Die motorische Leistung in der ein deutlicher Alterseffekt und ein leichter Effekt der Interventionen auftrat grenzt sich davon ab.

4.4 ExGrape Traubenextrakt und Olivenpolyphenole zur AD-Prävention

4.4.1 ExGrape Res, Hytolive und *Enrichment* im Thy-1-APP-Modell

Neben der Untersuchung des Effekts auf die Alterung wurde die Kombination aus Res, Ol und *Environmental Enrichment* in dem murinen AD-Modell Thy-1-APP₇₅₁SL untersucht. In diesem, auf dem C57BL/6 Mausstamm basierenden Modell, kommt es ab einem Alter von 3 Monaten zu erhöhten A β -Leveln und mitochondrialer Dysfunktion. Es sollte untersucht werden inwiefern eine 8-wöchige Intervention, bestehend aus Res+Ol angereicherten Futterpellets und *Enrichment*, Einfluss auf die mitochondriale Funktion und verschiedene Verhaltensparameter hat. Thy-1-APP transgene Mäuse (je 8-11 Männchen und Weibchen) erhielten entweder eine alleinige Intervention mit 1,6 g Res/1,6 g Ol in Futterpellets (APP RO) oder RO in Kombination mit verschiedenen *Enrichment*-Maßnahmen inklusive eines Laufrads als Aktivitätskomponente (APP ROEn). Als Kontrollgruppen dienten je 8-11 weibliche und männliche Thy-1-APP-transgene (APP) sowie Wildtyp- (Wt) Mäuse, die während der Interventionsphase Kontrollfutter ohne *Enrichment*-Maßnahmen erhielten.

4.4.1.1 Überlebensrate und Gewichtsverlauf

Innerhalb der 8-wöchigen Interventionsphase, die von Ende des 2. bis 4. Lebensmonats durchgeführt wurde, konnten unterschiedliche Überlebensraten festgestellt werden (Abb. 4.41A). Während in der Wt-Gruppe nach der Interventionsphase 100 % der Mäuse am Leben waren, wurde eine signifikant verminderte Überlebensrate von 73,7 % in der APP-Kontrollgruppe verzeichnet ($p < 0,05$). Die niedrigste Überlebensrate wurde jedoch für die Gruppe APP ROEn beobachtet, mit einer Überlebensrate von 60,0 %. Dieses ist vor allem auf den männlichen Teil der Studiengruppe zurückzuführen, in dem 37,5 % der Mäuse überlebten, verglichen mit 85,7 % der Weibchen (Abb. 4.41B). Die Überlebensrate der APP-Kontrollgruppe hingegen war bei den Männchen und Weibchen mit 81,8 % und 62,5 % Überlebenden ausgeglichener (Abb. 4.41B). Für Thy-1-APP-transgene Männchen wird im Allgemeinen ein höheres Aggressivitätspotenzial beobachtet, welches in der Gruppe APP ROEn während der Interventionsphase auffallend verstärkt auftrat. Eine hohe Sterberate der APP ROEn-Männchen durch vermehrte

Rangkämpfe und einen erhöhten Stresslevel in Folge der *Enrichment*-Maßnahmen kann somit nicht ausgeschlossen werden. Im Vergleich zu der APP ROEn-Gruppe zeigte die APP RO-Gruppe ohne *Enrichment* eine signifikant höhere Überlebensrate (Abb. 4.41A), die mit 94,1 % numerisch deutlich über der Überlebensrate der APP-Kontrollgruppe lag. Signifikante Unterschiede wurden weder gegenüber der APP-Kontrollgruppe noch gegenüber der Wt-Gruppe erreicht.

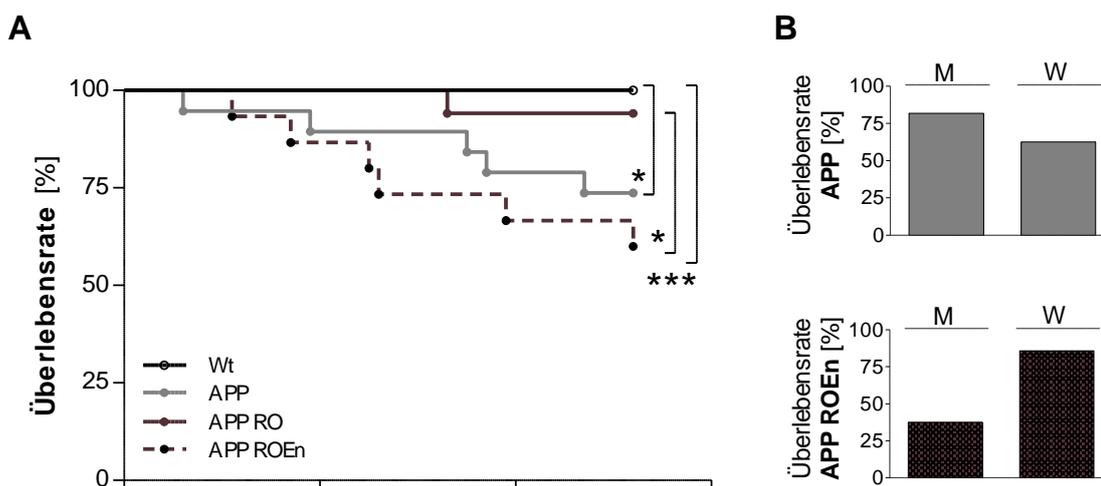


Abb. 4.41: Überlebensraten der Thy-1-APP-Mäuse über die 8-wöchige Interventionsperiode mit RO und ROEn. Thy-1-APP-transgene Mäuse erhielten zwischen Ende des 2. und 4. Lebensmonat mit 1,6 g Res/1,6 g Ol angereicherte Futterpellets allein (APP RO) oder in Kombination mit *Enrichment* (APP ROEn) und wurden mit APP transgenen Mäusen (APP) und Wildtyp Mäuse (Wt) verglichen, die Basisfutter und kein *Enrichment* erhielten; dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven von n=15-19 Mäusen bei Interventionsbeginn (A); Log-rank Test, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; (B) Überlebensraten [%] der Männchen (M) und Weibchen (W) in Gruppe APP und APP ROEn im Vergleich; Daten wurden unter Mithilfe von Carmina Schäfer erhoben.

Hinsichtlich des Gewichtsverlaufs zeigte sich in allen Gruppen eine Gewichtszunahme über die Interventionsperiode (Abb. 4.42). Beim Vergleich der Gruppen wird deutlich, dass die drei APP-transgenen Mausgruppen vor dem Beginn der Intervention ein signifikant niedrigeres Körpergewicht gegenüber der Wt-Gruppe aufwiesen. Dieser Unterschied verminderte sich im Zeitverlauf. Das niedrigste Gewicht innerhalb der Interventionsphase wurde in der APP ROEn-Gruppe beobachtet, das sich 2-3 Wochen nach Interventionsbeginn als einziges weiterhin signifikant von der Wt-Gruppe unterschied.

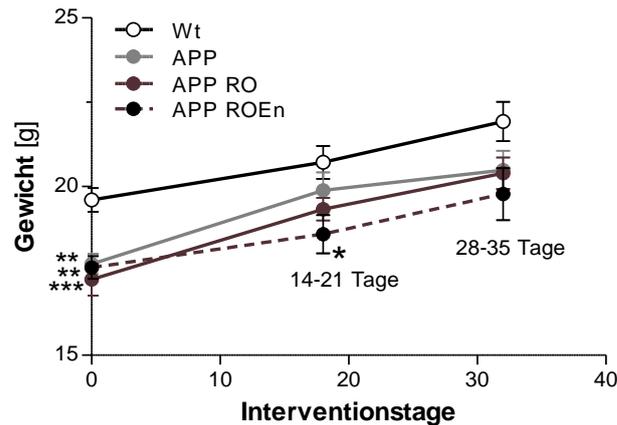


Abb. 4.42: Gewichtsverlauf der Thy-1-APP-Mäuse über die 8-wöchige Interventionsperiode mit RO und ROEn. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.41; dargestellt sind Mittelwerte des Körpergewichts \pm SEM von $n=15-19$ Mäusen bei Interventionsbeginn; * $p<0,05$ vs. Wt-Gruppe des jeweiligen Untersuchungszeitpunkts, 1-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test; Wt: Thy-1-APP-Wildtyp, APP: Thy-1-APP transgen, RO: Intervention mit 1,6 g Res/1,6 g Ol angereicherte Futterpellets, ROEn: RO in Kombination mit *Enrichment*; die Daten wurden unter Mithilfe von Carmina Schäfer erhoben.

4.4.1.2 Mitochondriale Funktion

Die mitochondriale Funktion wurde nach der Interventionsphase über das MMP und die ATP-Spiegel in dissoziierten Hirnzellen sowie über die Atmungsaktivitäten von isolierten Hirnmitochondrien im Oxygraphen-2k erfasst. Es sollte getestet werden, inwieweit die 8-wöchige RO- oder ROEn-Intervention mitochondriale Dysfunktionen in APP-transgenen Mäusen vermindern können. Die Untersuchung des MMPs und der ATP-Spiegel in dissoziierten Hirnzellen konnte allerdings im Vergleich zum Wt nicht die erwartete mitochondriale Dysfunktion bei APP-transgenen Mäusen erbringen. Im Vergleich zu den Wt-Mäusen zeigten transgene APP-Mäuse ein tendenziell höheres MMP sowie tendenziell höhere ATP-Level ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen (Abb. 4.43A und B). Die Intervention mit RO oder ROEn hatte keinen Einfluss auf das MMP oder die ATP-Spiegel. Die Schädigung der dissoziierten Hirnzellen mit dem Stressor SNP führte in allen Gruppen zu einem Abfall des MMP auf ca. 75 % und der ATP-Spiegel auf unter 40 % der basalen Werte (Abb. 4.43C und D). Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen lagen nicht vor.

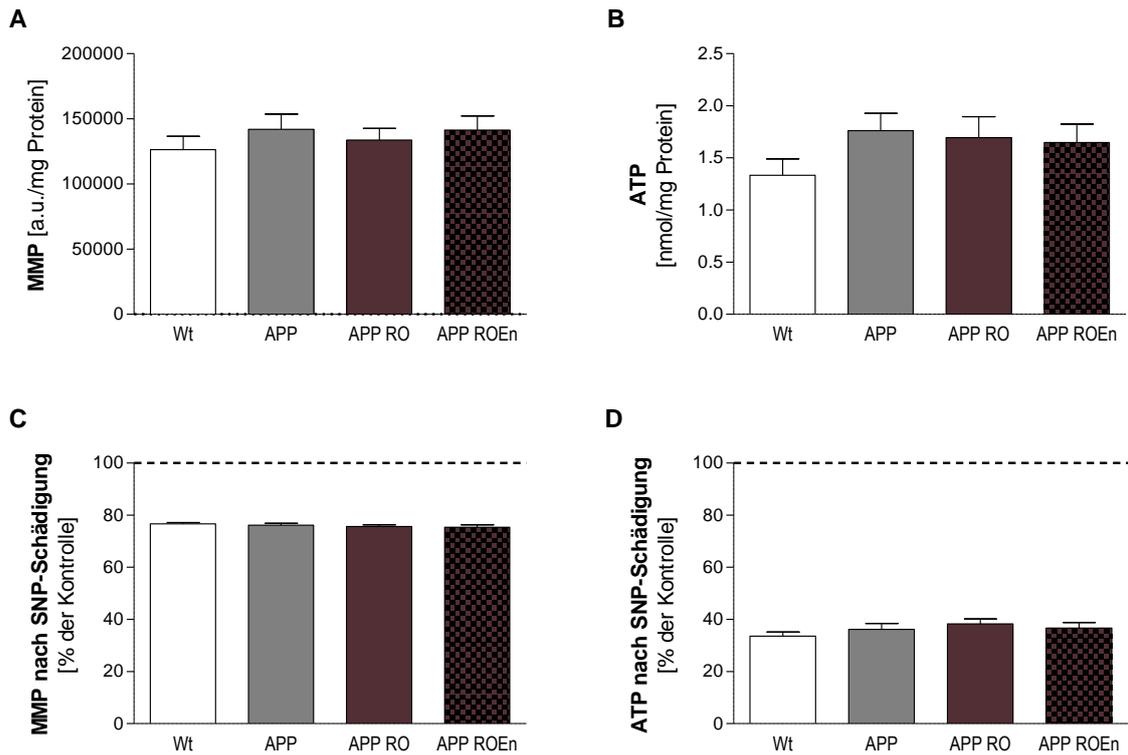


Abb. 4.43: MMP und ATP-Konzentrationen in dissoziierten Hirnzellen der Thy-1-APP-Mäuse nach 8-wöchiger Intervention mit RO und ROEn. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.41; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM des basalen mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) (A), der basalen ATP-Konzentrationen (B), jeweils normiert auf mg Protein, sowie Mittelwerte \pm SEM des MMP nach 2 mM SNP-Schädigung (C) und der ATP-Konzentration nach 0,5 mM SNP-Schädigung (D), normiert auf den jeweiligen basalen Wert (100 %), von n=14-15 Tieren für Wt, APP, APP RO und n=9 für APP ROEn; Daten wurden unter Mithilfe von Carmina Schäfer erhoben.

Auch die detaillierte Untersuchung der Atmung in der hochauflösenden Respirometrie konnte insgesamt keine Beeinträchtigungen der APP-transgenen Kontrollmäuse gegenüber dem Wt hervorbringen. Bei der Betrachtung des einzelnen Mitochondriums und somit Normierung der Atmungsaktivitäten auf die CS (Abb. 4.44A und B) wies die APP ROEn-Gruppe gegenüber den anderen Gruppen eine signifikant verminderte Komplex IV-Atmung auf ($p < 0,001$). Grund dafür, dass dieser Effekt bei den proteinnormierten Daten (nicht dargestellt) ausblieb, ist vermutlich eine leicht höhere mitochondriale Masse, die sich aus einer tendenziell erhöhten CS der APP ROEn-Gruppe ableiten lässt. Die RCR zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.44C).

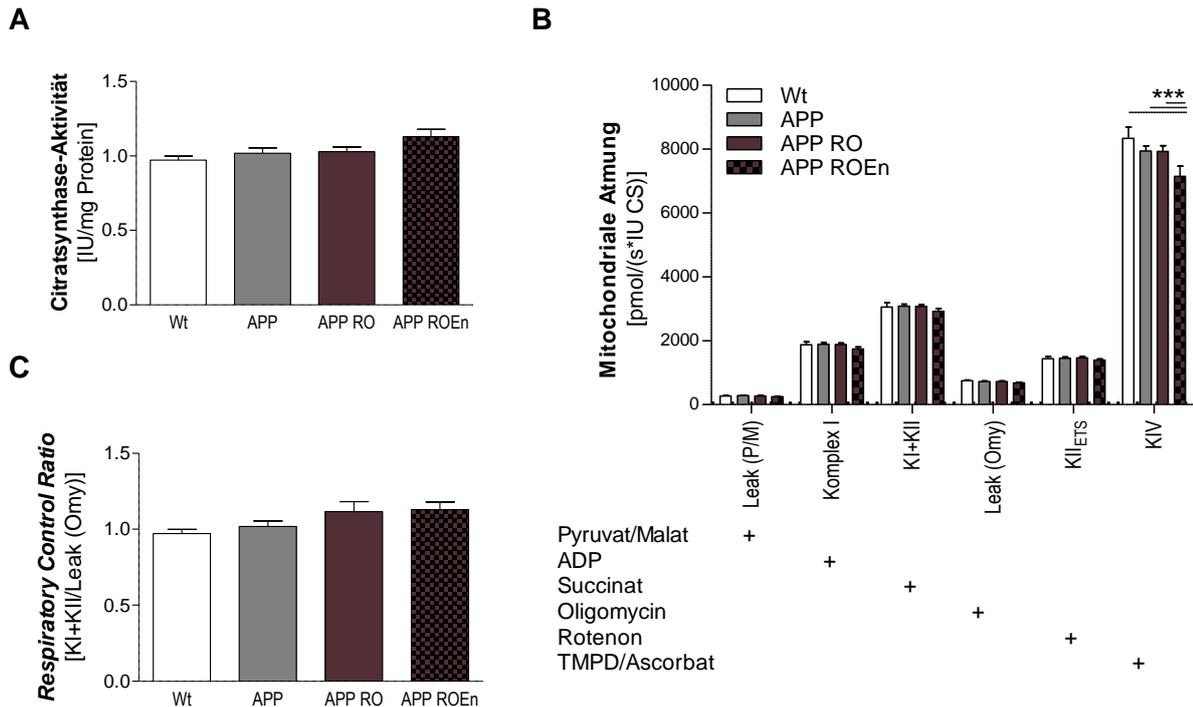


Abb. 4.44: CS und CS-normierte mitochondriale Atmung isolierter Hirnmitochondrien der Thy-1-APP-Mäuse nach 8-wöchiger Intervention mit RO und ROEn. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.41; dargestellt sind Mittelwerte der Citratsynthase-Aktivität (CS) in *International Units* (IU) (A), der mitochondrialen Atmung im Oxygraph-2k nach Zugabe von Substraten, Inhibitoren und Entkopplern (gekennzeichnet mit +) normiert auf International Units (IU) CS (B) und der *Respiratory Control Ratio* (RCR) berechnet aus Atmung von Komplex I+II/ Leak nach Oligomycin-Zugabe (C), von n=14 Tieren für Wt, APP, APP RO und n=9 Tieren für APP ROEn, *** $p < 0,001$, 2-way ANOVA mit Bonferroni post Tests; Daten wurden unter Mithilfe von Carmina Schäfer erhoben.

4.4.1.3 Verhaltensparameter

Mit den im Weiteren beschriebenen Ausnahmen wurden vor Beginn sowie zum Ende der Intervention Verhaltenstests an den Thy-1-APP-Mäusen durchgeführt. Zu den bereits beschriebenen Tests (1- und 2-Trial-Y-Maze, Passive Avoidance) wurden mit dem Nesting und dem Burrowing zwei weitere Tests eingeführt, die im transgenen Modell Aufschluss über die Beeinträchtigung von Alltagsaktivitäten geben sollten. Das Rotarod wurde aufgrund des hyperaktiven, stressanfälligen Charakters des transgenen Mausmodells als ungeeignet eingeschätzt. Ähnlich zu den Ergebnissen auf mitochondrialer Ebene konnte weder eine einheitliche Leistungsbeeinträchtigung hinsichtlich der untersuchten Verhaltensparameter im APP-Modell gegenüber dem Wt nachgewiesen werden noch ein Effekt der RO- oder ROEn-Intervention. Die Ergebnisse der Tests sind in Tab. 4.11 dargestellt. Die Leistungen sind analog zur Studie mit NMRI-Mäusen eingeteilt in die Leistung aller Tiere vor dem Beginn der Studie (Basal gesamt)

sowie die Leistung der in die Auswertung eingeschlossenen Tiere vor der Intervention (Basal) und nach der Intervention (Post).

Im *Nesting*-Test wurde über ein Punktesystem von 1-5 beurteilt, wie stark ein Nestlet aus Baumwolle, welches 1 h vor der Dunkelphase in den Käfig gelegt wurde, bis zum nächsten Morgen zum Nestbau genutzt wurde. Aufgrund der Aggressivität der Thy-1-APP-Männchen gegenüber Männchen eines anderen Käfigs, wurde der basale Test nur mit den Weibchen durchgeführt. Eine Zusammensetzung von Männchen nach der Einzelhaltung über Nacht hätte zu Rankämpfen mit Todesfolge führen können. Ein *Nesting-Score* von 1 bedeutet, dass > 90 % des Nestlets noch intakt und somit ungenutzt sind; ein *Nesting-Score* von 5 wird bei einem deutlichen Nestbau mit > 90 % Verwendung des Nestlets vergeben. Eine Beeinträchtigung der Leistung im *Nesting* Test konnte nur vor Studienbeginn für die Gesamtgruppe der Thy-1-APP-transgenen Mäuse (*Score* 3,1) gegenüber dem Wt (*Score* 4,4) festgestellt werden (Tab. 4.11, $p < 0,05$). Nach Einteilung in die Gruppen und Studienbeginn konnten keine Unterschiede zwischen den APP-transgenen Tieren und Wt Tieren ermittelt werden. Weiterhin konnte kein Effekt für die RO- und ROEn-Intervention beobachtet werden. Dies bezog sich für die Post-Auswertung sowohl auf die Weibchen als auch auf die gemischte Gruppe inklusive den Männchen, die nach der Interventionsphase in den Test aufgenommen wurden.

Mit dem *Burrowing*-Test sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß die definierte Menge von 200 g zerkleinerter Futterpellets über Nacht aus einer im Käfig platzierten Röhre geräumt wird. Die Mäuse wurden dafür 3 h vor der Dunkelphase einzeln in einen Käfig mit der bestückten Röhre gesetzt. Am nächsten Morgen wurde die Futtermenge ausgewogen, die über Nacht aus der Röhre entnommen wurde. Der Test wurde basal analog zum *Nesting* aufgrund der erforderlichen Einzelsetzung der Mäuse nur mit den Weibchen durchgeführt. Im *Burrowing* Test konnte vor sowie nach der Intervention keine Beeinträchtigung der APP-transgenen Tiere gegenüber dem Wt festgestellt werden. Dies bezog sich für die Post-Auswertung sowohl auf die Weibchen als auch auf die gemischte Gruppe inklusive der Männchen, die nach der Interventionsphase in den Test aufgenommen wurden. Auch die RO- und ROEn-Interventionen blieben ohne signifikanten Effekt.

Im *Y-Maze* zeigten Thy-1-APP-transgene Tiere insgesamt tendenziell mehr Eintritte und somit eine höhere lokomotorische als Wt-Tiere. Diese Beobachtung deckt sich mit der generell nervösen Natur der APP-Mäuse.

Ergebnisse

Tab. 4.11: Ergebnisse der Verhaltenstests mit Thy-1-APP-Mäusen bei RO und ROEn-Intervention. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.41, dargestellt sind Mittelwerte±SEM der Leistungen aller Tiere vor dem Beginn der Studie (Basal gesamt) sowie in die Auswertung eingeschlossenen Tiere vor der Intervention (Basal) und nach der Intervention (Post).

Nesting^b					
MW (95 % KI) des Nesting-Scores (Nesting Score 1: > 90 % intaktes Nestlet, 5: > 90 % in ein Nest umgebautes Nestlet)					
	Wt	APP gesamt	APP	APP RO	APP ROEn
Basal gesamt ♀	4,4 (3,9-4,9) (n=8)	3,1 (2,6-3,6)* (n=24)	3,0 (2,0-4,1) (n=8)	3,1 (2,2-4,0) (n=8)	3,2 (1,9-4,4) (n=8)
Basal ♀	4,4 (3,9-4,9) (n=8)		3,2 (1,6-4,7) (n=5)	2,9 (1,9-3,8) (n=7)	3,3 (1,6-5,1) (n=6)
Post ♀	3,6 (2,9-4,2)^a (n=8)		4,2 (3,1-5,3) (n=5)	2,9 (1,9-4,0) (n=7)	2,8 (1,5-4,2) (n=6)
Post ♀+♂	3,6 (3,2-4,0) (n=17)		3,4 (2,6-4,1) (n=14)	2,8 (2,1-3,6) (n=16)	3,4 (2,1-4,6) (n=8)
Burrowing^b					
MW (95 % KI) der entnommenen Futtermenge					
	Wt	APP gesamt	APP	APP RO	APP ROEn
Basal gesamt ♀	24,9 (15,4-34,4) (n=9)	29,4 (22,9-35,9) (n=23)	28,3 (15,2-41,3) (n=8)	31,3 (19,7-42,9) (n=7)	28,9 (13,5-44,2) (n=8)
Basal ♀	24,9 (15,4-34,4) (n=9)		26,6 (10,4-42,8) (n=5)	33,5 (20,8-46,3) (n=6)	34,0 (14,5-53,5) (n=6)
Post ♀	37,1 (10,9-63,5) (n=6)		27,6 (10,8-44,4) (n=5)	20,7 (13,9-27,5) (n=7)	18,0 (9,6-26,4) (n=6)
Post ♀+♂	39,5 (18,7-60,3) (n=18)		21,1 (13,8-28,4) (n=14)	23,3 (17,4-29,2) (n=16)	17,8 (11,7-23,8) (n=8)
Lokomotorik^b					
MW±SEM der Eintritte im 1-Trial-Y-Maze					
	Wt	APP gesamt	APP	APP RO	APP ROEn
Basal gesamt	16,7±1,5 (n=18)	18,8±1,0 (n=48)	20,3±1,4 (n=19)	20,3±1,4 (n=19)	17,5±2,2 (n=14)
Basal	16,7±1,5 (n=18)		20,1±1,3 (n=15)	18,4±1,9 (n=14)	17,8±3,1 (n=10)
Post	10,6±1,0^{aaa} (n=18)		14,0±1,7^{aa} (n=15)	12,5±1,9^a (n=14)	12,3±2,1 (n=10)
1-Trial-Y-Maze^b					
MW±SEM der spontanen Alternationsrate					
	Wt	APP gesamt	APP	APP RO	APP ROEn
Basal gesamt	62,1±4,0 (n=18)	59,9±2,1 (n=46)	62,7±2,9 (n=18)	54,1±4,4 (n=15)	62,8±3,4 (n=13)
Basal	61,2±4,1 (n=17)		62,5±3,1 (n=14)	53,2±4,3 (n=13)	63,7±4,5 (n=9)
Post	74,1±3,5^a (n=17)		64,4±5,5 (n=14)	68,3±3,8^a (n=13)	62,5±3,8 (n=9)
2-Trial-Y-Maze^b					
MW±SEM der Diskriminierungsrate					
	Wt	APP gesamt	APP	APP RO	APP ROEn
Basal gesamt	47,5±6,8 (n=17)	48,3±4,3 (n=43)	48,6±7,1 (n=17)	48,4±7,7 (n=14)	47,6±8,4 (n=12)
Basal	51,7±7,4 (n=14)		53,1±8,3 (n=13)	48,4±7,7 (n=14)	46,4±11,0 (n=6)
Post	36,6±7,1 (n=14)		60,3±9,4 (n=13)	45,7±8,2 (n=14)	32,5±14,2 (n=16)

Ergebnisse

<i>Passive Avoidance</i>	MW (95 % KI) der <i>Step-through latency</i>				
	Wt		APP	APP RO	APP ROEn
Prä	28,4 (15,7-41,2) (n=16)		23,1 (13,9-32,3) (n=14)	33,0 (19,9-46,2) (n=16)	14,7 (9,1-20,3) (n=10)
Post	166,2 (102,8-229,6) (n=16) ^{###}		92,3 (26,5-158,1) ^{###} (n=14)	78,2 (25,7-130,7) (n=16)	104,3 (23,8-184,9) ^{###} (n=10)

Wt: Thy-1-APP Wildtyp, APP: Thy-1-APP transgen, RO: Intervention mit 1,6 g Res/1,6 g Ol angereicherten Futtermitteln, ROEn: RO in Kombination mit *Enrichment*; * $p < 0,01$ vs. Wt, Mann Whitney Test, ^a $p < 0,05$, ^{aa} $p < 0,01$, ^{aaa} $p < 0,001$ post vs. basal, gepaarter *t*-Test (Wilcoxon matched-pairs signed rank Test beim *Nesting Test*), ^{##} $p < 0,01$, ^{###} $p < 0,001$ prä vs. post, Wilcoxon matched-pairs signed rank test, ^bDaten wurden unter Mithilfe von Carmina Schäfer erhoben.

Über die Interventionsphase nahm die lokomotorische Aktivität in allen Gruppen signifikant ab, mit Ausnahme der APP ROEn-Gruppe mit einer lediglich numerischen Abnahme. Gemessen anhand der Alternations- und Diskriminierungsdaten im 1-Trial und 2-Trial-Y-Maze konnten keine Unterschiede zwischen dem Wt und den APP-transgenen Mäusen hinsichtlich des räumlichen Gedächtnisses nachgewiesen werden. Auch die RO- und ROEn-Intervention blieben ohne Effekt. Es zeigte sich lediglich eine signifikante Verbesserung der Alternationsrate der Wt- und RO-Gruppe über die Interventionsphase, die jedoch zu keiner signifikant besseren Leistung gegenüber den anderen Gruppen führte.

Das Langzeitgedächtnis wurde mit Hilfe des *Passive Avoidance* Tests am Ende der Interventionsperiode untersucht. Hinsichtlich der Übertrittszeit in die dunkle Box (*Step-through latency*) vor der Vermittlung des Schocks (prä) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen ermittelt (Abb. 4.45). Vierundzwanzig Stunden nach dem Schock (24 h post) zeigte sich in allen Gruppen, außer der RO-Gruppe, eine signifikant längere *Step-through latency*, die auf eine Erinnerung an den Schock hinweist. Ein deutlicher Trend für eine höhere *Step-through latency* und somit für ein stärkeres Erinnerungsvermögen wurde für die Wt-Gruppe gegenüber den transgenen APP-Gruppen beobachtet. Signifikante Unterschiede wurden innerhalb der Interventionsgruppen auch 24 h post nicht gefunden.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass das untersuchte AD-Modell Thy-1-APP₇₅₁SL in der vorliegenden Arbeit keine mitochondriale oder eindeutige kognitive Dysfunktion und somit keinen Nutzen für die zu untersuchenden Fragestellungen zeigen konnte. Ungeachtet der fehlenden Dysfunktionen hatte die Intervention mit RO und ROEn keinen eindeutigen Einfluss auf die untersuchten Parameter.

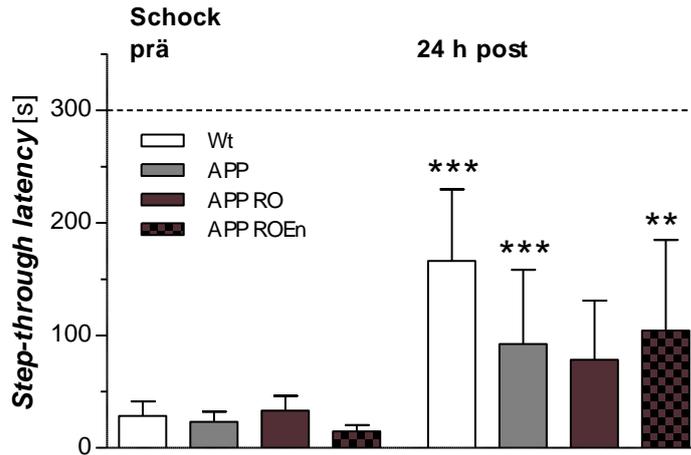


Abb. 4.45: Step-through latency im Passive Avoidance Test mit Thy-1-APP-Mäusen nach 8-wöchiger Interventionsperiode mit RO und ROEn. Die nähere Beschreibung des Studiendesigns erfolgt in Abb. 4.41; dargestellt ist der Mittelwert der Step-through latency im Passive Avoidance Test \pm 95 % Konfidenzintervall von n=10-16 Männchen und Weibchen. Prä: vor dem Schock, 24 h post: 24 h nach dem Schock (0,5 mA); Step-through latencies von 300 s im post Test führen zum Abbruch und dem Maximalwert im Testergebnis; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. prä Wert, Wilcoxon matched-pairs signed rank Test; Wt: Thy-1-APP Wildtyp, APP: Thy-1-APP transgen, RO: Intervention mit 1,6 g Res/1,6 g Ol angereicherte Futterpellets, ROEn: RO in Kombination mit Enrichment; Daten wurden unter Mithilfe von Carmina Schäfer erhoben.

5 Diskussion

5.1 Mitochondriale Dysfunktion im Zellmodell PC12

Die Untersuchung der Effekte von TOP erfolgte in der vorliegenden Arbeit zunächst in PC12-Zellen, die einem adrenalen Phäochromozytom der Ratte entstammen (Greene und Tischler 1976). Die kontinuierliche PC12-Zelllinie ist ein gut charakterisiertes neuronales Modell, welches seit langem Einsatz in Forschungsfeldern wie der neuronalen Differenzierung und Neurosekretion sowie pharmakologischen Therapie der Neurodegeneration findet (Eaton and Duplan 2004; Westerink and Ewing 2008). PC12-Zellen wurden weiterhin in einer Reihe von Studien im Zusammenhang mit der mitochondrialen Dysfunktion untersucht (Schaffer et al. 2010; Hagl et al. 2014; Hagl et al. 2015c; Keil et al. 2004b, 2004b). Mit den PC12_{sw}-Zellen existiert darüber hinaus ein abgeleitetes AD-Modell, welches über eine schwedische Doppelmutation des APP-Gens verfügt. PC12_{sw}-Zellen weisen mit einer Produktion relativ geringer Mengen von A β ein Modell der frühen AD dar. Weiterhin sind PC12_{sw}-Zellen durch einen gestörten Energiemetabolismus mit erniedrigten ATP-Konzentrationen und einer geringeren endogenen mitochondrialen Atmung gekennzeichnet. Ein Kompensationsmechanismus dieser Beeinträchtigungen über eine erhöhte mitochondriale Biogenese wird vorgeschlagen, der unabhängig von dem Masterregulator PGC1 α zu sein scheint (Hagl et al. 2015c). Neben der MD weisen PC12_{sw}-Zellen eine erhöhte NO-Produktion auf, in die vermutlich die erhöhten A β -Level involviert sind (Keil et al. 2004a).

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den PC12_{sw}-Zellen als AD-Modell, PC12_{neo}-Zellen eingesetzt. Diese Zellen enthalten, wie das AD-Modell, eine Neomycin-Resistenz, jedoch nicht die schwedische Doppelmutation. In PC12_{neo}-Zellen sollten die Effekte von TOP auf gesteigerten oxidativen und nitrosativen Stress untersucht werden, der bei der Alterung des Gehirns auftritt. Dazu wurden die Zellen mit SNP behandelt. SNP ist ein oft eingesetzter NO-Donor, der entweder direkt durch die Freisetzung von NO oder über die Bildung von ONOO⁻ zellschädigende Effekte induzieren kann (Eckert et al. 2010; Schaffer et al. 2007). NO ist ein wichtiger physiologischer Regulator, der jedoch in hohen Mengen über zahlreiche Mechanismen zytotoxisch wirken kann. So wird für NO eine Verminderung der mitochondrialen Atmung, insbesondere der Aktivität von Komplex IV beschrieben. NO kann weiterhin mit O₂⁻ zu dem starken Oxidanz ONOO⁻ reagieren (Kapitel 1.2.1.3) und so zu oxidativen Schädigungen und weiteren Beeinträchtigungen der mitochondrialen Funktion führen (Brown 1999). Es ist jedoch unklar, ob die Funktion als NO-Donor der einzige Mechanismus ist, durch welchen SNP seine zellschädigenden Effekte vermittelt. SNP ist ein Komplex mit der Summenformel

$\text{Na}_2(\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}) \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, der zu weiteren toxischen Produkten zerfallen kann. Zu diesen Produkten gehört Cyanid, das ebenfalls einen Inhibitor des mitochondrialen Komplex IV darstellt. Weiterhin kann das enthaltene Fe^{2+} durch die Bildung von ROS zu oxidativem Stress führen (Huitema et al. 2006; Terwel et al. 2000; Schaffer et al. 2010).

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde durch die SNP-Behandlung sowohl in PC12_{neo} -Zellen als auch in PC12_{sw} -Zellen eine ausgeprägte mitochondriale Dysfunktion mit einem verminderten MMP und reduzierten ATP-Konzentrationen erreicht. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Untersuchungen in PC12-Zellen (Keil et al. 2004b; Hagl et al. 2015c; Hagl et al. 2015a) und anderen Zelllinien (Pohland et al. 2016). Weiterhin führte die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte SNP-Behandlung in PC12_{neo} -Zellen zu einer Steigerung der Konzentration an Proteincarbonylen. Carbonylgruppen entstehen an Proteinseitenketten, wenn diese oxidiert werden. Proteincarbonyle sind somit ein Biomarker für oxidativen Stress (Dalle-Donne et al. 2003). Eine Akkumulation von Proteincarbonylen wurde im Gehirn gealterter Menschen genauso wie bei AD-Patienten beobachtet (Smith et al. 1991). Die SNP-Behandlung ($150 \mu\text{M}$) steigerte die Proteincarbonylkonzentration der PC12_{neo} -Zellen auf fast 200 % der unbehandelten Kontrolle. Diese Daten stimmen mit weiteren Studien in PC12-Zellen überein, in denen SNP eine Verminderung des MMPs sowie ein erhöhtes Ausmaß an Oxidationen induzierte (Zheng et al. 2016) sowie die intrazellulären ROS-Level bei vergleichbaren Konzentrationen verdoppelte (Romero et al. 2010).

PC12-Zellen können somit als geeignetes Modell für erste Untersuchungen zu den Effekten von Polyphenolen auf die Gehirnalterung und AD angesehen werden. Vor dem Hintergrund, dass es sich bei dem PC12-Zellmodell um murine Phäochromozytom-Zellen handelt, wäre weiterhin der Einsatz einer humanen neuronalen Zelllinie von Interesse. Auf Grundlage der SH-SY5Y-Zelllinie wurde beispielsweise ein geeignetes Modell der frühen Phase einer LOAD etabliert, das von MD geprägt ist (Stockburger et al. 2014). Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass es sich bei diesen immortalisierten Zelllinien um Tumorzelllinien handelt, die sich folglich in ihrem Verhalten von normalen Zellen unterscheiden können. In weiterführenden Experimenten könnten beispielsweise Untersuchungen an primären Neuronen weiteren Aufschluss liefern. Da Zellen jedoch nie den gesamten Organismus – einschließlich der Stoffwechselprozesse von TOP – darstellen können, ist der Einsatz eines Tiermodells ein nächster logischer Schritt.

5.2 Mitochondriale Dysfunktion im Mausmodell

Im Mausmodell sollte vorrangig untersucht werden, welchen Einfluss die Aufnahme von TOP bei der Gehirnalterung und der AD auf die mitochondriale Dysfunktion nehmen kann. Die Identifizierung altersbedingter Veränderungen erfolgte anhand des Vergleichs von 18-22 Monate alten Mäusen mit 3 Monate alten Mäusen. Die Untersuchungen fanden zunächst mit dem Inzuchtstamm C57BL/6J statt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde weiterhin der Auszuchtstamm NMRI herangezogen. Für die Erfassung der mitochondrialen Dysfunktion bei der AD wurde eine Studie an dem AD-Mausmodell Thy-1-APP durchgeführt.

5.2.1 C57BL/6J-Mäuse

Das C57BL/6-Modell ist das Mausmodell, das am besten charakterisiert ist und sich am häufigsten in der Literatur wiederfindet (Mitchell et al. 2015; Jackson Laboratory 2017b). Neben dieser Tatsache wurde der C57BL/6-Mausstamm ausgesucht, da dieser den genetischen Hintergrund des eingesetzten AD-Modells bildete und als langlebiger Stamm auch für die Lebenszeitstudie geeignet war. Auf diese Weise sollte eine Vergleichbarkeit der Studien geschaffen werden. Männliche Tieren unterliegen zudem geringeren hormonbedingten Schwankungen als weibliche Tiere (Fester and Rune 2015; Weixelbaumer et al. 2014; Yagi et al. 2017).

Eine deutliche Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion wurde von Navarro et al. in verschiedenen Studien an Nagetieren detektiert. Im frontalen Kortex und Hippocampus von 12 Monate alten Ratten wurde eine verminderte Aktivität der mitochondrialen Komplexe I und IV beobachtet, die von erhöhten ROS-Konzentrationen und Oxidationsprodukten, einschließlich Proteincarbonylen, begleitet wurden (Navarro et al. 2011). Auch im Gehirn von Mäusen wurden im Alter zwischen 13 und 20 Monaten deutliche Aktivitätsabnahmen der Komplexe I und IV und Zunahmen an oxidativen Schädigungen detektiert (Boveris and Navarro 2008; Navarro et al. 2002). Darüber hinaus konnte für den Auszuchtstamm NMRI in vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe eine ausgeprägte Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion im Gehirn gealterter Tiere gezeigt werden (Hagl et al. 2016b; Hagl et al. 2015b; Afshordel et al. 2015). Von dem in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Inzuchtstamm C57BL/6 wurde in Bezug auf die Messwerte eine höhere Homogenität gegenüber dem Auszuchtstamm NMRI erwartet (Mitchell et al. 2015). Auch im Gehirn von C57BL/6-Mäusen wurden mitochondriale Dysfunktionen und oxidative Schädigungen, einschließlich erhöhter Mengen an Proteincarbonylen, beschrieben (Moreno-Ulloa et al. 2015).

Die 19-22 Monate alten C57BL/6J-Männchen wiesen in der vorliegenden Arbeit ausgeprägte Energiedefizite in dissoziierten Hirnzellen auf, die in Tab. 5.1 zusammengefasst sind.

Tab. 5.1: Zusammenfassung der altersbedingten mitochondrialen Dysfunktion in C57BL/6J-Mäusen.

	<i>Kurzzeitstudie</i>	<i>Langzeitstudie 1</i>	<i>Langzeitstudie 2</i>
	19-22 Monate Alt (vs. Jung, 3 Monate)	19 Monate Alt (vs. Jung, 3 Monate)	20 Monate Alt (vs. Jung, 3 Monate)
MMP basal	(↓)	(↓)	→
MMP nach SNP	↑	(↑)	→
ATP basal	↓	↓	↓
ATP nach SNP	↑	↑	(↑)
Mitochondriale Atmung	KI (↓) KI+KII (↓) KIV ↓	→	→
CS [IU]	→	→	→

↑/↓ signifikante Erhöhung/Erniedrigung vs. Jung, (↑/↓): tendenzieller Effekt, →: kein Effekt, die mitochondriale Atmung stellt CS-normierte Werte dar; CS: Citratsynthase-Aktivität; IU: *International Units*; MMP: Mitochondriales Membranpotenzial, SNP: Natriumnitroprussid, K: mitochondrialer Komplex

Die mitochondriale Dysfunktion in dissoziierten Hirnzellen äußerte sich durch signifikant erniedrigte ATP-Spiegel der 19-22 Monate alten Mäuse gegenüber den 3 Monate alten Mäusen. Um Zustände mit zusätzlich erhöhtem oxidativen und nitrosativen Stress zu imitieren, wurden die dissoziierten Hirnzellen weiterhin *ex vivo* mit dem NO-Donor SNP behandelt (siehe Kapitel 5.1). Die SNP-Schädigung führte in den dissoziierten Hirnzellen zu einem Abfall der ATP-Spiegel bei beiden Altersgruppen. Signifikant erhöhte ATP-Spiegel nach SNP-Stress in alten Mäusen gegenüber jungen Mäusen weisen auf eine verminderte Empfindlichkeit von dissoziierten Hirnzellen alter Mäuse gegen den induzierten Stress hin.

Die beschriebenen Veränderungen traten in allen drei Studien, in denen die mitochondriale Funktion im Gehirn gealterter C57BL/6J-Mäuse erfasst wurde, auf. Die Studien umfassten jeweils Gruppen alter Tiere, welche die Testsubstanzen erhielten und eine alte und eine junge Gruppe, welche Kontrollfutter erhielt. In einer Kurzzeitstudie sollte der Effekt einer täglichen Verabreichung des Traubenextrakts Acy über die Knopfkanüle für eine Periode von 3 Wochen in gealterten Mäusen untersucht werden. Die Tiere hatten neben der Bolusgabe der Testsubstanz in dieser Studie Zugang zu einer Standardpelletdiät (mit 15.000 IU/kg Vitamin A; 110 mg/kg Vitamin E; 36 mg/kg Vitamin C; 0,265 mg/kg Selen). In den anderen beiden Studien mit gealterten C57BL/6J-Mäusen erfolgte die Verabreichung der Testsubstanzen demgegenüber über die Futterpellets als Langzeitfütterung. Die Basisfutterpellets, in welche die Testsubstanzen verpresst wurden und die somit ohne Zusatz auch als Futter für die alten und jungen Kontrolltiere eingesetzt wurden, bestanden aus einer antioxidanzienarmen Spezialdiät (C1000 mod. mit 2.500 IU/kg Vitamin A; 20 mg/kg Vitamin E; 0 mg/kg Vitamin C; 0,150 mg/kg Selen).

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen mitochondrialen Dysfunktionen in dissoziierten Hirnzellen, die in allen drei Studien konstant vorlagen, wurden für die Atmungsaktivitäten in den respiratorischen Messungen an isolierten Hirnmitochondrien Diskrepanzen festgestellt. In der Kurzzeitstudie mit Einsatz der Standardpellettdiät wurde eine altersbedingte Verminderung der respiratorischen Aktivität des einzelnen Mitochondriums hinsichtlich des Komplex IV und tendenziell hinsichtlich Komplex I und KI+KII ermittelt. Eine verminderte Atmungsaktivität der Mitochondrien resultiert in einer verminderten ATP-Produktion, welche vermutlich zu den beobachteten geringeren ATP-Spiegeln in dissoziierten Hirnzellen alter Tiere der Kurzzeitstudie führte. Demgegenüber zeigten die Atmungsaktivitäten der Hirnmitochondrien von alten und jungen Mäusen in beiden Langzeitstudien mit antioxidanzienarmer Pellettdiät keine Unterschiede.

Eine mögliche Erklärung für diese uneinheitlichen Ergebnisse setzt bei den unterschiedlichen Messmethoden an, die für die Bestimmung der ATP-Konzentration und der mitochondrialen Atmung im Gehirn zum Einsatz kamen. Die Atmungsaktivitäten der Hirnmitochondrien wurden mittels hochauflösender Respirometrie am Oroboros Oxygraph-2k erfasst. Bei der hochauflösenden Respirometrie werden die Atmungsraten über die Zugabe von künstlichen Substraten, Inhibitoren und Entkopplern erfasst. Das Messprotokoll führt zu Atmungsraten, die über das physiologische Level hinausgehen. Dies steht im Gegensatz zu der Messung der ATP-Spiegel in dissoziierten Hirnzellen, welche die physiologische Situation besser widerspiegelt. Dennoch wurden in der Kurzzeitstudie Beeinträchtigungen sowohl in der ATP-Produktion als auch in der hochauflösenden Respirometrie festgestellt.

Die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der altersassoziierten Abnahme der mitochondrialen Atmungsaktivitäten im Oxygraph könnten in einer Reaktion auf die verschiedenen eingesetzten Futterpellets begründet liegen. Die antioxidanzienarmen Futterpellets, welche als Kontrollfutter für die alten und jungen Mäuse in der Langzeitstudie verwendet wurden, enthielten nur ein Minimum an Antioxidanzien, die für Labormäuse generell als ausreichend angesehen werden. Die umfangreichen Genanalysen der verschiedenen Unterstämme des C57BL/6-Modells in den letzten Jahren brachten hervor, dass der originäre Stamm des *Jackson Laboratory C57BL/6J*, der in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, eine spontane Genmutation der Nikotinamid-Nukleotid-Transdehydrogenase (NNT) besitzt (Ronchi et al. 2013; Freeman et al. 2006). NNT ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und katalysiert die Reduktion von NADP⁺ bei gleichzeitiger NAD⁺ Oxidation und einem Wiedereintritt von H⁺ in die mitochondriale Matrix aus dem Intermembranraum. Folglich wird NNT als eine wichtige Quelle für mitochondriales NAPH angesehen (Yin et al. 2014) (siehe Kapitel 1.2.1.3).

C57BL/6J-Mäuse könnten somit eine geringere Fähigkeit besitzen, NADP⁺ und Glutathion in ihrem reduzierten Zustand zu erhalten. Letzteres ist jedoch für die Neutralisation von freien Radikalen in den Mitochondrien von essentieller Bedeutung. Ein Vergleich der Atmung isolierter Muskelfasern von C57BL/6N-Mäusen, welche ein intaktes NNT-Gen besitzen, mit denen von C57BL/6J-Mäusen brachte eine erhöhte Produktion von H₂O₂ im Gewebe der C57BL/6J-Mäuse hervor (Fisher-Wellman et al. 2015).

Laut dem *Jackson Laboratory* verfügen C57BL/6J Mäuse unter Standardbedingungen über eine normale Lebensspanne ohne allgemeine Gesundheitseinschränkungen (Jackson Laboratory 2017b). Eine erhöhte mitochondriale Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress könnte jedoch unter der Bedingung einer geringeren Aufnahme von Antioxidanzien gegeben sein und bei unphysiologisch hohen Atmungsraten, wie beispielsweise während der hochauflösenden Respirometrie, erkennbar werden. Es ist nicht ausgeschlossen, dass diese Gegebenheiten den Alterungseffekt der Mitochondrien in den Langzeitstudien mit antioxidanzienarmer Diät maskiert haben. Die frühe Einführung einer antioxidanzienarmen Diät, wie beispielsweise ab einem Alter von 1 Monat in den jungen Kontrollgruppen der Langzeitstudien, könnte einen ausgeprägteren Effekt auf die mitochondriale Funktion haben als die Einführung in einer späteren Lebensphase. C57BL/6J-Mäuse der alten Gruppe und somit im Alter von 13-20 Monaten sind möglicherweise weniger anfällig für zusätzliche Stressfaktoren. Diese Annahme wird von der Beobachtung gestützt, dass dissoziierte Hirnzellen alter Mäuse weniger empfindlich auf den induzierten SNP-Stress reagierten.

Eine altersbedingte Abnahme der mitochondrialen Biogenese wurde in der vorliegenden Arbeit bei 19-22 Monate gegenüber 3 Monate alten Tieren nicht beobachtet. Moreno-Ulloa et al. (2015) detektierten dahingegen im Gehirn von 26 Monate alten C57BL/6-Männchen gegenüber 6 Monate alten Tieren verminderte Konzentrationen der mitochondrialen Komplexe I und V, von mit der mitochondrialen Biogenese assoziierten Proteinen sowie eine reduzierte CS als Marker der mitochondrialen Masse. Darüber hinaus wurden vermehrt oxidative Schädigungen in Form von Proteincarbonylen identifiziert sowie eine verminderte Aktivität von antioxidativen Enzymen (Moreno-Ulloa et al. 2015). Die Auswahl der zu vergleichenden Altersgruppen könnte für die abweichende Ausprägung der Alterseffekte von Bedeutung sein.

Interessante Anhaltspunkte zu dem zeitlichen Verlauf der mitochondrialen Dysfunktion lieferte eine umfangreiche Proteomanalyse von Mitochondrien aus dem Gehirn von C57BL/6-Männchen im Alter von 5, 12 und 24 Monaten (Stauch et al. 2015). In der Analyse wurde eine Erhöhung der Proteinexpression der mitochondrialen Komplexe zwischen dem Alter von 5 und

12 Monaten festgestellt, auf die eine Verminderung zwischen dem Alter von 12 und 24 Monaten folgte. Weiterhin zeigten Enzyme des Citratzyklus den gleichen zeitlichen Expressionsverlauf, mit einer Expressionszunahme bis zum Alter von 12 Monaten und einer Expressionsabnahme zwischen dem Alter von 12 und 24 Monaten. Die daraus resultierenden reduzierten NADH-Konzentrationen könnten somit zur mitochondrialen Dysfunktion im Alter beitragen. Die mitochondrialen Atmungsaktivitäten inklusive der RCR, die über eine Seahorse-Messung erfasst wurden, zeigten jedoch keine Veränderungen. Basierend auf der Beobachtung, dass verschiedene Mitochondrienpopulationen sehr unterschiedliche altersbedingte Veränderungen zeigen können, wird in der Publikation darauf hingewiesen, dass Veränderungen der Atmungsaktivitäten in spezifischen Regionen des Gehirns oder der Zellen (z. B. präsynaptische Mitochondrien) möglicherweise vorliegen, jedoch in dem heterogenen Mitochondrienisolat nicht erfasst wurden. Passend zu den Daten zur Proteinexpression der mitochondrialen Komplexe zeigten PGC1 α und Tfam als Hauptregulatoren der Biogenese und Energiehomöostase eine ausgeprägte Verschiebung von einer starken Aktivierung zwischen dem Alter von 5 und 12 Monaten hin zu einer geringen Aktivierung zwischen dem Alter von 12 und 24 Monaten (ermittelt über eine *Ingenuity Pathway Analysis*, IPA) (Stauch et al. 2015). In Hinblick auf die Expression mitochondrialer Gene konnten Manczak et al. (2005) eine verminderte Genexpression der mitochondrialen Komplexe I und III ab einem Alter von 12 Monaten sowie der mitochondrialen Komplexe IV und V ab einem Alter von 18 Monaten nachweisen. Zwischen 2 und 12 Monaten hingegen wurde eine temporäre Erhöhung der Expression mitochondrialer Komplexe festgestellt. Die geringsten Expressionsraten wiesen Hirne der ältesten Tieren im Alter von 24 Monaten auf (Manczak et al. 2005).

Eine Erklärung für den beschriebenen zeitlichen Verlauf der Expression mitochondrialer Gene bzw. Proteine, einschließlich einer Hochregulierung bis zum mittleren Alter, könnte die Existenz eines Kompensationsmechanismus für den Verlust an mitochondrialer Funktion und oxidativen Schäden des ETS darstellen. Wenn dieser Kompensationsmechanismus mit fortschreitendem Alter nicht mehr aufrecht erhalten werden kann, könnte daraus eine Runterregulierung der Genexpression resultieren (Manczak et al. 2005). Diese Daten stimmen somit mit den im Kapitel 1.2.2 vorgestellten neuen Theorien zur mitochondrialen Dysfunktion als Schlüsselfaktor bei der Alterung und AD überein (Grimm et al. 2016; Demetrius and Simon 2012).

Aussagen zum zeitlichen Verlauf der mitochondrialen Funktion können mit den Daten der vorliegenden Arbeit nicht getroffen werden, da nur 3 Monate alte Mäuse mit 19-22 Monate alten Mäusen verglichen wurden. Daten zur Expression mitochondrialer Gene liegen für C57BL/6J-

Männchen einer Langzeitstudie vor. Entgegen der fehlenden Beeinträchtigung der Atmungsaktivitäten der 19 Monate alten Tiere in der hochauflösenden Respirometrie zeigte sich im Gehirn der 19 Monate alten Tiere gegenüber den 3 Monate alten Tiere eine signifikant verminderte Genexpression des mitochondrialen Komplex I. Keine Unterschiede konnten jedoch in der Genexpression von Komplex IV ermittelt werden. Dieser war zwar auch in der respiratorischen Messung an isolierten Hirnmitochondrien der zugehörigen Langzeitstudie unverändert, zeigte jedoch im Gehirn der 19-22 Monate alten Tiere der Kurzzeitstudie mit Standardfutterpellets als einziger eine signifikant geringere respiratorische Aktivität. Hinsichtlich der Expression von Genen, die mit der mitochondrialen Biogenese assoziiert sind, einschließlich $PGC1\alpha$ und $Tfam$, konnten keine altersbedingten Abnahmen erfasst werden. Eine Ausnahme bildete $Nrf1$, dessen Expression im Gehirn alter Tiere signifikant vermindert war. $Nrf1$ kann durch $PGC1\alpha$ co-aktiviert werden und wiederum die Expression mitochondrialer Zielgene wie $Tfam$ als Schlüsselfaktor für die Einleitung der Transkription und Replikation der mtDNA aktivieren. Der geringe Alterseffekt auf biogeneseassoziierte Gene deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zur CS als Marker der mitochondrialen Masse (Larsen et al. 2012), welcher in allen Studien keine Unterschiede zwischen den Altersgruppen zeigte. Neben der verminderten Expression von $Nrf1$ und Komplex I waren die Auswirkungen des Alters auf die untersuchten Gene gering.

Auf Grundlage der beschriebenen Hochregulierung mitochondrialer Gene bzw. Proteine bis zu einem Alter von ca. 12 Monaten ist anzunehmen, dass ein Vergleich der 19 Monate alten Tiere mit einer Gruppe von 6-12 Monate alten Tieren zu einem größeren Unterschied in der Expression mitochondrialer Gene geführt hätte. Auch der Vergleich mit einer noch stärker gealterten Gruppe, wie zum Beispiel einer 24 Monate alten Gruppe, könnte möglicherweise eine ausgeprägtere altersbedingte mitochondriale Dysfunktion hervorbringen.

5.2.2 NMRI-Mäuse

Auf Grundlage der beschriebenen mangelnden Konsistenz hinsichtlich der Erfassung einer mitochondrialen Dysfunktion in gealterten C57BL/6J-Mäusen mittels hochauflösender Respirometrie sowie hinsichtlich der Erfassung von Dysfunktionen in kognitiven Verhaltenstests (siehe Kapitel 5.3), sollte für weitere Untersuchungen auf einen anderen Mausstamm zurückgegriffen werden. Die NMRI-Maus wurde gewählt, da diese in vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe konstante altersabhängige mitochondriale Dysfunktionen in dissoziierten Hirnzellen und in der hochauflösenden Respirometrie gezeigt hatte.

In einem Alter von 18 Monaten wiesen NMRI-Mäuse verglichen mit 3 Monate alten Tieren in der hochauflösenden Respirometrie eine signifikant verminderte Aktivität des mitochondrialen Komplex IV auf. Dies wurde begleitet von numerisch deutlichen, aber nicht signifikanten Abnahmen des MMPs und der ATP-Spiegel in dissoziierten Hirnzellen. Auch Hagl et al. (2015c) fanden in 18 Monate alten NMRI-Mäusen numerische, aber nicht signifikante Verminderungen der ATP-Konzentrationen vor. Die mitochondriale Atmung war hinsichtlich einer verringerten Aktivität des Komplex I betroffen (Hagl et al. 2015b). Signifikante Verminderungen von Komplex I oder Komplex IV, begleitet von signifikant geringeren ATP-Konzentrationen in Gehirnen alter NMRI-Mäuse traten in mehreren Studien auf (Afshordel et al. 2015; Hagl et al. 2016a; Hagl et al. 2015a; Hagl et al. 2016b). Neben einer verminderten Komplex I-Aktivität wurde zudem ein Abfall in der Proteinkonzentration von Komplex I sowie Genexpression von Komplex I und IV beobachtet (Hagl et al. 2016b; Hagl et al. 2016a). Die Daten decken sich mit der vorliegenden Studie, in der die Genexpression sowohl von Komplex I als auch Komplex IV signifikant vermindert vorlag. Weiterhin wurde eine signifikante Verminderung der Genexpression des Masterregulators der mitochondrialen Biogenese, PGC1 α , detektiert, die sich jedoch lediglich in einer numerisch erniedrigten CS als Marker der mitochondrialen Masse widerspiegelte. Keine altersbedingte Abnahme wurde hinsichtlich Nrf1 und Tfam detektiert. Demgegenüber fanden Hagl et al. (2016a) im Gehirn 18 Monate alter NMRI-Mäuse eine signifikant verminderte CS sowie verminderte Genexpressionsraten von PGC1 α , Nrf1 und Tfam sowie eine erhöhte PGC1 α -Proteinexpression. PGC1 α kann durch SIRT1 und AMPK aktiviert werden, was in Kapitel 5.4.2 näher beleuchtet wird. Verminderte Genexpressionsraten lagen bei (Hagl et al. 2016a) für AMPK und SIRT1 vor sowie für AMPK in der vorliegenden Arbeit. In beiden Arbeiten konnte zudem eine verminderte Genexpression von CREB detektiert werden, welches die Genexpression von PGC1 α induzieren kann (siehe Kapitel 5.4.2).

Insgesamt liefern die Daten Hinweise, dass es im Gehirn gealterter NMRI-Mäuse zu verminderten Komplex I- und Komplex IV-Aktivitäten kommt, die in Folge eine verminderte ATP-Produktion bedingen. An der altersbedingten mitochondrialen Dysfunktion könnte eine verminderte Biogenese der Mitochondrien beteiligt sein, die sich in variablem Ausmaß zeigt und über verminderte Expressionsraten verschiedener Gene einschließlich CREB, SIRT 1, AMPK, PGC1 α vermittelt werden könnte. (Hagl et al. 2016a) finden weiterhin Veränderungen in der Gen- und Proteinexpression von Faktoren, die wichtig für die mitochondriale Dynamik sind und schlagen die Veränderungen als Teil eines Kompensationsmechanismus zur Verbesserung der mitochondrialen Atmung vor (Hagl et al. 2016a).

5.2.3 AD-Modell Thy-1-APP

Zur Untersuchung der Effekte von TOP bei der AD wurde das Mausmodell Thy-1-APP^{751SL} eingesetzt. Das transgene Mausmodell mit dem genetischen Hintergrund der C57BL/6-Maus verfügt über ein humanes APP⁷⁵¹-Gen mit der humanen London- (V717L) und schwedischen (KM670/671NL) Doppelmutation unter Kontrolle des murinen Thy-1-Promotors (Blanchard et al. 2003). Erhöhte A β -Konzentrationen konnten in Thy-1-APP-transgenen Mäusen intrazellulär schon in einem Alter von 3 Monaten beobachtet werden (Blanchard et al. 2003). Darüber hinaus wurde zu diesem frühen Zeitpunkt ein Abfall des MMPs sowie verminderte ATP-Konzentrationen detektiert (Hauptmann et al. 2009, Eckert et al. 2008). Auch Keil et al. detektieren in 3 Monate alten Tieren des gleichen Modells einen signifikanten Abfall des MMPs sowie eine signifikant verminderte ATP-Konzentration und Komplex IV-Aktivität (Keil et al. 2004a).

Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Thy-1-APP-transgene Mäuse wiesen gegenüber dem Wildtyp numerisch erhöhte ATP-Spiegel und einen numerischen Anstieg des MMPs auf. Kein Effekt wurde hinsichtlich der mitochondrialen Atmung oder CS festgestellt. Eine Ursache könnte sein, dass Thy-1-APP transgene Mäuse mit erhöhten A β -Konzentrationen und somit besonders ausgeprägtem Stress Kompensationsmechanismen mit zunächst hochregulierten mitochondrialen Aktivitäten entwickeln, wie sie auch für den Alterungsprozess vorgeschlagen werden (vergleiche Kapitel 1.2.2 und 5.2.1). Eine Überschreitung der Grenze der möglichen Kompensation und somit ein Zusammenbruch des Energiestoffwechsels wären in der vorliegenden Studie möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt aufgetreten. Der Zeitverlauf von hoher zu verminderter mitochondrialer Funktion könnte eine Variabilität aufweisen, der durch andere Umwelteinflüsse beeinflusst werden kann. Auch die Thy-1-APP-Mäuse erhielten in der vorliegenden Studie antioxidanzienarmes Futter, dessen möglicher Einfluss in Kapitel 5.2.1 schon ausführlich diskutiert wurde. Unveröffentlichte Daten aus Studien der eigenen Arbeitsgruppe zeigten jedoch unabhängig vom Futter zum Teil eine ähnliche Tendenz der mitochondrialen Funktion wie in der vorliegenden Arbeit; andererseits wurde teilweise bei Standardfutter im gleichen Alter auch eine ausgeprägte mitochondriale Dysfunktion bei Thy-1-APP-transgenen Tieren beobachtet.

Eine Möglichkeit zur Erzielung besserer Ergebnisse in Hinblick auf die mitochondriale Dysfunktion könnte sein, die Tiere zu einem späteren Zeitpunkt zu untersuchen. Von deutlichen kognitiven Defiziten wird ab einem Alter von 7-8 Monaten berichtet (Blanchard et al. 2009). Hagl et al. konnten jedoch auch im Alter von 7 Monaten keine signifikant verminderten ATP-Spiegel, einen Abfall des MMPs oder der mitochondrialen Atmung detektieren (Hagl 2014). Die Aussagekraft der Untersuchung eines noch späteren Zeitpunkts ist fraglich, da Thy-1-APP-

transgene Mäuse schon im jungen Alter eine hohe Sterberate aufweisen und folglich eine Selektion von Mäusen mit hoher mitochondrialer Funktion bzw. starken Adaptationsmechanismen stattfinden könnte. Generell ist der Einfluss einer solchen Selektion auch schon bei den vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen. Thy-1-APP-transgene Mäuse zeigten während der Studienphase eine Überlebensrate von ca. 74 % und somit eine signifikant unterschiedliche Überlebenskurve gegenüber dem Wildtyp mit 100 % Überlebenden.

Aus den vorliegenden Daten lässt sich schließen, dass das Thy-1-APP₇₅₁SL-Modell eine sehr variable mitochondriale Funktion zeigt, die möglicherweise stark anfällig für externe Einflüsse ist. Die Aussagekraft von Effekten durch die Fütterung mit Polyphenolen oder anderen Interventionen ist somit sehr begrenzt und wird daher in der vorliegenden Arbeit nicht ausführlich diskutiert.

Es liegen einige andere AD-Mausmodelle vor, in denen die mitochondriale Funktion untersucht wurde (Grimm et al. 2016). Mäuse, die neben der hier untersuchten Doppelmutation zusätzlich eine Mutation des PS1 aufweisen, zeigten im Alter von 3 Monaten neben dem Auftreten von A β -Plaques im Gehirn ausgeprägtere Verminderungen des MMPs und der ATP-Konzentration (Eckert et al. 2008). Gehirne von Mäusen mit APP/PS2 Mutation sowie von Mäusen mit dreifacher Mutation und somit Kombination der A β - und Tau-Pathologie wiesen interessanterweise erst im Alter von 12 Monaten und nicht im Alter von 8 Monaten einen Abfall der ATP-Konzentration auf. Die Komplex IV-Aktivität lag zu beiden Alterszeitpunkten signifikant vermindert vor. Weiterhin zeigten Mäuse mit dreifacher Mutation im Alter von 12 Monaten eine Beeinträchtigung der Komplex I-Aktivität, die bei alleiniger Tau-Mutation auch schon im Alter von 8 Monaten auftrat. Es ist somit zu vermuten, dass Komplex I durch die Tau-Pathologie und Komplex IV durch die A β -Pathologie beeinträchtigt wird (Rhein et al. 2009).

Bei den beschriebenen Modellen bleibt stets zu beachten, dass es sich um Modelle der familiären Form der AD handelt und nicht der sporadischen AD, die meist spät im Alter auftritt (LOAD) und vermutlich einer multifaktoriellen Pathogenese unterliegt. Ein Modell, das für die Untersuchung der Effekte der LOAD gut geeignet sein könnte, ist das *Senescence-accelerated mouse prone 8* (SAMP 8) Mausmodell. Dieses Modell wurde durch Phänotyp-Selektion aus dem AKR/J-Stamm geschaffen und ist charakterisiert durch einen fortschreitenden Verlust von kognitiven Funktionen und neurodegenerativen Veränderungen mit A β -Plaques und hyperphosphoryliertem Tau. Begleitet werden diese Effekte von ausgeprägten Alterserscheinungen u.a. erhöhtem oxidativem Stress und mitochondrialer Dysfunktion (Cheng et al. 2014).

5.3 Kognitive Dysfunktion im Mausmodell

5.3.1 Studien zur kognitiven Alterung

Lernprozesse, die über Angst vermittelt werden, gehören zu den stärksten und langanhaltenden Erinnerungen. Der *Passive Avoidance* Test ist die am meisten durchgeführte Form der instrumentellen Angstkonditionierung. Bei dem *Step-through* Ansatz des Tests lernt die Maus den Übertritt in ein abgedunkeltes Kompartiment zu vermeiden, in dem sie einen milden elektrischen Schlag erfahren hat. Das angstbasierte Lernen und die Gedächtnisbildung involviert die Entwicklung eines LTPs in Hippocampus und Amygdala (Izquierdo et al. 2016; McGaugh 2004). Vermutlich kommt es dabei über die Aktivierung von Glutamatrezeptoren zur Öffnung von Calciumkanälen, und nachfolgender Aktivierung von Kinasen, welche zahlreiche Proteine wie den Transkriptionsfaktor CREB als Schlüsselfaktor für die Konsolidierung des LTPs und der Langzeiterinnerung aktivieren (Izquierdo et al. 2016; Birbaumer and Schmidt 2011b) (näher erläutert in Kapitel 1.1.1.1). In der vorliegenden Arbeit wurden die Mäuse in das erleuchtete Kompartiment eines 2-Kammersystems gesetzt, das durch eine automatisch verschließbare Tür von dem abgedunkelten Kompartiment getrennt war. Am ersten Tag wurde die Zeit bis zum Übertritt (*Step-through latency*) der Maus in die abgedunkelte Kammer erfasst, in der sie sogleich einen leichten elektrischen Schlag über das Bodengitter erhielt. Nach 24 h wurde untersucht, inwieweit die Maus gelernt hat, bei einem erneuten Platzieren in das erleuchtete Kompartiment die dunkle Kammer zu vermeiden. Der Test wurde bei gealterten C57BL/6J- und NMRI-Mäusen (18-20 Monate alt) und den zugehörigen jungen Kontrolltieren (3 Monate alt) durchgeführt. Der Test erbrachte für alle Studien ein unerwartetes Ergebnis. Zwar zeigten alle getesteten Mäuse eine signifikant höhere 24 h post *Step-through latency* und somit eine Langzeiterinnerungsleistung gegenüber dem ersten Tag, jedoch war die *Step-through latency* bei jungen Mäusen gegenüber alten Mäusen geringer ausgeprägt.

Studien anderer Forschungsgruppen beobachteten eine signifikant verschlechtere Leistung von gealterten Mäusen im *Passive Avoidance* Test (Jiang et al. 2015; Yu et al. 2013; Matzel et al. 2011; Papandreou et al. 2011). Gealterte NMRI-Mäuse wiesen in den vorliegenden Untersuchungen gegenüber jungen Mäusen eine signifikant höhere prä *Step-through latency* auf. Es wäre hier somit denkbar, dass alte Tiere durch eine geringere Aktivität auch am zweiten Tag länger in dem hellen Kompartiment verweilen. Dementgegen wurde eine höhere prä *Step-through latency* alter NMRI-Mäuse auch von (Hagl et al. 2016a) beobachtet, die jedoch eine altersbedingte verminderte 24 h *Step-through latency* ermitteln konnten. Zudem zeigten

C57BL/6J-Mäuse keine Unterschiede in der prä *Step-through latency*, jedoch die gleichen Unterschiede in der 24 h post *Step-through latency*. Eine weitere Erklärung für diese kontroverse Beobachtung könnte ein höheres Stresslevel kurz nach der Konditionierung bei jungen Mäusen sein. Junge Mäuse ließen sich oftmals schlechter aus der *Passive Avoidance* Box nehmen, was vermutlich mit einem erhöhten Stress verbunden war. Es konnte gezeigt werden, dass Stresssituationen direkt nach der Konditionierung zu einer verminderten Gedächtnisbildung führen können (Mondadori et al. 1977; Sardari et al. 2015). Ratten, die vor oder nach der Konditionierung im *Passive Avoidance* Test Stress (Verweilen auf einer erhöhten Plattform für 30 min) ausgesetzt wurden, zeigten starke Abnahmen der 24 h post *Step-through latency*. Diese Reaktion war mit einer verminderten CREB-Aktivierung und erniedrigten PGC1 α -Leveln im Hippocampus verbunden (Sardari et al. 2015). Zudem zeigten in der vorliegenden Studie Mäuse, die 30 s nach dem elektrischen Schlag erneut in die helle Kammer gesetzt wurden, sowohl sofort als auch nach 24 h eine schlechte Erinnerungsleistung. Auch hier kann der erneute Stressfaktor eine Rolle gespielt haben. Diese Beobachtung könnte jedoch auch darauf zurückzuführen sein, dass das Gedächtnis nach 30 s noch nicht ausgebildet war und der Übertritt in die dunkle Kammer ohne erneuten Schock zu einer Extinktion des Erlernten und somit niedrigen 24 h post *Step-through latency* geführt hat. Die Extinktion beschreibt die zunehmend nachlassende erlernte Reaktion, wenn der negative Reiz nicht mehr auftritt (Izquierdo et al. 2016).

Die Form, die am meisten zur Untersuchung des Arbeitsgedächtnisses bei Mäusen eingesetzt wird, ist die Aufgabenbewältigung im Labyrinth, die das räumliche Gedächtnis involviert. Die spontane Alternation im *Y-Maze* gehört zu den einfachsten Formen dieser Tests und beruht auf dem natürlichen Erkundungsverhalten von Mäusen. In dem aus drei Armen bestehenden Labyrinth hat die Maus somit die Tendenz, einen Arm, den sie zuvor nicht besucht hat, zu erkunden. Erfolgt der Test in nur einer Phase, kann die spontane Alternation, d. h. der Besuch aller drei Arme, ohne vorher zum wiederholten Male einen der zwei anderen Arme besucht zu haben, ermittelt werden (Webster et al. 2014; Hughes 2004). Verminderte spontane Alternationsraten wurden für C57BL/6J-Mäuse (Lee and Oh 2015) und NMRI-Mäuse (Lamberty and Gower 1992) beobachtet. Hagl et al. (2016a) detektieren bei gealterten NMRI-Mäusen eine verminderte Zahl an Eintritten und Alternationen im *Y-Maze*, jedoch keine verminderte Alternationsrate. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden konstant verminderte Eintritte, jedoch maximal numerisch verminderte Alternationen alter Mäuse gegenüber jungen Mäuse beobachtet. Einzig der Vergleich von Mäusen im Alter von 1 Monat gegenüber einer großen Gruppe von Mäusen im Alter von 12 Monaten vor Einteilung in die Interventionsgruppen in der NMRI-Studie

konnte eine signifikant verschlechterte Leistung alter Mäuse hervorbringen. Alte Mäuse hatten somit ein vermindertes exploratives Verhalten, jedoch kein eindeutig vermindertes Arbeitsgedächtnis in der spontanen Alternation.

Eine weitere einfache Untersuchungsform im *Y-Maze* ist der *2-Trial-Ansatz*, bei dem die Maus in einer 2. Phase neben dem Startarm nur einen weiteren Arm des *Y-Maze* erkunden kann; der 3. Arm ist verschlossen. In der 2. Phase sind alle drei Arme geöffnet und es wird erfasst, inwieweit die Maus den nicht zuvor erkundeten Arm bevorzugt. Durch die Variation des Zeitintervalls zwischen den beiden Phasen kann die Stärke des räumlichen Arbeitsgedächtnisses erfasst werden (Lalonde 2002; Crusio et al. 2013; Chen et al. 2010). Diese Form des *Y-Maze* wurde in der vorliegenden Arbeit an NMRI-Mäusen eingesetzt. Der Test brachte bei jungen Mäusen, aber nicht bei gealterten (12-18 Monate alten) Mäusen einen signifikant höheren Anteil der Erkundungszeit des neuen Arms gegenüber dem zuvor erkundeten Arm (Diskriminierungsrate > 50 %) hervor. Neben diesen einfachen Tests, die eine milde altersbedingte Abnahme des räumlichen Gedächtnisses zeigten, wäre die Untersuchung der Leistung in komplexeren Gedächtnistests interessant. Zu diesen Tests gehören beispielsweise das *Radial Arm Maze* (RAM) mit 6-8 Armen und nahrungsbasierter Belohnung sowie das am meisten angewandte *Morris Water Maze* (MWM), in dem die Maus in ein rundes Wasserbecken gesetzt wird und eine versteckte Plattform finden muss (Webster et al. 2014).

Als weiterer Gedächtnistest wurde der *Social Recognition* Test durchgeführt, der das soziale Gedächtnis untersucht. Das originär von Crawley und Kollegen entwickelte 3-Kammersystem basiert auf der freiwilligen Kontaktaufnahme der Testmaus mit einer Stimulusmaus (1. Phase) oder zwei Stimulismäusen (2. Phase), die unter einem Gitterkäfig positioniert werden (Moy et al. 2004). Das soziale Gedächtnis kann in der 2. Phase untersucht werden, in der sich die in der 1. Phase kennengelernte Maus unter einem Gitterkäfig befindet sowie eine unbekannte Maus unter dem zweiten Gitterkäfig. Die Gedächtnisleistung umfasst dabei die Präferenz der Kontaktaufnahme mit der unbekanntem Maus gegenüber der schon bekannten Maus (Moy et al. 2004; Kaidanovich-Beilin et al. 2011). C57BL/6J-Mäuse im Alter von 5-6 Wochen bzw. 3 Monaten haben in Untersuchungen der Forschergruppe um Crawley zuvor im *Social Recognition* Test eine Präferenz für die unbekannte Maus gezeigt (Moy et al. 2004). Zudem wurde beispielsweise im AD-Mausmodell Tg2576 eine Beeinträchtigung des sozialen Gedächtnisses beobachtet (Deacon et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde der *Social Recognition* Test mit C57BL/6J-Mäusen im Alter von 1, 3, 12, 15, 18 und 21 Monaten durchgeführt. Nur in einer

von zwei Studien, die Tiere im Alter von 1 Monat untersuchten, konnte eine signifikante Präferenz für die unbekannte Maus erfasst werden. Alle weiteren Untersuchungszeitpunkte zeigten keinen Effekt. Einzig nach Fütterung mit Acy konnte für den Alterszeitpunkt 12 Monate eine signifikante Präferenz für die unbekannte Maus beobachtet werden.

Der olfaktorische Stimulus spielt beim *Social Recognition* Test eine Schlüsselrolle. Altersbedingte Abnahmen der olfaktorischen Leistung, die hier nicht erfasst wurden, können somit den Test beeinflussen (Kogan et al. 2000). Auch eine altersbedingte geringere lokomotorische Aktivität, wie sie im *Y-Maze* Test beobachtet wurde, kann eine Rolle bei der geringen Leistung im *Social Recognition* Test einnehmen. Eine Erklärung für die insgesamt auch schlechte Leistung der jungen Mäuse liefern diese Störfaktoren jedoch nicht. Einen bedeutenden Beitrag zu der schlechten Leistung im *Social Recognition* Test kann das Alter der Stimulismäuse geleistet haben. Um aggressives Verhalten zu vermeiden, wird üblicherweise das soziale Gedächtnis durch das Zusammenführen der Testmäuse mit jungen Stimulus-Mäusen durchgeführt (Macbeth et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden auch ältere Stimulus-Mäuse verwendet. Auch wenn die Mäuse während des Tests durch einen Gitterkäfig getrennt waren, sodass kein direkter Kontakt oder Kampf möglich war, kann diese Abweichung einen Einfluss auf das Testergebnis gehabt haben.

Ein Test mit ähnlicher Vorgehensweise des *Social Recognition* Tests, ist der *Novel Object Recognition* Test. Dieser beruht auf der Wiedererkennung von Objekten und kann zur Erfassung kognitiver Alterungsprozesse im Zusammenhang mit dem Wiedererkennungsgedächtnis eingesetzt werden (Burke et al. 2012).

Insgesamt konnte mit den durchgeführten Tests für keines der untersuchten Mausmodelle eine eindeutige kognitive Dysfunktion gezeigt werden. Eine Gedächtnisleistung von jungen, aber nicht gealterten NMRI-Mäusen, konnte für den 2-Trial-Ansatz des *Y-Maze* detektiert werden. Das 1-Trial-*Y-Maze* lieferte in den Mausmodellen nur eindeutige Ergebnisse hinsichtlich einer altersbedingten Abnahme der lokomotorischen Aktivität. Der *Social Recognition* Test konnte insgesamt auch für junge Mäuse keine konstante Gedächtnisleistung hervorbringen. Der *Passive Avoidance* Test lieferte kontroverse Ergebnisse, welche die Beurteilung von Interventionseffekten stark einschränken.

5.3.2 Studien im AD-Modell Thy-1-APP

Im Thy-1-APP-Modell wurde der *Y-Maze* und der *Passive Avoidance* Test sowie zwei Untersuchungen zur Beeinträchtigung von Alltagsaktivitäten durchgeführt. Für andere AD-Mausmodelle werden sowohl für *Y-Maze* Tests als auch für den *Passive Avoidance* Test teils Beeinträchtigungen detektiert, teils nicht (Webster et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit zeigten

sowohl Thy-1-APP-transgene Mäuse als auch Wildtyp-Mäuse im Alter von 3-4 Monaten im *Passive Avoidance* Test eine signifikante Gedächtnisleitung. Die 24 h post *Step-through latency* der APP-transgenen Tiere war gegenüber dem Wildtyp nicht signifikant vermindert, wies jedoch einen Wert auf, der fast auf die Hälfte des Wertes der Wildtyp-Mäuse vermindert war. Weiterhin wiesen Wildtyp-Mäuse mit 3-4 Monaten eine tendenziell höhere spontane Alternationsrate als APP-transgene Mäuse auf. Dies deutet auf eine tendenzielle Beeinträchtigung des Arbeits- und Langzeitgedächtnisses der APP-transgenen Mäuse hin.

Zusätzlich sollte das Thy-1-APP-Mausmodell mit Hilfe des *Burrowing* Tests und des *Nesting* Tests auf Beeinträchtigungen in speziestypischen Verhaltensweisen untersucht werden, die gleichwertig zu Beeinträchtigungen von Alltagsaktivitäten bei der AD sind (Deacon 2012). Im *Burrowing* Test wurde untersucht, welche Menge an zerkleinerten Futterpellets von einer Testmaus über Nacht aus einem Behälter ausgeräumt wird. Weder die APP-transgenen Thy-1-APP-Mäuse noch die Wildtyp-Mäuse räumten mehr als 40 g der insgesamt 200 g Futterpellets aus der Röhre. Dies steht im Gegensatz zu C57BL/6-Mäusen, die typischerweise ca. 200 g Futterpellets über Nacht ausräumen (Deacon 2012). Signifikante Unterschiede zwischen APP- und Wildtyp-Mäusen traten weder im Alter von 1-2 Monaten noch 3-4 Monaten auf. Im AD-Mausmodell Tg2576 wurde beispielsweise 2 h nach Platzierung der Röhre eine signifikant verminderte *Burrowing* Aktivität beobachtet und nur ein tendenzieller Effekt bis zum nächsten Morgen (Deacon et al. 2009). In APP/PS1-transgenen Mäusen wurden nach 2 h keine Unterschiede zu den Kontrollen detektiert; über Nacht wurde fast die gesamte Menge an Futterpellets ausgeräumt (Janus et al. 2015). Diese hohe *Burrowing*-Aktivität steht im Gegensatz zu der geringen Menge an Futterpellets, die auch von den Wildtyp-Mäusen in der vorliegenden Studie über Nacht ausgeräumt wurde. Auch wenn Mäuse eine spontane *Burrowing*-Aktivität zeigen, könnte ihre Leistung weiterhin, wie in der Studie von Janus et al. (2015) durchgeführt, über einen Übungsversuch verbessert werden, um sich an die neue Umgebung zu gewöhnen.

Blanchard et al. führen umfassende Untersuchungen zu den kognitiven Funktionen im Thy-1-APP-Modell durch und kommen zu dem Schluss, dass deutliche kognitive Defizite ab einem Alter von 7-8 Monaten eintreten (Blanchard et al. 2008; Blanchard et al. 2009; Blanchard et al. 2011). Das in der vorliegenden Studie gewählte Alter von 3-4 Monaten basierte auf der in früheren Studien zu diesem Zeitpunkt auftretenden mitochondrialen Dysfunktion, die jedoch in dieser und auch anderen Studien nicht reproduziert werden konnte (vergleiche Kapitel 5.2.3).

Die insgesamt fehlende mitochondriale Dysfunktion und nicht eindeutige kognitive Dysfunktion schränken die Aussagekraft von Interventionen in diesem Modell stark ein, sodass die Effekte der Interventionen in der vorliegenden Arbeit nicht schwerpunktmäßig diskutiert werden.

5.4 Effekte der ExGrape Traubenextrakte auf die Alterung

Auf Grundlage einer zunehmenden Anzahl an Veröffentlichungen innerhalb der letzten 15 Jahre wird polyphenolreichen Früchten ein hohes neuroprotektives Potenzial, insbesondere hinsichtlich altersbedingter kognitiver und motorischer Beeinträchtigungen sowie der AD, zugesprochen (Poulose et al. 2017; Carey et al. 2017; Shih et al. 2010; Rojanathammanee et al. 2013; Hartman et al. 2006; Joseph et al. 2003). Besonders stark konzentrierten sich die Untersuchungen auf eine 2 %-blaubeerangereicherte Nahrung, die bei gealterten Ratten sowie Tiermodellen mit induziertem oxidativen Stress oder Entzündung kognitive und motorische Leistungen verbessern konnte (Carey et al. 2014; Casadesus et al. 2004; Duffy et al. 2008; Goyarzu et al. 2004; Shukitt-Hale et al. 2007). In den letzten Jahren werden zudem zunehmend günstige Effekte von Traubenprodukten veröffentlicht, die in Tiermodellen mit induziertem oxidativen Stress (Allam et al. 2013; Cardozo et al. 2013, 2013) oder an gealterten Tieren (Patki et al. 2015; Pervin et al. 2014) durchgeführt wurden. Gestärkt werden diese Hinweise von ersten Pilotstudien am Menschen, die eine Verminderung von altersbedingten kognitiven Defiziten (Krikorian et al. 2012; Krikorian et al. 2010) zeigen konnten sowie eine Verminderung von oxidativem Stress (Ghanim et al. 2011). Basierend auf den geringen Konzentrationen, die besonders im Gehirn nach polyphenolreicher Nahrung detektiert werden, wird davon ausgegangen, dass keine direkten antioxidativen Effekte für die protektiven Eigenschaften im Gehirn verantwortlich sind. Vielmehr könnten Polyphenole Effekte beispielsweise durch Veränderungen in der Signalgebung vermitteln. Nach der Hormesis-Theorie induzieren Polyphenole milden Stress im Organismus, einschließlich dem Gehirn, wodurch es zur Anregung u.a. neurotrophischer Faktoren, mitochondrialer Biogenese und antioxidativer Enzyme kommt. Somit könnten Polyphenole dem Nervensystem eine bessere Stressabwehr, bessere Funktionsfähigkeit und erhöhte Lebensfähigkeit verleihen (Murugaiyah and Mattson 2015; Lee et al. 2014). Die Hormesis-Theorie wird auch für die lebensverlängernden Effekte einer Kalorienreduktion vorgeschlagen, bei der vermutlich die NAD-abhängige Deacetylase SIRT1 eine wichtige Rolle spielt (Nakagawa and Guarente 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit der Traubenextrakt Acy über Mechanismen der Hormesis vor mitochondrialer Dysfunktion schützen kann und so Alterungsprozessen und Funktionsverlusten im Gehirn entgegenwirken kann. Der polyphenolreiche Extrakt enthielt 4,5 % Catechin/Epicatechin, 3,3 % Proanthocyanidin-Dimere, 4,6 % Proanthocyanidin-Tri-/Tetra-/Petamere, 27,1 % Proanthocyanidin-Polymere und 17,2 % Anthocyane. Der Resveratrolgehalt lag bei 0,007 %.

In PC12_{neo}-Zellen wurde zunächst der Effekt von Acy auf die mitochondriale Atmung und SNP-induzierte mitochondriale Dysfunktion untersucht. Daraufhin erfolgten drei Fütterungsstudien an Mäusen, in denen Daten zur Expression mitochondrien- und hormesisrelevanter Gene, Lebensspanne, altersbedingten mitochondrialen Dysfunktion sowie zum Gedächtnis und der Motorik erhoben wurden. Dazu erhielten C57BL/6J-Mäuse über einen Zeitraum von 3 Wochen (Kurzzeitstudie), 6 Monaten (Langzeitstudie) und über die gesamte Lebenszeit ab einem Alter von 6 Monaten (Lebenszeitstudie) Acy, umgerechnet in einer Dosis von 200 mg/kg KG pro Tag. In die Langzeitstudie wurde zudem zum Vergleich eine Gruppe von Mäusen eingeschlossen, welche die gleiche Menge Heidelbeer-Extrakt (HBE) erhielten.

5.4.1 Mitochondriale Dysfunktion im Zellmodell PC12

Der Effekt von Acy auf die mitochondriale Atmung und SNP-induzierte mitochondriale Dysfunktion wurde in PC12_{neo}-Zellen untersucht und mit Res verglichen, einem Traubenextrakt mit abweichendem Polyphenolprofil. Res (5,0 % Anthocyane, 45,3 % Proanthocyanidine und 0,41 % Resveratrol) weist im Gegensatz zur Variante Acy (17,2 % Anthocyane, 35,2 % Proanthocyanidine und 0,007 % Resveratrol) einen geringeren Anteil an Anthocyanen und dafür höheren Anteil an Proanthocyanidinen und Resveratrol auf (vergleiche Tab. 3.1). Auf Grundlage der umfangreichen Metabolisierung von TOP sollte zudem die Phenolsäure Syringasäure als Abbauprodukt der enthaltenen Anthocyane untersucht werden sowie DOPAC als ein Abbauprodukt von Proanthocyanidinen. Die wichtigsten Befunde der Zellkulturexperimente sind in Tab. 5.2 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 5.2: Zusammenfassung der Effekte von ExGrape Traubenextrakten, Syringasäure und DOPAC in PC12_{neo}-Zellen

	ATP-Konzentration nach SNP-Stress	MMP nach SNP-Stress	Mitochondriale Atmung	CS	Proteincarbonyle nach SNP-Stress
Acy	↑ [25; 50 µg/ml]	↑ [25 µg/ml]	→	→	→
Res	↑ [25; 50 µg/ml]	→			
Syringasäure	→	→			→
DOPAC	↑ [10; 25 µM]	→	→	→	→

↑: signifikante Erhöhung, →: kein Effekt; CS: Citratsynthase; MMP: Mitochondriales Membranpotenzial; SNP: Natriumnitroprussid

5.4.1.1 ExGrape Acy und Res

Zur Nachahmung einer altersbedingten mitochondrialen Dysfunktion wurden PC12_{neo}-Zellen mit SNP behandelt. Acy konnte die verminderten ATP-Spiegel sowie die Beeinträchtigung des MMPs abmildern. Res zeigte sich hinsichtlich der ATP-Spiegel noch potenter als Acy und steigerte in der Konzentration 50 µg/ml die ATP-Konzentrationen SNP-gestresster Zellen auf das 1,7-fache der gestressten Kontrollzellen, im Vergleich zu einer Erhöhung auf das 1,4-fache durch Acy. Basal, ohne die Induktion einer mitochondrialen Dysfunktion, zeigten Acy und Res keine günstigen Effekte auf den Energiemetabolismus der PC12_{neo}-Zellen. Die hochauflösende Respirometrie brachte nach 24 h-Inkubation mit 50 µg/ml Acy keinen Effekt auf die mitochondriale Atmungsaktivität oder die CS als Marker der mitochondrialen Masse hervor. Eine 7 h- und 24 h-Inkubation mit Acy oder Res konnte zudem die basalen ATP-Konzentrationen nicht erhöhen und hatte keinen Einfluss auf das MMP. Die höchste Konzentration, 50 µg/ml, erbrachte demgegenüber einen signifikanten Rückgang der ATP-Spiegel, der auf einer beginnenden Toxizität oder auch Interaktion dieser hoch angesetzten Konzentration mit der Biolumineszenz-basierten ATP-Messung (Weyermann et al. 2005) beruhen könnte. Die Inkubation mit Acy und Res in geringeren Konzentrationen (1-10 µg/ml) und somit in einem Bereich, der näher an den *in vivo* zu erreichenden Konzentrationen liegt, hatte keinen Einfluss auf die ATP-Spiegel. Die Extrakte Acy und Res konnten folglich vor SNP-bedingter mitochondrialer Dysfunktion schützen, hatten jedoch keinen günstigen Einfluss auf den basalen Energiestoffwechsel.

Die Behandlung mit SNP ruft in Zellen nitrosativen und oxidativen Stress hervor und führt so zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion (vergleiche Kapitel 5.1.). Martín et al. (2013) beobachteten in PC12-Zellen nach 24 h-Vorbehandlung mit Rotwein [7 – 14 µl/ml] einen Schutz vor oxidativem Stress, der durch H₂O₂ oder H₂O₂ + FeSO₄ ausgelöst wurde. Zudem wirkten auch die enthaltenen einzelnen Polyphenole in Konzentrationen von 25-250 µM protektiv gegenüber H₂O₂ + FeSO₄-Stress, konnten intrazelluläre ROS-Level senken [250 µM] und die Proteinexpression und Aktivität antioxidativer Enzyme erhöhen [100 und 250 µM] (Martín et al. 2013). Im Gegensatz zu diesen von Martín et al. erfassten antioxidativen Mechanismen und dem hier beobachteten Schutz hinsichtlich der SNP-vermittelten mitochondrialen Dysfunktion, konnte Acy [50 µg/ml] in der vorliegenden Arbeit keinen Effekt auf SNP-induzierte oxidative Schäden, erfasst als Proteincarbonyle, vermitteln. Für den Extrakt Acy liegen keine Angaben hinsichtlich des Gehalts einzelner Polyphenole zur Berechnung und zum Vergleich von

Stoffmengenkonzentrationen vor. Die beiden Hauptkomponenten im Extrakt waren Anthocyane (17,2 %) sowie Proanthocyanidine mit unterschiedlichem Polymerisierungsgrad (35,2 %). Für Anthocyane würde sich daraus berechnet über das Molekulargewicht von Malvidin-3-Glucosid bei 50 µg/ml Acy eine Konzentration von 17 µM Anthocyanen ergeben. Die eingesetzten Konzentrationen sind somit geringer einzuschätzen als die Einzelkomponenten in der Studie von Martín et al. (2013). Weiterhin erfolgte die Vorbehandlung in der vorliegenden Arbeit nur für 1 h und nicht für 24 h. Eine mögliche höhere zellprotektive Eigenschaft nach längerer Vorinkubation wird in Kapitel 5.4.1 ausführlicher diskutiert. In Hinblick auf den Schutz vor dem SNP-induzierten Abfall der ATP-Spiegel zeigte sich Res mit weniger enthaltenen Anthocyanen und höherem Anteil an Proanthocyanidinen und Resveratrol potenter als die Acy-Variante. Diese Beobachtung weist daraufhin, dass die Effekte nicht ausschließlich von den enthaltenen Anthocyanen ausgehen. Eine Untersuchung der Einzelfractionen des Extrakts könnte in diesem Zusammenhang weiterführende Erkenntnisse liefern. Eine Betrachtung der Einzelfractionen wäre auch dahingehend bedeutend, da Fruchtextrikte auch noch andere Komponenten als Polyphenole enthalten können, die sich auf ihr neuroprotektives Potenzial auswirken (Strathearn et al. 2014).

Strathearn et al. (2014) führten eine umfassende Untersuchung zu den Effekten verschiedener Polyphenole aus Fruchtextrikten bei einer Behandlung mit dem mitochondrialen Komplex I-Inhibitor Rotenon durch. Sie fanden beispielsweise, dass Traubenkernextrakt sowie Resveratrol in Primärkulturen des Mittelhirns protektiv gegenüber Rotenon wirken konnte, wohingegen Traubenschalenextrakt mit Resveratrol ineffektiv bleibt. Weiterhin zeigte die Untersuchung der Effekte verschiedener Extrakte mit gleichem Gesamtpolyphenolgehalt, dass Extrakte mit Anthocyanen und/oder Proanthocyanidinen potenter vor Rotenon schützen als Extrakte mit anderen Polyphenolen wie Stilbenen. In MES23.5-neuronalen Zellen konnte zudem der Traubenkernextrakt, aber nicht der Traubenschalenextrakt die mitochondriale Atmung unter Rotenon-Einfluss verbessern (Strathearn et al. 2014). Diese Untersuchungen machen die Bedeutung des Polyphenolprofils in Hinblick auf die Effekte von Traubenextrikten deutlich.

Acy ist ein Traubenextrakt mit sehr geringem Resveratrolgehalt (0,007 %). Res dagegen ist ein Extrakt aus Traubenschale und -kernen mit zusätzlicher Resveratrol-Anreicherung (0,41 %), der zudem auf einen höheren Gesamtpolyphenolgehalt standardisiert ist. In welchem Umfang Resveratrol zu den Effekten auf SNP-Stress in dieser Arbeit beigetragen hat, bleibt offen. Bei einer Inkubation mit 50 µg/ml beträgt die Konzentration von Resveratrol über Acy 15 nM und über Res 0,9 µM. In der Studie von Siddiqui et al. (2010) schützte die 24 h-Vorbehandlung von PC12-Zellen mit Resveratrol signifikant vor oxidativem Stress, der durch 4-Hydroxynonenal,

einem Nebenprodukt der Lipidperoxidation, ausgelöst wurde. In Konzentrationen von 5-25 μM konnte Resveratrol die Bildung von ROS vermindern, intrazelluläre GSH-Level erhöhen sowie Veränderungen der mitochondrienvermittelten Apoptose entgegenwirken (Siddiqui et al. 2010). Neben den hier eingesetzten höheren Konzentrationen fand die Vorinkubation über 24 h gegenüber 1 h in der vorliegenden Arbeit statt. In einer weiteren Studie mit PC12-Zellen konnte die 24 h-Vorbehandlung mit Resveratrol vor den Effekten des Komplex I-Inhibitors Rotenon schützen. Resveratrol wirkte den verminderten ATP-Spiegeln, erhöhten ROS-Level und der verminderten mitochondrialen Biogenese entgegen. Die Autoren postulieren, dass für die beobachtete Expression von wichtigen neuroprotektiven Genen und Proteinen eine ausreichende Inkubationszeit notwendig ist. In SH-SY5Y-Zellen wirkte Resveratrol nach einer Vorbehandlung über 24 h, aber nicht 1 h protektiv (Peng et al. 2016b).

Entscheidende Faktoren in Hinblick auf die antioxidativen und mitoprotektiven Effekte von Traubenextrakten könnten somit das Polyphenolprofil und die Zeitspanne der Vorbehandlung sein.

5.4.1.2 ExGrape-Metabolite

Traubenpolyphenole können im Organismus einem umfangreichen Metabolismus unterliegen. Es ist somit anzunehmen, dass im Gehirn vornehmlich Metabolite von Traubenpolyphenolen vorliegen (siehe Kapitel 1.3.5). In der vorliegenden Arbeit wurden daher als erster Schritt in Richtung der Untersuchung von möglichen *in vivo* Metaboliten die Effekte möglicher Abbauprodukte von Anthocyanen und Proanthocyanidinen untersucht.

Die Phenolsäure Syringasäure, die aus dem Hauptweinanthocyan Malvidin-3-Glucosid durch spontanen Zerfall bei neutralem pH-Wert oder durch Mikrobiota-Einwirkung entstehen kann (siehe Abb. 1.8), zeigte in Konzentrationen von 1-100 μM keine Effekte auf die ATP-Spiegel, das MMP oder SNP-bedingte oxidative Schäden. Auch der protektive Effekt der ExGrape Extrakte auf die SNP-bedingte mitochondriale Dysfunktion konnte für Syringasäure nicht beobachtet werden. Vergleichbare Untersuchungen wurden nicht für das Abbauprodukt von Malvidin, aber für das Abbauprodukt von Cyanidin identifiziert. Tarozzi et al. untersuchten den Effekt einer 2 h-Vorbehandlung mit Cyanidin-3-Glucosid und seinen Abbauprodukten Cyanidin und der korrespondierenden Phenolsäure Protocatechusäure in Konzentrationen von 25-100 μM auf H_2O_2 -induzierten oxidativen Stress in SH-SY5Y-Zellen. Während Cyanidin-3-Glucosid vor ROS in der Membranfraktion schützen konnte, vermittelte Protocatechusäure seinen antioxidativen Effekt in der Zytosolfraktion. Beide Metabolite, jedoch nicht Cyanidin-3-Glucosid, konnten vor Apoptose und DNA-Fragmentierung schützen. Keine Effekte gingen von Konzentrationen $< 25 \mu\text{M}$ aus (Tarozzi et al. 2007). In PC12-Zellen konnte Protocatechusäure

zudem vor mitochondrialer Dysfunktion und Apoptose schützen, die durch die Komplex I-Inhibitoren Rotenon und 1-Methyl-4-Phenylpyridinium ausgelöst wurden (Guan et al. 2006; Liu et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin DOPAC als gemeinsames Abbauprodukt von Proanthocyanidinen (siehe Abb. 1.9) und Hy (siehe Abb. 1.10) untersucht. DOPAC konnte dem SNP-bedingten Abfall der ATP-Spiegel in PC12_{neo}-Zellen in einer Konzentration von 10 und 25 µM vergleichbar mit ExGrape entgegenwirken. Kleinere Konzentrationen von 0,5-5 µM hatten keinen Effekt. Auch hinsichtlich der mitochondrialen Atmung in der hochauflösenden Respirometrie sowie oxidativer Schädigungen (Proteincarbonyle) nach SNP-Behandlung hatte DOPAC (10 µM) keine Effekte. Da DOPAC eng in Zusammenhang mit Hy steht, werden die Ergebnisse in Zusammenhang mit Hy im nächsten Kapitel nochmals aufgegriffen.

Mit Syringasäure und DOPAC wurden die Effekte zweier möglicher Abbauprodukte von Traubenpolyphenolen isoliert betrachtet. Ein weiterer Ansatz, um die Effekte von *in vivo* Metaboliten von Traubenpolyphenolen zu untersuchen, ist ein Co-Kultur-Modell, in dem die Testsubstanzen zunächst eine Barriere aus intestinalen Zellen überqueren müssen, bevor sie die Zielzellen erreichen (Kuntz et al. 2015). Besonders monomere Flavanole wurden nach Aufnahme von Traubenpolyphenolen hauptsächlich als Konjugate wiedergefunden (siehe Tab. 1.2). Die Untersuchung konjugierter Verbindungen wäre somit ein nächster wichtiger Ansatzpunkt.

Noch näher an der *in vivo* Situation wäre der Einsatz von Polyphenolen im Zellmodell, die aus dem Plasma von Probanden nach Aufnahme von Polyphenolen isoliert wurden (Kuntz et al. 2017). Auch die Untersuchung von Polyphenolmetaboliten aus einer *in vitro* Digestion kann wertvolle Hinweise liefern. Physiologische Konzentrationen an Metaboliten, die aus der Digestion von wilden Brombeeren erhalten wurden, konnten in H₂O₂-stimulierten humanen Neuroblastomzellen SK-N-MC ROS-Level vermindern, GSH-Konzentrationen regulieren, das MMP aufrechterhalten und die KAT aktivieren (Tavares et al. 2013).

Zusammenfassend konnten die Traubenextrakte Acy und Res eine mitochondriale Dysfunktion, die in PC12_{neo}-Zellen durch SNP ausgelöst wurde, signifikant vermindern. Hinsichtlich der ATP-Spiegel zeigte sich Res, mit geringerem Anthocyananteil sowie einem höheren Anteil an Proanthocyanidinen, Resveratrol und Gesamtpolyphenolgehalt, potenter als Acy. DOPAC als mögliches Proanthocyaninabbauprodukt zeigte gleichermaßen einen Schutz vor SNP, wohingegen Syringasäure als Abbauprodukt von Anthocyanen keinen Schutz vor mitochondrialer

Dysfunktion bot. Die Untersuchung von *in vivo* Metaboliten sollte für weiterführende Untersuchungen in Hinblick auf die mitochondriale Funktion im Zellmodell intensiviert werden.

Traubenpolyphenole können ihre protektiven Effekte vermutlich über die Beeinflussung verschiedener zell- und mitoprotektiver Signalwege vermitteln, die im nächsten Abschnitt anhand der Genexpressionsanalysen im Leber- und Hirngewebe nach der Fütterung mit Acy beleuchtet werden.

5.4.2 Genexpression im Mausmodell C57BL/6J

Auf Grundlage der Annahme, dass Traubenpolyphenole über hormesisvermittelte Signalwege günstige Effekte auf die mitochondriale Funktion im alternden Gehirn haben können, wurde die Expression von Genen studiert, die mit dieser in Zusammenhang stehen. Herangezogen für diese Untersuchungen wurde Leber- und Gehirngewebe von 19 Monate alten C57BL/6J-Mäusen der Langzeitstudie nach 6-monatiger Fütterung mit Acy (200 mg/kg KG). Abb. 5.1 liefert eine Zusammenfassung der Ergebnisse. Die Fütterung mit Acy führte sowohl im Gehirn als auch in der Leber zu einem signifikanten Anstieg der SIRT1-Genexpression, dessen Ausmaß über die Aufhebung des altersbedingten Rückgangs hinausging. SIRT1 ist ein intrazellulärer Energiesensor, der auf hohe NAD^+ -Konzentrationen reagiert und durch seine NAD^+ -abhängige Deacetylase-Aktivität u.a. PGC1 α aktiviert (Murugaiyah and Mattson 2015). Eine Steigerung der SIRT1-Aktivität ist durch AMPK möglich, einem weiteren Energiesensor, der bei einem hohen Verhältnis von AMP+ADP zu ATP aktiviert wird. AMPK hebt die intrazelluläre NAD^+ -Konzentration an und steigert so die SIRT1-Aktivität, welche wiederum die AMPK-Aktivierung erhöhen kann (Brenmoehl and Hoeflich 2013). Auf Ebene der Genexpression wurde in der vorliegenden Studie im Gegensatz zu SIRT1 kein signifikanter Effekt auf AMPK festgestellt, weder hinsichtlich des Alters noch der Acy-Fütterung. Ein über den AMPK, SIRT1-PGC1 α -Signalweg vermittelter Schutz vor mitochondrialer Dysfunktion konnte beispielsweise *in vitro* für das Traubenkernproanthocyanidin B2 (Bao et al. 2015; Cai et al. 2016) sowie bei Ratten für Traubenkernextrakt gezeigt werden (Bao et al. 2014). SIRT1 und AMPK können PGC1 α aktivieren oder auch seine Genexpression in Gegenwart des PGC1 α -Proteins hochregulieren (Brenmoehl and Hoeflich 2013). Die Regulierung der PGC1 α -vermittelten mitochondrialen Biogenese hat beispielsweise vermutlich eine Schlüsselrolle bei dem Effekt von SIRT1 bei der Kalorienrestriktion (Murugaiyah and Mattson 2015).

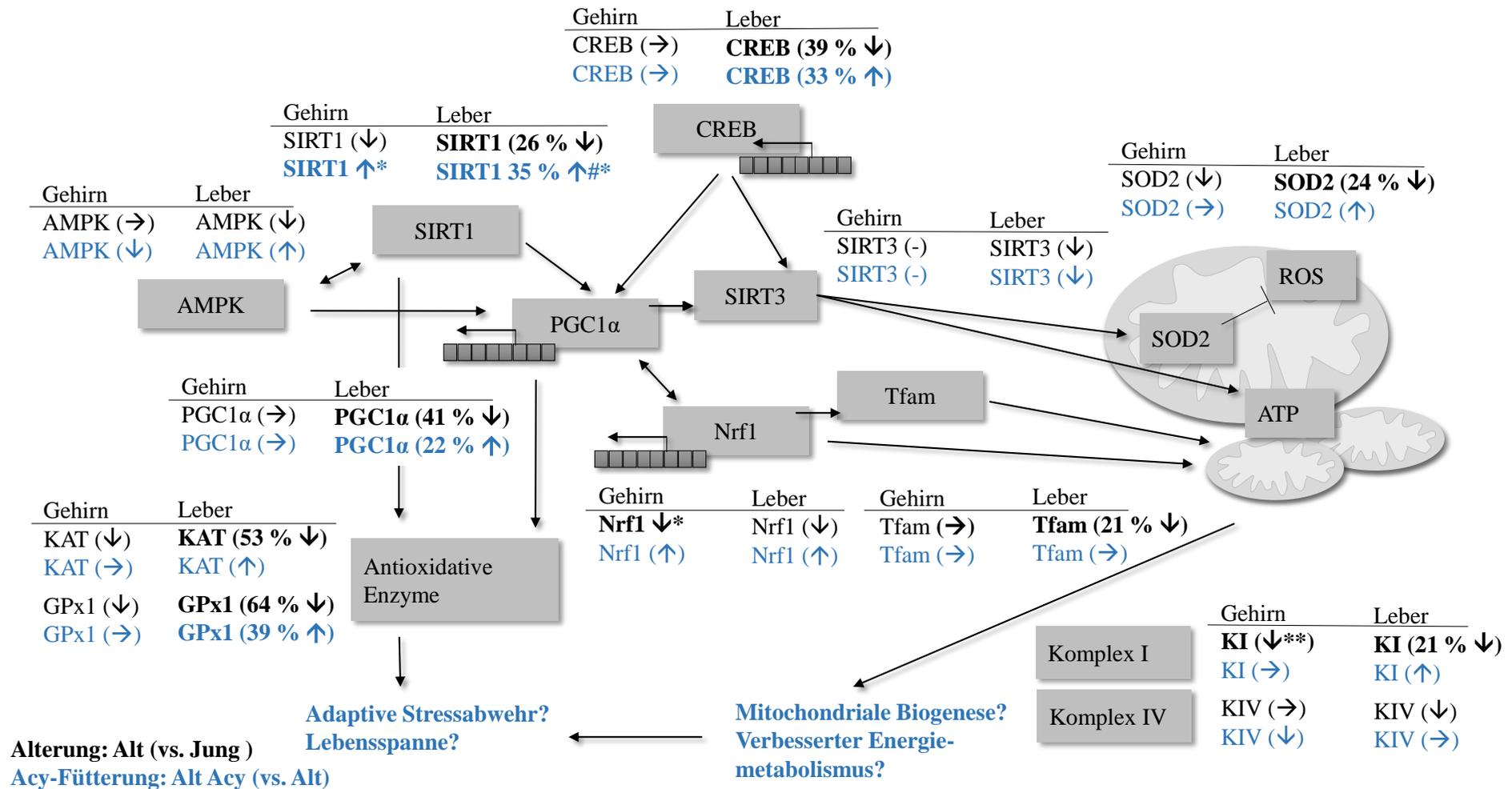


Abb. 5.1: Zusammenfassung der Effekte von Acy auf die Genexpression in Gehirn und Leber der C57BL/6J-Mäuse. ↑/↓: Erhöhung/Erniedrigung, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Alt vs. Jung, #* $p < 0,05$ Alt Acy vs. Alt, (↑/↓): tendenzieller Effekt, Alt vs. Jung (schwarz), Alt Acy vs. Alt (blau), bei deutlichen numerischen Effekten mit Angabe der Veränderung (% absolut)

Generell wird die mitochondriale Biogenese induziert, um einen veränderten Energiebedarf zu decken, wie beispielsweise auch bei zellulärem Stress. Sie wird über Sensoren des Energiehaushalts oder über Ca^{2+} -abhängige Signalwege vermittelt (Brenmoehl and Hoeflich 2013; Ryan and Hoogenraad 2007). Ein Schlüsselfaktor bei dem Ca^{2+} -abhängigen Signalweg ist der Transkriptionsfaktor CREB, der durch CaMKIV aktiviert wird. In Folge kommt es zur Expression zahlreicher Gene wie SIRT3, PGC1 α und Tfam (vergleiche Kapitel 1.3.7). Die Genexpression von CREB lag in der Leber alter Mäuse gegenüber derer junger Mäuse um fast 40 % (absolut) reduziert vor und konnte durch die Acy-Fütterung zu großen Teilen wieder aufgehoben werden. Aufgrund der starken Abweichungen innerhalb der Tiergruppen wurden jedoch mit Ausnahme des Effekts auf SIRT1 generell keine signifikanten Änderungen festgestellt. Im Gehirn zeigte die Genexpression von CREB und PGC1 α dagegen keine Unterschiede. Andere Studien liefern Hinweise, dass Traubenpolyphenole über die Aktivierung von CREB günstige Effekte auf das Gehirn ausüben können. In C57BL/6J-Mäusen konnte das kontextabhängige Gedächtnis durch die Gabe einer Traubenpolyphenolmischung teilweise über die Aktivierung von CREB verbessert werden (Zhao et al. 2015). Der im Gehirn von Ratten detektierte Epicatechin-Metabolit 3'-O-Methylepicatechin-5-O- β -Glucuronid konnte weiterhin in Hippocampus-Schnitten über den CREB-Signalweg die basale synaptische Übertragung sowie die LTP verbessern (Wang et al. 2012a).

PGC1 α , als Masterregulator der mitochondrialen Biogenese, erhöht die Genexpression von Nrf1, welches wiederum die Genexpression von Tfam hochreguliert. Über diesen Mechanismus wird die Transkription der Proteine der mitochondrialen Komplexe hochreguliert, die in der mtDNA kodiert sind (Brenmoehl and Hoeflich 2013; Ryan and Hoogenraad 2007). Im Gehirn alter Mäuse wurde in der vorliegenden Arbeit eine signifikant verminderte Genexpression von Nrf1 vorgefunden, die durch Acy tendenziell leicht verbessert wurde. Keine Änderung wurde für die Genexpression von Tfam beobachtet. In der Leber konnte bei alten Tieren eine tendenziell leichte Verminderung von Nrf1 detektiert werden, die durch Acy aufgehoben wurde. In der Leber wurde auch ein Rückgang der Genexpression von Tfam um ca. 20 % (absolut) vorgefunden, der von Acy jedoch unbeeinflusst blieb.

Neben mitochondrial-kodierten Genen ist PGC1 α auch maßgeblich in die Regulation der Transkription nukleär-kodierter mitochondrialer Gene involviert. Über die Expression von Nrf1 und Nrf2 wird die Expression einer Vielzahl von Proteinen einschließlich der nukleär-kodierten mitochondrialen Komplexe reguliert (Yin et al. 2014; Ryan and Hoogenraad 2007). In der vorliegenden Studie wurde die Genexpression der im Zellkern kodierten Untereinheiten von Komplex I (Ndufv1) und IV (Cox5A) untersucht. In beiden Gewebetypen zeigten sich gegenüber

jungen Tieren Verminderungen des Komplexes I um ca. 20 % (absolut) (signifikant nur im Gehirn). Acy konnte die Verminderung nur in der Leber numerisch zur Hälfte aufheben und führte zudem im Gehirn zu einer Verminderung der Komplex IV-Aktivität um knapp 20 % (absolut). Insgesamt lässt sich somit festhalten, dass Acy Gene der mitochondrialen Biogenese nur sehr gering beeinflusst hat.

Neben der mitochondrialen Biogenese ist PGC1 α ein wichtiger Regulator der antioxidativen Abwehr (Clark and Simon 2009; St-Pierre et al. 2006). Er kann beispielsweise die Expression von SIRT3 hochregulieren und so die Bildung von ROS beeinflussen (Kong et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass SIRT3 die Genexpression der SOD2 und KAT induziert (Sundaresan et al. 2009; Jacobs et al. 2008; Rangarajan et al. 2015). Die Veränderungen in der SIRT3-Expression waren in der vorliegenden Studie gering. Demgegenüber konnten für die antioxidativen Enzyme SOD2, KAT und GPx1 altersabhängige Verminderungen festgestellt werden, die zumindest in der Leber zum Teil durch Acy aufgehoben wurden. Trotz oftmals deutlichen Veränderungen waren diese Werte jedoch nicht signifikant. Die Verminderungen im Gehirn waren mit 10-15 % (absolut) gegenüber jungen Tieren relativ gering und konnten auch von Acy nicht beeinflusst werden. In der Leber hingegen zeigten SOD2 (24 % absolut) sowie deutlicher KAT und GPx1 (53-64 % absolut) starke Verminderungen in ihrer Genexpression. Die Fütterung mit Acy führte zu einer leichten Erhöhung der Genexpression der SOD2 und KAT und zu einer deutlichen, wenngleich nicht signifikanten Anhebung der GPx1 (39 % absolut).

Neben SIRT3 ist auch SIRT1 in der Lage antioxidative Enzyme über die Aktivierung anderer Mechanismen wie p53 und FOXO 3a zu vermitteln. Die Interaktion von SIRT1 mit p53 kann beispielsweise bei geringeren ROS-Konzentrationen eine antioxidative Antwort auslösen (Sablina et al. 2005; Webster et al. 2012). FOXO 3a ist Transkriptionsfaktor der SOD2 und kann die KAT induzieren (Webster et al. 2012; Chung et al. 2010). Ein weiterer Signalweg der antioxidativen Abwehr wird über den Transkriptionsfaktor *Nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (NFE2L2) in Folge von oxidativem Stress oder dem Einfluss von Polyphenolen induziert (Denzer et al. 2016; Dinkova-Kostova and Abramov 2015; Lee et al. 2014). Der Transkriptionsfaktor trägt oftmals auch die Abkürzung Nrf2 und sollte daher nicht mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Transkriptionsfaktor Nrf2 (*Nuclear respiratory factor 2*) verwechselt werden (Baldelli et al. 2013). NFE2L2 bindet nach seiner Ablösung von dem *Kelch-like ECH associated protein 1* (Keap1) an das im Zellkern befindliche *Antioxidant responsive element* (ARE), wodurch die Expression einer Reihe antioxidativer Enzyme einschließlich GPx, KAT und SOD induziert wird (Denzer et al. 2016; Dinkova-Kostova and Abramov 2015; Lee

et al. 2014). Diese Faktoren wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, könnten aber über die Hochregulierung der Genexpression von SIRT1 in die antioxidative Antwort im Lebergewebe involviert gewesen sein.

Die stärker ausgeprägten Effekte der Acy-Fütterung auf die Genexpression in der Leber im Vergleich zum Gehirn könnte Folge einer unterschiedlichen Verfügbarkeit von Polyphenolen bzw. deren Metaboliten in den unterschiedlichen Geweben sein. Es konnte gezeigt werden, dass Polyphenole aus Traubenkernextrakt hauptsächlich in der Leber und der Niere und somit den primären Organen des Polyphenolmetabolismus präsent sind (Margalef et al. 2015b). Auf Grundlage der Annahme, dass nicht alle Polyphenol-Metabolite in gleichem Ausmaß die BBB passieren können (vergleiche Kapitel 1.3.6) ist zudem eine unterschiedliche Verteilung von Metaboliten wahrscheinlich (Margalef et al. 2015b; Arola-Arnal et al. 2013). Weiterhin können die vermittelten Signalwege in den verschiedenen Geweben variabel sein. So finden Nemoto et al. in PC12-Zellen eine Reduzierung der transkriptionellen Aktivität von PGC1 α nach SIRT1-Aktivierung sowie einen verminderten oxidativen Metabolismus (Nemoto et al. 2005). Die Aktivierung von PGC1 α und die daraus folgende verbesserte mitochondriale Funktion durch die Aktivierung von SIRT1 in Reveratrol-gefütterten Mäusen konnte in Muskeln und braunem Fettgewebe, jedoch nicht im Herzen gefunden werden (Lagouge et al. 2006). In der Leber konnte die Fütterung von Mäusen mit Resveratrol eine Verminderung von oxidativem Stress einschließlich einer Enzymerhöhung von GPx und SOD vermitteln, die mit der Induktion von SIRT1 und AMPK verbunden war (Zhu et al. 2014).

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Studie über die 6-monatige Fütterung mit Acy im Gehirn von gealterten C57BL/6J-Mäusen lediglich eine signifikante Erhöhung der Genexpression von SIRT1 erreicht. Nachfolgende Parameter in der Signalkette der mitochondrialen Biogenese waren größtenteils nicht beeinflusst, die jedoch auch mit Ausnahme von Nrf1 von der Alterung unbeeinträchtigt blieben. Genauso wenig zeigten sich Effekte hinsichtlich CREB oder antioxidativer Enzyme.

In der Leber waren die Effekte im Allgemeinen deutlicher, jedoch durch eine große Streuung innerhalb der Gruppen mit Ausnahme der auch hier beobachteten Hochregulierung der SIRT1-Genexpression nicht signifikant. Hervorzuheben sind die, wenn auch nur numerischen Steigerungen der Genexpression von PGC1 α und CREB sowie der GPx, die den deutlichen altersbedingten Rückgang zu mindestens der Hälfte aufheben konnten.

Weiterführende Untersuchungen sind nötig, um zu klären, inwieweit sich die Veränderungen der Genexpression auch auf die Proteinkonzentrationen sowie Aktivitäten der Enzyme und Transkriptionsfaktoren auswirken.

5.4.3 Mitochondriale Dysfunktion im Mausmodell C57BL/6J

In der Kurzzeit- und Langzeitstudie wurden die Effekte der Verabreichung von Acy (200 mg/kg/KG) nach 3-wöchiger (Knopfkanüle) bzw. 6-monatiger Fütterung (Futterpellets) auf die mitochondriale Funktion gealterter C57BL/6J-Mäuse (19-22 Monate) untersucht. Tab. 5.3 fasst die gewonnenen Ergebnisse zusammen. Wie in Kapitel 5.2 bereits diskutiert, wird an dieser Stelle nochmals deutlich, dass dissoziierte Hirnzellen alter Tiere eine konstante mitochondriale Dysfunktion mit signifikant erniedrigten ATP-Spiegeln und einer signifikant veränderten Reaktion der ATP- und MMP-Werte auf SNP aufwiesen. Dementgegen konnte nur in der Kurzzeitstudie mit einer Standardpelletdiät und Acy-Gabe über die Knopfkanüle eine altersbedingte Verminderung der Komplex IV-Aktivität und tendenzielle Verminderung der Komplex I- und KI+KII-Atmung bezogen auf die CS ermittelt werden. In der Langzeitstudie mit antioxidanzienarmer Pelletdiät als Kontroll- und Basisfutter zur Anreicherung mit Acy konnten demgegenüber keine Unterschiede in der mitochondrialen Atmung nachgewiesen werden.

Die Verabreichung von Acy führte zu einer signifikant höheren CS-normierten KI+KII-Atmung und einer tendenziellen Erhöhung der Komplex I-Atmung nach Langzeitverabreichung, welche sich auch in der Kurzzeitstudie andeutete. Auch die basalen ATP-Konzentrationen zeigten nach Langzeitfütterung eine Tendenz hin zu einer höheren Konzentration. In Folge der Fütterung mit HBE lagen im Gehirn tendenziell erhöhte ATP-Konzentrationen vor, aber kein Effekt auf die mitochondriale Atmung. Die beobachtete numerische Anhebung des MMPs durch die 6-monatigen Extraktfütterungen war jedoch nach Acy-Fütterung stärker ausgeprägt als nach HBE-Fütterung. Zudem zeigten Acy-gefütterte Mäuse eine tendenziell höhere RCR. Die CS blieb in den Studien unverändert.

Tab. 5.3: Zusammenfassung mitochondrialer Effekte in der Kurzzeit- und Langzeitstudie mit Acy in C57BL/6J-Mäusen.

	<i>Kurzzeitstudie</i>		<i>Langzeitstudie</i>		
	Alt (vs. Jung)	Alt Acy (vs. Alt)	Alt (vs. Jung)	Alt Acy (vs. Alt)	Alt HBE (vs. Alt)
MMP basal	(↓)	→	(↓)	(↑)	(↑)
MMP nach SNP	↑	→	(↑)	→	→
ATP basal	↓	→	↓	(↑)	(↑)
ATP nach SNP	↑	(↓)	↑	→	(↓)
Mitochondriale Atmung	KI (↓) KI+KII (↓) KIV ↓	KI (↑) KI+II (↑)	→	KI (↑) KI+II ↑	→
CS	→	→	→	→	→

↑/↓ signifikante Erhöhung/Erniedrigung, (↑/↓): Tendenzieller Effekt, →: kein Effekt, mitochondriale Atmung stellt CS-normierte Werte dar; MMP: Mitochondriales Membranpotenzial, SNP: Natriumnitroprussid, K: mitochondrialer Komplex, Acy: nach Verabreichung von 200 mg/kg KG/Tag Acy

Auch wenn zunehmend mehr Untersuchungen zu den neuroprotektiven Effekten von Traubenprodukten unternommen werden, sind die Informationen hinsichtlich mitochondrialer Effekte im Gehirn sehr begrenzt. Einige Daten liegen zu den Effekten nach extern induzierter mitochondrialer Dysfunktion vor. Charradi et al. (2017) fanden nach 8-wöchiger Diät mit hohem Fettgehalt (40 %) im Rattengehirn eine gesteigerte Lipidperoxidation und Proteincarbonylierung, eine verminderte Aktivität der GPx und SOD sowie eine reduzierte Aktivität des mitochondrialen Komplexes I. Die Anreicherung der Diät mit 5 % eines Pulvers aus Traubenschale und -kernen (0,05 % Polyphenole in der Diät) konnte vor der Beeinträchtigung der Komplex I-Aktivität sowie oxidativen Schäden schützen (Charradi et al. 2017). In der vorliegenden Studie konnten zumindest auf Ebene der Genexpression keine Veränderungen der antioxidativen Enzyme im Gehirn festgestellt werden. Die Untersuchung der Enzymaktivitäten im Gehirn oder die Bestimmung der Proteincarbonylgehalte als Marker für oxidative Schädigungen im Gehirn der Tiere könnten weiteren Aufschluss über den Einfluss von Acy hinsichtlich der antioxidativen Aktivität liefern. Die Untersuchungen in PC12_{neo}-Zellen erbrachten keinen Hinweis auf einen Schutz von Acy gegenüber oxidativen Schädigungen (siehe Kapitel 5.4.1).

Bei Ratten, die durch Scopolamin-Behandlung eine zeitweilige Beeinträchtigung des Gedächtnisses erfuhren, konnten verminderte ATP-Konzentrationen im Hippocampus und zerebralen Kortex durch eine Behandlung mit 200 mg/kg KG (i. p.) Anthocyanen aus Traubenschale ver-

hindert werden (Gutierrez et al. 2012). Anthocyane, entstammend aus der violetten Süßkartoffel, konnten zudem die mitochondriale Dysfunktion im Hippocampus von Mäusen nach Behandlung mit dem Neurotoxin Domoinsäure vermindern. Die Gabe von 200 mg/kg KG über 4 Wochen führte zu einer verbesserten kognitiven Leistung, die scheinbar zum Teil durch die Induktion von Signalwegen der mitochondrialen Biogenese vermittelt wurde. Die Behandlung führte weiterhin zu Verminderungen der ROS-Konzentrationen, der Proteincarbonyle und der Apoptose (Lu et al. 2012). Hinweise auf eine höhere Expression von biogenesevermittelnden Genen vergleichbar mit Lu et al. (2012) wurden nach Fütterung mit Acy nicht beobachtet. Ein Grund dafür könnte sein, dass die erfasste Genexpression alter Mäuse generell keine eindeutige Verminderung zeigte. Während Nrf1 eine signifikante Verminderung aufwies, blieben PGC1 α und Tfam konstant. Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Traubenextrakt war mit 17,2 % besonders reich an Anthocyanen, sodass die milden Effekte auch hier zumindest zum Teil auf die Anthocyane zurückzuführen sein können. Der zum Vergleich eingesetzte HBE enthielt 36,5 % Anthocyane, konnte jedoch nur tendenzielle Effekte auf die ATP-Spiegel und keinen Effekt auf die mitochondriale Atmungsaktivität in der respiratorischen Messung vermitteln. Diese Unterschiede zwischen den beiden Extrakten könnten zum einen auf ein unterschiedliches Anthocyanprofil zurückzuführen sein – Mengenangaben zu einzelnen Anthocyanen liegen für die Extrakte nicht vor. Zum anderen können andere Polyphenole wie Flavanole einen Beitrag zum Effekt geleistet haben.

Generell sollte bei dem Vergleich der Effekte aus dieser Arbeit mit den anderen Studien der Unterschied zwischen extern induziertem Stress und der physiologischen Alterung nicht außer Acht gelassen werden.

Eine Erhöhung der mitochondrialen Atmung konnte in einigen Studien mit Beerenextrakten (Diamanti et al. 2014; Tang et al. 2015), Traubenkernproanthocyanidinen (Pajuelo et al. 2012) und Resveratrol (Yousuf et al. 2009, 2009) beobachtet werden. Die 8-wöchige Aufnahme von 2 g/Tag eines weiteren Traubenextrakts des ExGrape-Herstellers (mit gleichem Polyphenolprofil, aber geringerem Anthocyananteil) konnte zudem in einer Humanstudie einer fruktoseinduzierten verminderten mitochondrialen Atmung im Muskel entgegenwirken (Hokayem et al. 2013).

In Übereinstimmung mit den tendenziellen Effekten von Acy auf die Komplex I-Atmung in der vorliegenden Arbeit ist der mitochondriale Komplex I vermutlich ein spezielles Target, dass von Polyphenolen beeinflusst werden kann. Charradi et al. (2017) finden nach der Verabreichung von Traubenpolyphenolen im Gehirn von Ratten eine verminderte Beeinträchtigung von

Komplex I. Blaubeer- und Traubenkernextrakte reich an Proanthocyanidinen und/oder Anthocyanen konnten vor mitochondrialer Dysfunktion schützen, die über den Komplex I-Inhibitor Rotenon vermittelt wurde (Strathearn et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* kein Effekt von Acy auf den Komplex I beobachtet, jedoch wurden die Effekte auch nicht bei mitochondrialer Dysfunktion untersucht. Mitochondrien aus dem Herzen der Ratte, die eine ischämische Schädigung erfuhren, wiesen nach Behandlung mit Anthocyanen eine erhöhte Komplex I-Aktivität, verbesserte Atmung und erhöhte ATP-Produktion auf (Skemiene et al. 2015). Auch in HepG2-Zellen konnte Resveratrol die Komplex I-Aktivität erhöhen (Desquiret-Dumas et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit schützte Acy in HepG2-Zellen vor SNP-induzierter mitochondrialer Dysfunktion. Die Untersuchung der mitochondrialen Atmung wäre somit weiterführend interessant.

In weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Desquiret-Dumas et al. (2013) an Leberzellen der Maus konnte Resveratrol die NAD⁺-Konzentrationen erhöhen und SIRT3 aktivieren und in Folge die Enzyme des Citratzyklus stimulieren und die mitochondriale Atmung steigern. Die Aktivierung von SIRT3 erfolgte in ihren Studien nicht über AMPK oder die Induktion der mitochondrialen Biogenese (Desquiret-Dumas et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde auch keine erhöhte Genexpression von AMPK oder Hinweise auf eine mitochondriale Biogenese erfasst. Die erhöhte KI-KII-Atmung war jedoch auch nicht mit einer erhöhten SIRT3-Expression verbunden, sondern mit einer erhöhten SIRT1-Expression. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass Polyphenole auf unterschiedliche Weise Einfluss auf die mitochondriale Funktion nehmen können.

Zahlreiche Studien untersuchten im Mausmodell den Effekt von Resveratrol im Zusammenhang mit einer Aktivierung von SIRT1. In Mäusen mit APP/PS1 Doppelmutation, die mit Resveratrol gefüttert wurden, konnten Porquet und Kollegen (2014) ein besseres Kurzzeitgedächtnis bei dem Wiedererkennen von Objekten beobachten sowie eine Verminderung der Aβ-Plaques und eine erhöhte Proteinkonzentration von Synaptophysin als Marker der Synapsenanzahl. Weiterhin wurden erhöhte Proteinkonzentrationen von phosphoryliertem AMPK und dem mitochondrialen Komplex IV gefunden. Dementgegen waren die SIRT1-Level vermindert. Auf der Grundlage, dass auch andere Studien vorliegen, in denen keine Erhöhung von SIRT1 durch Resveratrol, jedoch vermehrt deacetyliertes PGC1α beobachtet wurde, postulieren die Autoren eine mögliche verminderte Synthese, jedoch erhöhte Aktivierung von SIRT1 bzw. dessen Regulierung über AMPK (Porquet et al. 2014). In der vorliegenden Studie wurden umgekehrte Ergebnisse erzielt. Zwar konnte eine erhöhte SIRT1-Genexpression beobachtet werden, jedoch keine erhöhte AMPK- oder PGC1α-Genexpression. Daten zu Proteinkonzentrationen oder zur

Aktivierung von PGC1 α oder SIRT1 liegen jedoch nicht vor. Studien an SIRT1-Knockout Mäusen weisen darauf hin, dass die Aktivierung von SIRT1 für die positiven Effekte von moderaten Dosen von Resveratrol (0,04 % einer fettreichen Diät) auf die mitochondriale Biogenese und Funktion (Atmung, MMP, ATP-Spiegel) im Muskel benötigt wird (Price et al. 2012). Hinsichtlich der Neurogenese im Hippocampus liegen jedoch kontroverse Daten zu der Vermittlung der Effekte von Resveratrol über SIRT1 vor (Dias et al. 2016). Der Anteil an Resveratrol im Acy liegt lediglich bei 0,007 %, sodass nur sehr geringe Mengen an Resveratrol über den Extrakt aufgenommen wurden. Für Anthocyane und Proanthocyanidine konnte jedoch eine Aktivierung von SIRT1 gezeigt werden (Jin et al. 2014; Aragonés et al. 2016; Cai et al. 2016).

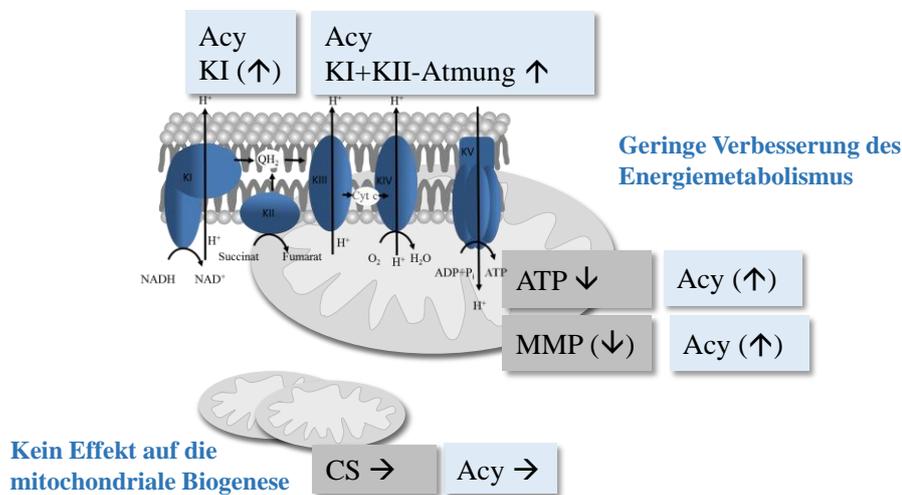


Abb 5.2: Zusammenfassung der Effekte von Acy auf die mitochondriale Funktion im Gehirn von C57BL/6J-Mäusen. Effekte in grauen Kästen stellen die Effekte der Alterung dar (Alt vs. Jung), Effekte in blauen Kästen stellen Effekte von Acy auf die Alterung dar (Alt Acy vs. Alt); Pfeile in Klammern: numerische Effekte, → : kein Effekt.

Zusammenfassend konnte die 6-monatige Verabreichung von Acy im Futter (200 mg/kg KG), aber nicht die 3-wöchige Verabreichung über die Knopfkanüle in gealterten Mäusen einen milden Effekt auf die mitochondriale Atmung erbringen. Die Acy-Fütterung führte zu einer signifikanten Erhöhung der mitochondrialen KI+KII-Atmung sowie zu einer tendenziellen Erhöhung der mitochondrialen Komplex I-Aktivität. Dieser Effekt war jedoch nur mit einer numerischen Verbesserung der altersbedingten Beeinträchtigungen der ATP-Spiegel und des MMPs verbunden (Abb 5.2). Zusammen mit der identifizierten Literatur weisen die Daten darauf hin, dass der mitochondriale Komplex I ein spezifisches Ziel für Polyphenole sein könnte. Einen Effekt auf die mitochondriale Biogenese vermittelte Acy nicht.

5.4.4 Gedächtnisleistung und Motorik während der Alterung im Mausmodell C57BL/6J

5.4.4.1 Gedächtnisleistung

Untersuchungen zur Gedächtnisleistung erfolgten in der Lebenszeitstudie sowie der Langzeitstudie mit Acy (200 mg/kg KG) anhand dem *Social Recognition* Test, dem *1-Trial-Y-Maze* und dem *Passive Avoidance* Test.

In der Lebenszeitstudie mit Acy im Trinkwasser wurde die Gedächtnisleistung im Alter von 12, 15, 18 und 21 Monaten im *Social Recognition* Test untersucht. Im Alter von 12 Monaten und somit nach 6-monatiger Acy-Verabreichung wurde anhand der Kontaktzeiten in der 2. Testphase eine signifikante Präferenz für die unbekannte Maus und somit soziale Gedächtnisleitung beobachtet, die in der Kontrollgruppe nicht auftrat. Nach diesem Zeitpunkt konnte weder für die Kontrollgruppe noch für die Acy-Gruppe eine Gedächtnisleistung ermittelt werden. Einen Vergleich mit jungen Mäusen lieferten die Langzeitstudien. In der Langzeitstudie mit Acy wurde der *Social Recognition* Test mit Mäusen im Alter von 1 Monat und 12 Monaten vor der Fütterung und 3 Monaten und 19 Monaten nach der Fütterung durchgeführt. Für keine Gruppe wurde eine Gedächtnisleistung beobachtet. Da dies, wie schon in Kapitel 5.3.1 diskutiert, auch die jungen Gruppen betraf, ist die Aussagekraft des *Social Recognition* Tests begrenzt.

Der *Passive Avoidance* Test eignet sich nicht für eine longitudinale Untersuchung, sodass der Test in der Lebenszeitstudie in einem Alter von 18 Monaten durchgeführt wurde sowie nach 6-monatiger Langzeitfütterung mit Acy und HBE im Alter von 19 Monaten. Signifikant höhere 24 h post *Step-through latencies* und somit Langzeiterinnerungsleistungen wurden für alle jungen und alten Gruppen beobachtet. Wie in Kapitel 5.3.1 bereits diskutiert, lag jedoch in beiden Studien eine numerisch höhere *Step-through latency* für die gealterten Mäuse gegenüber jungen Mäusen vor. Mäuse, die mit Polyphenolen behandelt wurden, zeigten eine tendenziell geringere Leistung. Für Acy trat dies besonders in der Lebenszeitstudie nach 12-monatiger Verabreichung auf. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte eine verminderte Ängstlichkeit durch die Polyphenolbehandlungen sein. Dies könnte weiterführend beispielsweise in einem Test zum Angstverhalten wie dem *Elevated Plus Maze* oder im *Open-field* getestet werden. Für C57BL/6J-Mäuse wird mit dem Alter ein zunehmendes Angstverhalten beobachtet (Shoji et al. 2016). Bei Ratten wurde beispielsweise im Alter ein erhöhtes Angstverhalten beobachtet, welches durch die 3-wöchige Gabe von Traubenextrakt im Trinkwasser vermindert werden konnte. Effekte auf das Gedächtnis im MWM wurden nicht beobachtet (Patki et al. 2015). Pitozzi et al.

(2010) finden bei gealterten Ratten einen angstlösenden Effekt nach 12-monatiger Fütterung mit polyphenolreichem Olivenöl. Hinweise auf derartige Effekte von Hy liegen aus der vorliegenden Studie nicht vor. Weiterhin konnte die Gabe von Resveratrol bei Ratten die negativen Auswirkungen von mildem chronischen Stress einschließlich einer geringeren lokomotorischen Aktivität entgegenwirken. Die Verbesserungen waren verbunden mit einer Erhöhung von BDNF und einer CREB-Aktivierung (Liu et al. 2014). Koivisto et al. (2016) beschreiben ebenso kontroverse Ergebnisse im *Passive Avoidance* Test bei Mäusen nach der Gabe von Natriumpyruvat. Die Forschergruppe findet u.a. ein verbessertes räumliches Gedächtnis und eine höhere Konzentration an energetischen Verbindungen im Gehirn, aber ebenso eine deutliche Beeinträchtigung im *Passive Avoidance* Test. Zudem beobachten sie ein erhöhtes Erkundungsverhalten nach Natriumpyruvatverabreichung. Die Autoren führen die kontroversen Ergebnisse auf das erhöhte Erkundungsverhalten der Mäuse zurück (Koivisto et al. 2016). Nach 6-monatiger Gabe von Acy wurde eine erhöhte mitochondriale Atmung sowie tendenziell erhöhte ATP-Spiegel im Gehirn beobachtet. Die verminderte Leistung im *Passive Avoidance* Test war in der Lebenszeitstudie nach 12-monatiger Acy-Verabreichung deutlich. Zudem wurde in der Lebenszeitstudie im *Y-Maze* nach 15-18-monatiger Behandlung im Vergleich zur Kontrolle ein erhöhtes Erkundungsverhalten, gemessen an den Eintritten in das *Y-Maze*, detektiert (näher erläutert in Kapitel 5.4.4.2). Acy könnte somit besonders nach langer Verabreichungsperiode wie der Lebenszeitstudie einen Effekt auf das explorative Verhalten der Mäuse haben. Ein verbesserter Energiemetabolismus nach dieser langen Fütterungsperiode ist möglich, konnte jedoch auf Grund des „Lebenszeit“-Charakters der Studie nicht erfasst werden. Generell können Veränderungen des Stresslevels während der Tests (beispielsweise durch Umweltfaktoren) genauso wie chronischer Stress (beispielsweise bedingt durch die Bewältigung von mehreren Verhaltenstests) die Leistung der Mäuse in den Verhaltenstests beeinflusst haben. Hat die Behandlung einen Einfluss auf den Stresslevel, erschwert dies die Bewertung der Ergebnisse des Tests.

Signifikante Effekte von Acy auf das räumliche Gedächtnis im *Y-Maze* konnten nicht detektiert werden. Tendenziell höhere spontane Alternationsraten wiesen Tiere nach 6-monatiger Acy-Verabreichung in der Langzeitstudie und 18-monatiger Acy-Verabreichung in der Lebenszeitstudie auf. Die Unterschiede der spontanen Alternationsraten im *Y-Maze* waren insgesamt nicht sehr ausgeprägt und signifikante Unterschiede zwischen der Leistung junger und alter Tiere konnten nicht beobachtet werden. Der Einsatz komplexerer Tests wie beispielsweise das MWM oder RAM könnte möglicherweise bessere Ergebnisse erzielen (siehe Kapitel 5.3.1).

In Tests zum räumlichen Gedächtnis von komplexerer Natur konnten sowohl Trauben- als auch Blaubeerpolyphenole günstige Effekte bei Ratten und Mäusen erzielen (Vauzour 2014). Die Fütterung von C57BL/6J-Mäusen über 8 Wochen mit einem Trauben- und Blaubeerpulvergemisch (500 mg/kg KG) konnte altersbedingten Veränderungen in der Gedächtnisleistung, erfasst durch das MWM, im Alter von 18 Monaten entgegenwirken (Bensalem et al. 2016). Im Gegensatz zu Acy mit einem hohen Anteil an polymeren Proanthocyanidinen bestand das Extraktgemisch speziell aus Polyphenolen mit geringem Molekulargewicht. Eine bessere Bioverfügbarkeit der Polyphenole über das Extraktgemisch ist somit anzunehmen (vergleiche Kapitel 1.3.5). Reines Epicatechin konnte in C57BL/6J-Mäusen zudem beispielsweise besonders zusammen mit einem Laufrad das Gedächtnis im MWM verbessern (van Praag et al. 2007). Traubenkernproanthocyanidine konnten weiterhin bei Ratten die kognitiven Fähigkeiten verbessern (Asha Devi et al. 2011) und die 3-monatige Gabe von Traubepulver verbesserte das Gedächtnis gealterter Ratten im MWM, die einer fructosereichen Diät ausgesetzt waren (Chou et al. 2016). Reindeiro et al. (2013) zeigen sowohl für Blaubeeren als auch für deren äquivalente Mengen an Anthocyanen und Flavanolen nach 6-wöchiger Gabe günstige Effekte auf das räumliche Gedächtnis bei Ratten (Reindeiro et al. 2013). Ratten, die in einem Alter von 21 Monaten für 4 Wochen Resveratrol bekamen, zeigten im Alter von 24 Monaten ein besseres räumliches Gedächtnis im MWM und eine gesteigerte Neurogenese (Kodali et al. 2015). Ein Mix aus Traubenkernextrakt, Concord-Traubensaftextrakt und Resveratrol konnte bei C57BL/6J-Mäusen mit metabolischen Syndrom die synaptische Plastizität verbessern und in dem AD-Mausmodell J20 die kognitive Funktion im MWM erhöhen (Wang et al. 2014).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Fütterung mit dem Traubenextrakt Acy und dem Vergleichsextrakt HBE in den vorliegenden Tests keine eindeutige Verbesserung der Gedächtnisleistung hervorbringen konnte. Die verminderte *Step-through latency* im *Passive Avoidance* Test und die erhöhte lokomotorische Aktivität im *Y-Maze* könnte auf ein vermindertes Angstverhalten und erhöhtes Erkundungsverhalten gealterter Mäuse bei lebenslanger Fütterung mit Acy hinweisen. Die spontane Alternation im *Y-Maze* als einfacher Test des räumlichen Gedächtnisses konnte keine signifikanten Effekte zwischen alten und jungen Mäusen oder Behandlungsgruppen detektieren. Der Einsatz von komplexeren Tests könnte in diesem Zusammenhang weiteren Aufschluss liefern

5.4.4.2 Motorische Leistung

Die kognitive Alterung geht üblicherweise auch mit einer verminderten Leistung bei motorischen Funktionen einher (Ren et al. 2013). Untersuchungen von Ratten, Mäusen und Menschen zeigen eine altersabhängige, zunehmende Verminderung der motorischen Leistung. Aufgaben, die Gleichgewicht und Koordination involvieren, sind vermutlich besonders betroffene Bereiche (Joseph et al. 1983). Polyphenolreiche Früchte haben neben der kognitiven Leistung auch einen positiven Effekt auf die motorische Leistung gezeigt (Shukitt-Hale et al. 2015; Shukitt-Hale et al. 2007; Shukitt-Hale et al. 2009). Neben der Lebensspanne und der Gedächtnisleistung sollte in der Lebenszeitstudie in einer longitudinalen Untersuchung der Effekt der lebenslangen Verabreichung von Acy (200 mg/kg KG/Tag) auf motorische Funktionen der C57BL/6J-Mäuse erfasst werden.

Zur Beurteilung der Koordination und Balance wurde der Rotarod Test mit beschleunigter Geschwindigkeit durchgeführt. Die *Latency to fall* gibt dabei an, wie lange die Maus sich auf der zunehmend schneller rotierenden Stange fortbewegen kann, bevor sie herunterfällt. Der Test wurde im Alter von 6 Monaten vor Fütterungsstart begonnen und im 3-Monatsintervall bis zu einem Alter von 21 Monaten durchgeführt. Aufgrund der zunehmenden Gebrechlichkeit der Mäuse wurde der Test nach diesem Zeitpunkt eingestellt. Unterschiede zwischen den Leistungen der beiden Gruppen insgesamt wurden zu keinem Zeitpunkt detektiert. Innerhalb der Testperiode zeigte zudem weder die Kontrollgruppe noch die Acy behandelte Gruppe einen Abfall der Leistung mit dem Alter. Acy-gefütterte Mäuse zeigten nach 3-monatiger Behandlung einen signifikanten Leistungsanstieg gegenüber dem Basalwert, der über die weitere Untersuchungsperiode relativ konstant blieb. Da der Basalwert in der Acy-Gruppe tendenziell niedriger als der Basalwert der Kontrollgruppe lag, führte der Leistungsanstieg zu keiner Verbesserung gegenüber der Kontrollgruppe. Die Betrachtung der Leistung der Mäuse, eingeteilt in eine Gruppe mit schwacher basaler Leistung und starker basaler Leistung, machte deutlich, dass der Leistungsanstieg in der Acy-Gruppe auf die schwache Untergruppe zurückzuführen war. Diese Leistungsverbesserung könnte zum einen auf die Acy-Verabreichung zurückzuführen sein; zum anderen könnte sie auch durch die generell schlechtere Ausgangsleistung der Mäuse begünstigt worden sein.

In der longitudinalen Studie wurde keine junge Gruppe zum Vergleich mitgeführt. In einer umfassenden Studie zu den Veränderungen in C57BL/6J-Mäusen in den Altersmonaten 2-3, 3-4, 6-7, 8-10 zeigte sich eine signifikante Verminderung der Leistung auf dem Rotarod mit zunehmendem Alter (Shoji et al. 2016). Eigene Daten zum Leistungsvergleich gealterter und junger Mäuse liegen für NMRI-Mäuse aus der Studie mit RO- und ROEn-Intervention vor. Für NMRI-

Mäuse wurde im Alter von 12 Monaten mit 17 s eine *Latency to fall* beobachtet, die vergleichbar mit derer der C57BL/6J-Kontrollgruppe in der longitudinalen Studie zwischen dem Alter von 6-18 Monaten war (16-18 s). Die Leistung der 12 Monate alten NMRI-Mäuse war gegenüber jungen Mäusen (1 Monat alt) signifikant niedriger. Auch 6 Monate später und somit im Alter von 3 Monaten und 18 Monaten unterschied sich die Leistung der beiden NMRI-Gruppen signifikant. Die 18 Monate alte Gruppe zeigte zudem einen signifikanten Anstieg gegenüber ihrer basalen Leistung im Alter von 12 Monaten. Diese Beobachtungen sprechen zum einen für eine bessere Leistung von jungen Mäusen im Alter von 1-3 Monaten gegenüber älteren Artgenossen und zum anderen weisen sie auf eine mögliche Leistungsverbesserung von Gruppen mit schwacher basaler Leistung hin. Das Training auf dem Rotarod im 3-Monatsintervall in der longitudinalen Studie könnte somit die Leistung der C57BL/6J-Mäusen bis zum Alter von 21 Monaten aufrechterhalten haben. Möglich ist, dass ein Effekt der Acy-Behandlung erst bei einer verschlechterten Leistung aufgetreten wäre.

Ratten, die im fortgeschrittenen Alter mit 50 % Concord-Traubensaft im Trinkwasser behandelt wurden, zeigten beispielsweise eine verbesserte Leistung in motorischen Tests zur Balance, Koordination und Kraft (Shukitt-Hale et al. 2006). In einem Huntington-Mausmodell konnte die Verabreichung von 100 mg/kg KG Traubenkernextrakt die Motorkoordination auf dem Rotarod verbessern (Wang et al. 2010). Die Fütterung mit einer 2 %-blaubeerangereicherten Nahrung über 8 Wochen verbesserte zudem die Leistung von gealterten Ratten auf dem Rotarod (Shukitt-Hale et al. 2015). Die Autoren schreiben diese Effekte den enthaltenen Anthocyanen zu, die auch eine Hauptkomponente des hier eingesetzten Traubenextrakts waren. Abweichende Effekte einer 2 %-erdbeerangereicherten Nahrung mit anderem Anthocyanprofil in der gleichen Studie deuten jedoch auf einen unterschiedlichen Effekt einzelner Anthocyane hin (Shukitt-Hale et al. 2015).

Weiterhin wurde in der Studie von Shukitt-Hale et al. (2006), im Gegensatz zu der 50 %-Anreicherung, bei Ratten die 10 % Concord Traubensaft erhielten, eine Verbesserung der kognitiven und nicht der motorischen Leistung beobachtet. Neben dem Einfluss verschiedener einzelner Polyphenole könnte somit auch die Dosierung einen hohen Einfluss auf die motorische Leistung haben.

Zudem involvieren die Effekte auf die motorische Leistung vermutlich noch andere periphere Faktoren wie Veränderungen im Skelettmuskel und den Gefäßen (Shukitt-Hale et al. 2006). Eine mitochondriale Dysfunktion zeigt sich beispielsweise auch im alternden Skelettmuskel

und körperliches Training sowie Polyphenole können diese Veränderungen günstig beeinflussen (Rodriguez-Bies et al. 2016; Kang et al. 2013). Polyphenole werden zudem Effekte auf das Gefäßsystem zugeschrieben (Vauzour 2014).

Auch die lokomotorische Aktivität nimmt bei C57BL/6J-Mäusen mit zunehmendem Alter ab (Shoji et al. 2016). Gemessen als Anzahl der Eintritte in die Arme des *Y-Mazes* zeigten C57BL/6J-Mäuse der longitudinalen Studie schon mit Einführung des Tests im Alter von 21 Monaten eine deutlich geringere lokomotorische Aktivität, wenn man diese mit jungen C57BL/6J-Mäusen der Langzeitfütterungsstudien vergleicht. Die lokomotorischen Aktivitäten von Mäusen im Alter von 18-20 Monaten zeigten sowohl für den C57BL/6J -Stamm als auch für den NMRI-Stamm konstant signifikant geringere lokomotorische Aktivitäten im Alter. Die lebenslange Fütterung mit Acy konnte die lokomotorische Aktivität im Alter von 21 Monaten numerisch und im Alter von 24 Monaten signifikant verbessern. Dies könnte auf eine verbesserte Mobilität und somit verbessertes Erkundungsverhalten durch Acy hinweisen.

Abb. 5.3 fasst die Überlegungen zu den Effekten von Acy auf das Gedächtnis und die motorische Leistung zusammen.

Alt	Acy
Spontane Alternation im <i>Y-Maze</i> (↓)	Spontane Alternation im <i>Y-Maze</i> →/(↑)
Lokomotorische Leistung ↓	Lokomotorische Leistung →/↑
Rotarod (nach Training) →	Rotarod (nach Training) →
<i>Passive Avoidance Test</i> (↑)	<i>Passive Avoidance Test</i> (↓)

Geringe Verbesserung des räumlichen Gedächtnisses?
Einfluss auf Erkundungsverhalten?
Verminderung von Angst?

Abb. 5.3: Überlegungen zu den Effekten von Acy auf die Gedächtnisleistung und Motorik bei C57BL/6J-Mäusen. Effekte in grauen Kästen stellen die Effekte der Alterung dar (Alt vs. Jung), Effekte in blauen Kästen stellen Effekte von Acy auf die Alterung dar (Alt Acy vs. Alt); Pfeile in Klammern: numerische Effekte, → : kein Effekt.

5.4.5 Lebensspanne im Mausmodell C57BL/6J

Auf Grundlage der Annahme, dass Polyphenole über Mechanismen der Hormesis einen günstigen Effekt auf die Lebensspanne haben können, wurde eine Lebenszeitstudie mit dem Extrakt Acy an C57BL/6J-Männchen durchgeführt. Acy (200 mg/kg KG/Tag) wurde ab einem Alter von 6 Monaten bis zum Lebensende verabreicht und die Lebenszeiten der Mäuse dokumentiert. Der C57BL/6J-Mausstamm gehört zu den langlebigen Mausmodellen, dessen Lebensspanne vom *Jackson Laboratory* untersucht wurde. In zwei historischen Zusammenfassungen wurden

für 169 bzw. 57 Männchen mediane Lebensspannen von 851 bzw. 819 Tagen und somit 121 bzw. 117 Wochen festgehalten sowie eine mittlere Lebensspanne der letzten 10 % Überlebenden von 1074 Tagen (152 Wochen) (Jackson Laboratory 2015; Yuan et al. 2015). In der *Mouse Phenome* Datenbank des *Jackson Laboratory* wird weiterhin für 32 Männchen des C57BL/6J-Stamms eine mediane Lebensspanne von 894 Tagen (127 Wochen) und eine maximale Lebensspanne von 1140 Tagen (162 Wochen) angegeben. Letztere war die höchste beobachtete maximale Lebensspanne unter den Männchen der 31 untersuchten Inzucht-Stämme (Yuan et al. 2015).

In der hier durchgeführten Studie erhielten je 50 Männchen Acy im Trinkwasser oder die unangereicherte Kontrolle und es wurden Überlebenskurven (Kaplan-Meier) erstellt. Mit einer medianen Lebensspanne von 116 Wochen in der Kontrollgruppe wurde die vom *Jackson Laboratory* berichtete Lebenszeit in der vorliegenden Studie knapp unterschritten. Die mediane Lebensspanne der Acy-gefütterten Mäuse lag bei 122,5 Wochen und somit im Vergleich zur Kontrollgruppe um 5,6 % höher. Die Verabreichung von Acy führte zwischen dem Alter von 80 und 120 Wochen (18-27 Monate) zu einer Verschiebung der Überlebenskurve in Richtung einer längeren Lebenszeit. Dies ist ein Alterszeitpunkt, der für C57BL/6J-Mäuse laut dem *Jackson Laboratory* in die Lebensphase „gealtert“ eingeordnet werden kann. Das Alter von 18-24 Monaten wird mit einem Alter von 56-69 Jahren beim Menschen gleichgesetzt (Jackson Laboratory 2017a). Auch wenn sich die maximale Lebensspanne zwischen Spezies unterscheidet, zeigt die Lebenskurve verschiedener Spezies, wie Mensch und Maus, doch einen sehr ähnlichen Verlauf (Mitchell et al. 2015). Für die Lebensmonate 24 und 25 wich die Überlebenskurve der Acy-Gruppe signifikant von der Kontrollgruppe ab. Nach diesem Zeitpunkt glichen sich die Überlebenskurven der beiden Gruppen an. Mit knapp unter 140 Lebenswochen wiesen beide Gruppen fast identische mittlere Lebensspannen der letzten 10 % Überlebenden auf und unterschieden sich in den endgültigen Überlebenskurven nach dem Tod aller Mäuse nicht signifikant.

Resveratrol ist die bekannteste Verbindung unter den Polyphenolen, der ein lebensverlängernder Effekt, vermutlich über die Aktivierung von SIRT1, zugesprochen wird (Nikolai et al. 2015; Howitz et al. 2003). Eine Metaanalyse zu den Effekten von Resveratrol über die Spezies hinweg kam jedoch zu dem Schluss, dass der lebensverlängernde Effekt von Resveratrol nur in wenigen Spezies bisher eindeutig gezeigt werden konnte. Lebensverlängernde Effekte waren am stärksten in Hefen und Nematoden ausgeprägt und weniger aussagekräftig in höheren Spezies wie der Maus (Hector et al. 2012). Daten zu einer höheren Lebenszeit durch Resveratrol liegen

bisher für Mäuse vor, die Nahrung mit hohem Fettgehalt erhielten (Bonkowski and Sinclair 2016). Zudem konnte die Fütterung mit Resveratrol (1/kg Futter) ab einem Alter von 2 Monaten in einer kürzlichen Studie das Leben in SAMP8 Mäusen erhöhen sowie AD-Symptome lindern (Porquet et al. 2013).

Obwohl die Traubenschale eine gute Quelle für Resveratrol darstellt, ist der Resveratrolgehalt in dem hier untersuchten Traubenextrakt Acy relativ gering (0,14 mg/kg Futter). Abgesehen von Resveratrol könnten jedoch Polyphenole generell einen lebensverlängernden Effekt vermitteln und eine Kombination verschiedener Polyphenole, hier Anthocyane sowie monomere Flavane und Proanthocyanidine, könnte einen stärkeren Effekt ausüben als eine Komponente allein. Über eine Aktivierung von SIRT1 sind Polyphenole potenziell in der Lage, eine Kalorienrestriktion nachzubilden und so den Alterungsprozess zu verlangsamen (Chung et al. 2010; Murugaiyah and Mattson 2015). Auch in den vorliegenden Untersuchungen wurde nach 6-monatiger Verabreichung von Acy über das Futter, sowohl in der Leber als auch im Gehirn gealterter Mäuse, eine signifikante Erhöhung der SIRT1-Genexpression beobachtet. Eine milde Induktion von Signalwegen, die zu der zeitweiligen Lebensverlängerung geführt haben, ist somit anzunehmen (Kapitel 5.4.2). Mit Ausnahme von Resveratrol liegen derzeit nur wenig Daten zu den Effekten von anderen Polyphenolen auf die Lebensspanne vor. Long et al. berichten über eine verlängerte mittlere Lebensspanne in einem Parkinson-Modell der Fruchtfliege und Huntington-Modell der Maus nach Gabe eines anthocyan- und resveratrolreichen Extrakts aus Traube und *Polygonum cuspidatum* (Long et al. 2009). Hinsichtlich der Untersuchung anderer Fruchtextrakte als Traubenextrakt zeigten Proanthocyanidine lebensverlängernde Effekte in SAMP8-Mäusen (Yokozawa et al. 2014; Yokozawa et al. 2009) sowie Blaubeerextrakt in Fruchtfliegen (Wilson et al. 2006; Long et al. 2009; Peng et al. 2012). Dabei konnte interessanterweise der Effekt von Blaubeerextrakt durch die Proanthocyanfraktion und nicht durch die Anthocyanfraktion vermittelt werden (Wilson et al. 2006). Eine Reihe anderer Studien zeigt demgegenüber lebensverlängernde Effekte von Anthocyanen aus schwarzem Reis (Zuo et al. 2012), Cranberry-Extrakt (Wang et al. 2015a) und Açaí (Laslo et al. 2013) in Untersuchungen an Fruchtfliegen sowie für anthocyanreichen Weizenextrakt in *Caenorhabditis elegans* (Chen et al. 2013).

Es liegen also bisher wenig Daten zu den Effekten von Polyphenolen auf die Lebensspanne höherer Spezies wie Maus und Ratte vor. Die Effekte auf die Lebensspanne sind jedoch scheinbar stark abhängig vom Genotyp (Mitchell et al. 2015). Eine Metaanalyse zu den Effekten der

Kalorienrestriktion auf die Lebensspanne in Abhängigkeit des Genotyps fand eine Verlängerung der Lebensspanne von 14-45 % bei Ratten und nur 4-27 % bei Mäusen. Darüber hinaus wurde für den C57BL/6-Mausstamm, der am häufigsten für derartige Untersuchungen verwendet wurde, eine große Variabilität beschrieben. Die Effekte wiesen eine Variation zwischen einer Verkürzung der medianen Lebensspanne um bis zu 34 % und einer Verlängerung der medianen Lebensspanne um bis zu 27 % auf (Swindell 2012). Weitere wichtige Einflussgrößen auf die Lebensspanne sind das Geschlecht und das Futter (Mitchell et al. 2015). In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich C57BL/6J-Männchen verwendet. In einer Studie mit LACA-Mäusen konnte beispielsweise nur für die letzten 15 überlebenden Weibchen ein lebensverlängernder Effekt von schwarzem Johannisbeersaft beobachtet werden, jedoch nicht für die Männchen. Nach Fütterung mit Quercetin wurde in der gleichen Studie sogar eine verkürzte mittlere Lebensspanne beider Geschlechter zusammen beschrieben (Jones and Hughes 1982). Die Effekte auf die Lebensspanne werden somit durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst und es sind noch eine Reihe weiterer Studien notwendig, um zu klären, ob Polyphenole wie der hier untersuchte Traubenextrakt eine Lebensverlängerung erwirken können.

Bei Ratten konnte beispielsweise keine Verlängerung der mittleren und maximalen Lebensspanne durch die Anreicherung des Trinkwassers mit 20-25 % Rotwein oder der Nahrung mit Resveratrol ab einem Alter von 12 Monaten erbracht werden. Dennoch konnten in der Studie vaskuläre Funktionen mit dem Alter besser erhalten werden (da Luz et al. 2012). Eine lange Lebenszeit ist nur dann sinnvoll, wenn diese auch mit einem relativ guten Gesundheitsstatus verlebt werden kann. Die Untersuchung des Effekts von Polyphenolen auf die *Healthy life expectancy* ist somit ein weiterer bedeutender Faktor, der beispielsweise durch die begleitende longitudinale Untersuchung des Gedächtnisses und der Motorik erfolgen kann, wie sie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurde (Mitchell et al. 2015).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Fütterung mit Acy zwar die Lebenskurve insgesamt nicht signifikant verändern konnte, jedoch einen moderaten lebensverlängernden Effekt in einem Altersbereich der Mäuse zeigte, der beim Menschen ungefähr einem Alter von 70 Jahren entsprechen könnte. Auf Grundlage der Genexpressionsanalysen aus der Acy-Langzeitstudie könnte dieser milde lebensverlängernde Effekt über die Hochregulierung von SIRT1 und daraus folgende protektive Signalwege einschließlich einer verbesserten antioxidativen Abwehr vermittelt worden sein (Abb. 5.4). Einflussgrößen auf die Lebensspanne wie Spezies und Geschlecht sowie die scheinbar hohe Variationsbreite in der Antwort auf die Induktion einer

Lebensverlängerung (wie durch die Kalorienreduktion) lassen jedoch nur sehr begrenzt Rückschlüsse auf günstige Effekte beim Menschen zu.

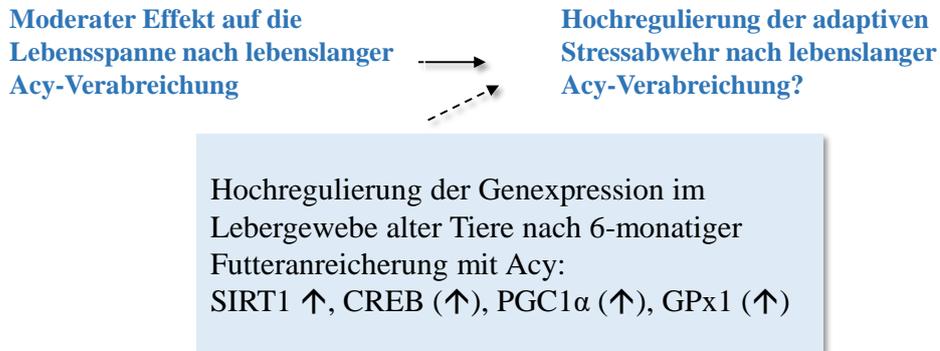


Abb. 5.4: Überlegungen zu den Effekten von Acy auf die Lebensspanne von C57BL/6J-Mäusen. Effekte in blauen Kästen stellen Effekte von Acy auf die Alterung dar (Alt Acy vs. Alt); Pfeile in Klammern: numerische Effekte, → : kein Effekt.

5.4.6 Übertragung auf den Menschen

In den hier durchgeführten Studien an Mäusen lag die tägliche Menge von Acy geschätzt bei 200 mg/kg KG. Unter Einbezug der unterschiedlichen Körperoberflächen (Nair and Jacob 2016) ergibt sich daraus umgerechnet auf den Menschen bei einem Körpergewicht von 60-70 kg eine Aufnahmemenge von ca. 1 g Extrakt am Tag. Der Extrakt Acy ist auf eine Gesamtpolyphenolkonzentration (OD 280 nm, Catechin-Äquivalent) von $\geq 70\%$ standardisiert, sodass sich daraus äquivalente Mengen zu früheren Studien mit 0,7 -1 g Polyphenolaufnahme über Concord-Traubensaft ergeben, die erste Effekte auf die kognitive Leistung beim Menschen gezeigt haben (Lamport et al. 2016; Krikorian et al. 2012).

Nach der Aufnahme von Concord-Traubensaft über eine Periode von 12 Wochen zeigten 12 ältere Patienten mit MCI verbesserte Leistungen hinsichtlich des verbalen Lernens (*California Verbal Learning Test*) und tendenzielle Verbesserungen hinsichtlich eines späteren verbalen *Recalls* und räumlichen Gedächtnisses (Krikorian et al. 2010). Mittels fMRT wurde weiterhin bei MCI-Patienten, die über 16 Wochen Concord-Traubensaft tranken, neben einer verminderten semantischen Interaktion in Gedächtnistests eine relativ stärkere Aktivierung in den anterioren und posterioren Bereichen der rechten Hirnhemisphäre detektiert (Krikorian et al. 2012). Eine kürzlich veröffentlichte randomisiert-kontrollierte Pilotstudie von Lee und et al. (2017) an 10 Probanden mit MCI (im Alter von 66-82 Jahren), die zweimal täglich über 6 Monate ein Traubepulver erhielten, welches äquivalent zur Aufnahme von 3 Portionen frischen Trauben war, wurde der Hirnmetabolismus mittels PET und die kognitive Funktion untersucht. Eine

Verminderung des Metabolismus in Hirnbereichen, die in frühen AD-Stadien betroffen sind, wurde in der Placebo-Gruppe, aber nicht der Trauben-Gruppe gefunden. Weiterhin korrelierte der Metabolismus in den Hirnbereichen mit einer Verbesserung der Aufmerksamkeit und des Arbeitsgedächtnisses (Lee et al. 2017). Eine randomisiert-kontrollierte Humanstudie mit AD-Patienten konnte nach einjähriger Gabe von Resveratrol (0,5 g-1 g, eskalierend) nicht nur Resveratrol in der CSF detektieren, sondern lieferte auch Hinweise auf eine Verbesserung der kognitiven Leistung (*Mini-Mental Score Examination*) und Ausübung von Alltagsaktivitäten sowie auf eine Induktion der adaptiven Immunantwort (Turner et al. 2015; Moussa et al. 2017). In einer Interventionsstudie mit 50-75-jährigen übergewichtigen Frauen konnte zudem nach 26-wöchiger Intervention mit Resveratrol (200 mg/Tag) eine bessere Gedächtnisleistung hinsichtlich der Abspeicherung einer Wortliste über 30 min (deutsche Version des *Auditory Verbal Learning Test*) festgestellt werden sowie eine erhöhte funktionale Konnektivität zwischen dem linken posterioren Hippocampus und dem medialen frontalen Kortex im MRT (Witte et al. 2014).

Genauere Inhaltsmengen hinsichtlich des Extrakts Acy liegen für die Hauptkomponenten Anthocyane, Catechine und Proanthocyanidine vor sowie für Resveratrol. Ausgehend von einer Aufnahme von 1 g Extrakt würden sich umgerechnet für Acy Aufnahmen von ca. 172 mg Anthocyanen und ca. 350 mg Proanthocyanidinen ergeben. Die Menge an Resveratrol ist sehr gering. Auch wenn in der vorliegenden Studie der Proanthocyanidin-Gehalt sehr hoch war, ist der Einfluss, der von dieser Komponente ausgehen kann, ungewiss. Bei der Bewertung des Effekts der enthaltenen Proanthocyanidine ist die vermutlich schlechte Bioverfügbarkeit von Proanthocyanidinen zu beachten (Kapitel 1.3.5). Die Absorption des B1-Dimers lag in Humanstudien mit proanthocyanidinreichem Traubenkernextrakt (Sano et al. 2003) und purem Proanthocyanidin B1 (Wiese et al. 2015) 100-fach geringer gegenüber monomeren Flavanolen. Darüber hinaus zeigten nur 2 von 7 Probanden nach Aufnahme von polymeren Procyanidinen eine erhöhte Konzentrationen des charakteristischen mikrobiellen Metabolits 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton in Plasma und Urin (Wiese et al. 2015). Im Gehirn von Ratten wurden 1 h nach der letzten Gabe einer 10-tägigen Fütterung mit der Oligomer-/Polymerfraktion von Traubenextrakt (28 mg/kg KG) Epicatechin und Catechinmetabolite in einer Konzentration von 19,2 mol/g Gewebe detektiert. Im Vergleich dazu wurden nach 17 mg/kg KG der monomeren Fraktion 360 pmol/g Gewebe detektiert (Wang et al. 2012a) (vergleiche Kapitel 1.3.6). In den ExGrape Extrakten lag der größte Teil als polymere Verbindungen vor. Die Konzentrationen an dimeren und trimeren Proanthocyanidinen lagen bei ca. 5 %, äquivalent zu einer geschätzten

umgerechneten Aufnahme von 50 mg. Zusammen mit dem Gehalt an Epicatechin und Catechin ergibt sich ein Gehalt von 10 % für Acy und somit eine äquivalente Aufnahmemenge von mono-/di- und trimeren Flavanolen von 100 mg beim Menschen.

Die Effekte von Traubenextrakt sind somit vermutlich stark abhängig von dem enthaltenen Polyphenolprofil und der Bioverfügbarkeit der enthaltenen Komponenten und erfordern weiter Klärung. Eine Mischung aus Traubenkernpolyphenolen, Resveratrol und Concord Traubensaft wird beispielsweise derzeit in einer Phase I Studie an Probanden mit MCI und erhöhten Blutglucosekonzentrationen untersucht (ClinicalTrials.gov: NCT02502253).

5.5 Effekte von Olivenpolyphenolen auf die Gehirnalterung

5.5.1 Mitochondriale Funktionen im Zellmodell PC12

Die Effekte von Hy auf die mitochondriale Funktion in PC12_{neo}-Zellen wurden anhand der Reinsubstanz Hy sowie anhand des Hy-reichen OMWW-Extrakts Ol untersucht.

Ol zeigte in PC12_{neo}-Zellen in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 0,25 – 50 $\mu\text{M}_{\text{Hy}\ddot{A}\text{q}}$ keine günstigen Effekte auf das MMP oder die ATP-Spiegel. Nach 24 h-Inkubation wurde demgegenüber eine Verschlechterung ab der Konzentration 25 $\mu\text{M}_{\text{Hy}\ddot{A}\text{q}}$ beobachtet. Von Schaffer et al. (2010) wurde zuvor in PC12-Zellen nach 30-minütiger Behandlung ein tendenzieller Rückgang der ATP-Spiegel ab einer Hy-Konzentration von 60 μM (über Ol) und eine signifikante Abnahme nach 250 μM beobachtet. Die ATP-Spiegel wurden hier jedoch erst 18 h nach der sehr viel kürzeren Behandlungszeit von 30 min gemessen. Eine basale Erhöhung der ATP-Spiegel konnte durch Ol nach 30-minütiger Behandlung auch nicht erreicht werden (Schaffer et al. 2010). Vor 18 h SNP-induziertem Stress konnte Hy in Form von Ol in der Studie von Schaffer et al. (2010) in Konzentrationen von 25-60 μM (ATP-Spiegel) und 60-120 μM (MMP) schützen. Korrelationsanalysen wiesen zudem darauf hin, dass die Effekte von dem im Extrakt enthaltenen Hy ausgehen (Schaffer et al. 2010). Auch in dissoziierten Hirnzellen verminderte Hy in Form von Ol ab einer umgerechneten Konzentration von ca. 25 μM die Abnahme der ATP-Spiegel durch SNP und Fe^{2+} (Schaffer et al. 2007). Die protektiven Effekte von Ol konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Im Gegensatz zu Ol wurden in Studien von Schaffer et al. (2010) weniger starke Effekte nach der Behandlung von PC12-Zellen mit Hy als Reinsubstanz detektiert. Hy konnte hier ab einer

Konzentration von 25 μM nur die ATP-Spiegel vor 18 h SNP-Stress schützen und erhöhte basal das MMP bei 50 μM (Schaffer et al. 2010).

In der vorliegenden Untersuchung zeigte die synthetische Reinsubstanz Hy Effekte auf die mitochondriale Atmung und einen Schutz vor SNP-Stress. Die Untersuchung der Atmungsaktivitäten in der hochauflösenden Respirometrie mit PC12_{neo}-Zellen ergab in Folge einer 24 h-Inkubation mit 25 μM Hy eine signifikante Erhöhung der maximalen Atmungsrate nach Entkopplung mit FCCP (ETS) sowie eine tendenzielle Erhöhung der Komplex IV-Atmungsaktivität. Auf die RCR, berechnet als ETS/Leak(O₂) und somit der Kopplung des ETS, wurde kein Effekt festgestellt. Die mitochondriale Atmung vor der Entkopplung und die CS als Marker der mitochondrialen Masse blieben genauso unverändert wie die basalen ATP-Spiegel der Zellen nach 24 h-Inkubation mit 25 μM Hy. Die positiven Effekte auf das ETS in den respiratorischen Messungen blieben somit ohne Effekt auf die basale Energieproduktion der Zellen. Generell konnte in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 0,25 – 50 μM nach 7 und 24 h nur eine marginale Erhöhung der ATP-Spiegel um maximal 4 % der Medium-behandelten Kontrolle erreicht werden. Die 24 h-Inkubation mit 50 μM führte zu einer signifikanten Abnahme um 15 % der Medium-behandelten Kontrolle.

Von größerer Bedeutung als der basale Zustand könnte der Effekt von Hy auf die mitochondriale Atmung in Stresssituationen sein. Hy konnte in PC12_{neo}-Zellen dem SNP-bedingten Abfall der ATP-Spiegel ab einer Konzentration von 2,5 μM entgegenwirken (Erhöhung um 7-10 % der mediumbehandelten Kontrolle). Im Vergleich dazu, konnte in SH-SY5Y-Zellen, die hohem Glucosestress ausgesetzt waren, die Vorbehandlung mit 10 μM Hy für 24 h die basale und maximale Atmung nach Entkopplung mit FCCP signifikant erhöhen. Weiterhin führte die Hy-Behandlung zu einer erhöhten Komplex IV-Proteinexpression und Aktivierung von AMPK (Zheng et al. 2015). Da in der vorliegenden Arbeit nach 24 h-Inkubation mit Hy Aktivitätssteigerungen des ETS und auch tendenziell des Komplex IV beobachtet wurden sowie ein Schutz vor der SNP-bedingten Abnahme der ATP-Spiegel, könnte die Erfassung des Einflusses von Hy auf die mitochondrialen Atmungsaktivitäten der PC12_{neo}-Zellen nach SNP-Stress weiterhin interessant sein. Wie in Kapitel 5.1 bereits beschrieben wurde, kann SNP über eine Reihe von Mechanismen zu oxidativem Stress und einer Inhibierung der mitochondrialen Atmung führen.

Ein antioxidativer Effekt von Hy wird generell in der Literatur beschrieben (Rodriguez-Morato et al. 2015). In differenzierten PC12-Zellen schützte Hy (10 – 50 μM) vor H₂O₂/H₂O₂+ Fe²⁺-

induziertem oxidativen Stress über eine erhöhte KAT-Aktivität (Hashimoto et al. 2004). In primären kortikalen Zellen der Ratte konnte Hy vor Glutamat-induzierter Toxizität einschließlich einer NO-Überproduktion, ROS und einem verminderten MMP schützen (Koo et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte die 1 h-Vorinkubation mit Hy (25 μ M) und nachfolgende 6 h-Schädigung mit SNP in Gegenwart von Hy nicht vor oxidativem Stress (erfasst über den Proteincarbonylgehalt) schützen. Dies steht im Gegensatz zu der Verminderung des SNP-bedingten Abfalls der ATP-Konzentration nach vergleichbarer Inkubation. Der Unterschied könnte jedoch darin begründet liegen, dass die SNP-Inkubation für die Proteincarbonylmessung in der Zellkulturflasche aufgrund einer hohen Zelltoxizität im Gegensatz zur ATP-Messung in der 96-Well Platte von 0,5 mM auf 0,15 mM herabgesetzt werden musste. Weiterhin könnte eine längere Vorinkubation wie beispielsweise 12 oder 24 h zu einem ausgeprägteren Schutz vor oxidativem Stress führen.

Hy wird aufgrund seiner Struktur ein hohes antioxidatives Potenzial über die Neutralisierung von freien Radikalen zugesprochen. Größere Bedeutung für die *in vivo* Situation hat jedoch vermutlich sein indirekter antioxidativer Einfluss über die Aktivierung endogener Abwehrmechanismen (Rodriguez-Morato et al. 2015). Eine 12 h-Vorbehandlung mit 10-50 μ M Hy führte in PC12 Zellen mit steigender Konzentration zu einem Schutz vor H₂O₂ induzierter Zellschädigung, verminderter ROS-Bildung und einer Verbesserung des intrazellulären Redox-Status. Diese Effekte sind zum großen Teil über die Induktion des NFE2L2-Signalwegs vermittelt worden (Peng et al. 2015).

Die Induktion von antioxidativen Genen über NFE2L2 setzt die Translokation von NFE2L2 in den Zellkern voraus. In PC12-Zellen führte die Inkubation mit 50 μ M Hy zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration von nukleär-lokalisiertem NFE2L2, mit einem Peak nach 1 h-Inkubation und signifikant erhöhter Expression NFE2L2-induzierter zellprotektiver Gene nach 3, 6 und 12 h. Die Reduzierung der NFE2L2-Proteinexpression über einen Knockdown führte nur zu marginalen zellprotektiven Effekten der höchsten Hy-Konzentration, 50 μ M, die vermutlich über direkte antioxidative Effekte vermittelt wurden (Peng et al. 2015). Die Vorinkubation mit Hy über eine längere Zeitspanne als 1 h könnte daher nötig sein, um einen Schutz vor SNP-induziertem oxidativen Stress zu vermitteln und somit einem erhöhten Proteincarbonylgehalt entgegen zu wirken. Der über 50 %ige SNP-induzierte Abfall der ATP-Spiegel in PC12_{neo}-Zellen der vorliegenden Arbeit konnte auch lediglich um maximal 10 % erhöht werden. Auch in diesem Fall könnte möglicherweise eine längere Vorinkubation einen größeren Effekt vermitteln.

Neben Effekten auf den NFE2L2-Signalweg konnten Zhu et al. (2010) auch Effekte von Hy auf die mitochondriale Biogenese bei oxidativem Stress zeigen. In Retinazellen konnte Hy (100 μM , 48 h) bei Acrolein-induziertem oxidativem Stress neben NFE2L2 und der Induktion von antioxidativen Enzymen auch die Proteinexpression von Tfam, UCP2 und mitochondrialen Komplexen über die Aktivierung von PGC1 α erhöhen. Weiterhin zeigte sich, dass bei einer Langzeitinkubation über 7 Tage Hy in einer Konzentration von 5 μM ausreicht, um vor oxidativen Stress zu schützen (Zhu et al. 2010).

Die Untersuchung der Effekte von geringeren Konzentrationen als die hier diskutierten und üblicherweise eingesetzten Konzentrationen ist generell gerade für Untersuchungen von neuroprotektiven Effekten anzustreben. Hy und seine Metabolite wurden, wie in Kapitel 1.3.6 bereits beschrieben, im Gehirn von Nagetieren nur im unteren nanomolaren Bereich detektiert. In der vorliegenden Studie wurden die Effekte von ≥ 250 nM untersucht. Auch diese kleineren Konzentrationen sind somit vermutlich im Gehirn schwer zu erreichen.

Weiterhin sollte bei *in vitro* Studien, die Untersuchung von *in vivo* Metaboliten angestrebt werden. In dieser Arbeit wurde der Hy-Metabolit DOPAC (vergleiche Abb. 1.10) in PC12_{neo}-Zellen untersucht. Wie im Zusammenhang mit den Effekten von Traubenpolyphenolen bereits besprochen, hatte DOPAC als gemeinsamer Metabolit von Proanthocyanidinen und Hy keinen Effekt auf die mitochondriale Atmung, konnte jedoch vergleichbar mit den Traubenextrakten und Hy vor dem SNP-induzierten Abfall der ATP-Spiegel schützen.

Ein Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Atmung, Hy und DOPAC besteht über das endogene Dopaminsystem. Der Komplex I-Inhibitor Rotenon führt im Tiermodell zu Veränderungen, die der Parkinson-Erkrankung ähneln und weist eine selektive Toxizität für das nigrostriatale Dopaminsystem auf. Hy und DOPAC sind Metabolite des endogenen Dopaminsystems (vergleiche Abb. 1.10). Die Inkubation von Rotenon führt in PC12-Zellen zu einer erhöhten Konzentration des zytotoxischen Dopamin-Metabolits Monoaminoxidase DOPAL sowie DOPET (Hydroxytyrosol) und einer Verminderung an Dopamin und DOPAC (Goldstein et al. 2015). Durch die therapeutische Hemmung der Monoaminoxidase bei der Parkinson-Erkrankung kommt es zu einer spontanen Autooxidation von Dopamin. Hy (10 μM) konnte in PC12-Zellen die spontane und enzymatische Oxidation von Dopamin hemmen und wird daher zur Erhöhung der neuroprotektiven Eigenschaften in Bezug auf die Hemmung der Monoaminoxidase vorgeschlagen (Goldstein et al. 2016). In differenzierten PC12-Zellen konnte DOPAC vor $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$ -induziertem oxidativen Stress schützen, jedoch nicht wie Hy vor H_2O_2 . In Elektronenspinresonanzmessungen zeigte DOPAC, aber nicht Hy eine deutliche Aktivität hinsichtlich

der Neutralisierung von HO[•] (Hashimoto et al. 2004). Es könnten somit unterschiedliche antioxidative Mechanismen für Hy und DOPAC zu Grunde liegen.

Aufgrund der umfangreichen *in vivo* Konjugierungsprozesse, denen Hy und seine Metaboliten unterliegen, ist weiterhin die Untersuchung von Phase-II-Metaboliten von Bedeutung. Nach Aufnahme von Olivenpolyphenolen wurden im Gehirn von Ratten Sulfokonjugate von Hy, Tyrosol und Homovanillinsäure detektiert (Serra et al. 2012) (vergleiche Kapitel 1.3.6). Die Untersuchung der Effekte von Metaboliten hat erst in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Giordano et al. (2015) zeigen beispielsweise, dass auch die 3-O und 4-O-Glucuronide von Hy (10 und 25 µM) in HepG2-Zellen vor endoplasmatischem Reticulum-Stress schützen können. Im Vergleich zu Hy fiel der Effekt jedoch geringer aus (Giordano et al. 2015). In Kolonkarzinomzellen vermittelten Hy und seine Metabolite Phenylessig- und Phenylhydroxypropionsäuren Zellzyklusarrest und Apoptose (Lopez de las Hazas et al. 2017).

Zusammenfassend konnte die synthetische Reinsubstanz Hy, aber nicht der OMWW-Extrakt Ol, in PC12_{neo}-Zellen vor einer durch SNP ausgelösten mitochondrialen Dysfunktion schützen, indem sie der Verminderung der ATP-Konzentrationen entgegenwirkte. In welchem Umfang dieser Schutzeffekt von Hy mit der erhöhten maximalen Atmungskapazität während der hochauflösenden Respirometrie ohne SNP-Stress zusammenhängt, bleibt zu untersuchen.

5.5.2 Hydroxytyrosol im Mausmodell C57BL/6J

In den letzten 10 Jahren wurden zunehmend Untersuchungen an Mäusen unternommen, die den Blick auf das neuroprotektive Potenzial von Olivenöl und Olivenextrakten richteten. In SAMP8-Mäusen konnte die tägliche Gabe von 75 µl EVOO über 6 Wochen bzw. die Anreicherung des EVOOs mit einem EVOO-Phenolextrakt in größerem Maße, kognitive Funktionen verbessern und oxidativen Schäden vermindern (Farr et al. 2012). Die Aufnahme von Polyphenolen über nahrungstypische Mengen an Olivenöl sind jedoch gering. Dazu kommt der zuvor beschriebene umfangreiche Metabolismus (in Kapitel 1.3.5). Die Untersuchungen konzentrieren sich somit zunehmend auf polyphenolreiche Olivenextrakte und Hy als Reinsubstanz. Die Fütterung von Mäusen mit dem OMWW-Extrakt Ol (100 g/kg KG Hy) für 12 Tage führte zu einem erhöhten MMP in dissoziierten Hirnzellen und konnte vor Eisen-stimulierter Lipidperoxidation schützen (Schaffer et al. 2007).

Auf Grundlage dieser positiven Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt einer 6-monatigen Hy-Verabreichung über Futterpellets mit einer geschätzten täglichen Aufnahme von 100 mg/kg KG in C57BL/6J-Männchen untersucht. Im Gegensatz zu den vorgenannten Studien hatte Hy in dieser Arbeit nahezu keinen Effekt auf die altersbedingte mitochondriale Dysfunktion. Gegenüber jungen Kontrollmäusen zeigten 20 Monate alte Hy-gefütterte Mäuse gleichermaßen reduzierte ATP-Spiegel in dissoziierten Hirnzellen wie 20 Monate alte Kontrollmäuse. Einzig auf die *ex vivo* Behandlung der dissoziierten Hirnzellen mit SNP reagierten die Hy-gefütterten Tiere mit einem signifikant geringeren Rückgang der ATP-Spiegel, sodass scheinbar eine höhere Stressresistenz vorliegt. Auf das MMP, die mitochondriale Atmung, die RCR und die CS hatte sowohl das Alter als auch die Behandlung mit Hy keinen signifikanten Effekt. Die fehlende Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung zwischen den Altersgruppen wurde bereits ausführlich in Kapitel 5.2.1 diskutiert.

Weitere Studien zu dem Effekt von Hy oder Olivenpolyphenolen auf die mitochondriale Funktion bei der Gehirnalterung wurden in der Literatur nicht identifiziert. Einige aktuelle Studien beschäftigen sich mit den Effekten von Olivenpolyphenolen auf extern induzierte mitochondriale und kognitive Dysfunktionen in Mäusen sowie transgenen Mausmodellen der AD. Im Muskelgewebe von C57BL/6-Mäusen, die eine fettreiche Nahrung erhielten, konnte die Fütterung mit 10 und 50 mg/kg/KG Hy die verminderte Aktivität der mitochondrialen Komplexe I und II verhindern sowie die vom Futter unbeeinträchtigte Aktivität von Komplex IV erhöhen. Der Proteincarbonylgehalt im Muskelgewebe wurde durch die höhere Dosierung, 50 mg/kg KG, normalisiert (Cao et al. 2014). Effekte einer noch geringeren Dosis konnten Peng et al. (2016) beobachten. Die Verabreichung von 5 mg/kg KG Hy für 6 Monate konnte im Gehirn von APP/PS1-transgenen Mäusen Verminderungen der ATP-Spiegel und der Aktivitäten der mitochondrialen Komplexe II, III und IV entgegenwirken. Speziell in der mitochondrialen Fraktion schützte die Hy-Fütterung vor erhöhten Proteincarbonylgehalten und einer verminderten SOD-Proteinexpression. Weiterhin wurde die kognitive Leistung im MWM leicht, aber nicht signifikant verbessert (Peng et al. 2016a).

Auch in der vorliegenden Studie hatte die Hy-Fütterung keine signifikante Verbesserung der Gedächtnisleistung im *Y-Maze*, *Social Recognition* und *Passive Avoidance* Test oder der altersbedingten verminderten lokomotorischen Aktivität der 20 Monate alten Männchen zur Folge. Es wurde lediglich eine tendenzielle Verbesserung des räumlichen Gedächtnisses im *Y-Maze* Test beobachtet. Gleichermäßen finden Pitozzi et al. (2010) nach 12-monatiger Fütterung mit polyphenolreichem Olivenöl (4 mg/kg KG Polyphenole) in einer fettreichen Diät bei männlichen gealterten Ratten keine Effekte auf das motorische und explorative Verhalten und die

Motoroordination. Weiterhin wurden keine Unterschiede hinsichtlich des sozialen Lernens in einem ähnlich dem hier angewandten *Social Recognition* Test beobachtet. Die Ratten zeigten kein erhöhtes Erkundungsverhalten gegenüber einer unbekanntem Ratte im Gegensatz zu einer bekannten Ratte, die nacheinander direkt mit in den Käfig gesetzt wurden. Der erste Kontakt mit der nun bekannten Ratte fand in dieser Variante jedoch 24 h zuvor statt und nicht nach 15 min wie in dieser Arbeit. Weiterhin wurden junge Tiere als Stimulus verwendet (Pitozzi et al. 2010). Demgegenüber zeigte eine Langzeitfütterung mit 10 % EVOO (6 mg/kg Polyphenole/Tag) von C57BL/6J-Männchen über eine Periode von 12 Monaten ab einem Alter von 10 Monaten Verbesserungen hinsichtlich des kontextabhängigen Gedächtnisses im *Passive Avoidance* Test (*Step-down*) und der Motoroordination auf dem Rotarod (Pitozzi et al. 2012). Bei dem Vergleich der vorliegenden Studie mit anderen, die angereichertes EVOO eingesetzt haben, stellt sich die Frage, inwieweit die Nahrungsmatrix eine Rolle hinsichtlich der günstigen Effekte von Hy spielen könnte. Die Exkretion von Hy lag beispielsweise beim Menschen nach der Aufnahme von Hy in Olivenöl höher als bei der Aufnahme über Joghurt (Visioli et al. 2003). Ungeachtet dessen konnte auch die Verabreichung von Oleuropein-Aglycon, das im Magen zu Hy abgebaut werden kann, in fettreduziertem Futter neuroprotektive Effekte vermitteln (Casamenti et al. 2015).

Die Fütterung mit Oleuropein-Aglycon in einer Dosis von 50 mg/kg fettreduziertem Futter für 8 Wochen konnte die A β -Ablagerungen in transgenen Tieren vermindern, die das humane APP-Gen mit Doppelmutation tragen. Weiterhin konnte die Fütterung den Defiziten im *Passive Avoidance* Test (*Step-down*) und beim Wiedererkennen von Objekten entgegenwirken (Grossi et al. 2013). Vergleichbare Effekte in den genannten Verhaltenstests konnte für die gleiche Dosis eines OMWW-Extrakts in einer kürzlichen Studie gezeigt werden (Pantano et al. 2017). Untersuchungen zur LTP in Hippocampus-Schnitten des gleichen Mausmodells nach Inkubation mit Oleuropein-Aglycon weisen zudem auf eine verbesserte synaptische Funktion hin (Luccarini et al. 2015). Auch eine extern durch lösliche A β ₁₋₄₂-Oligomere und Ibotensäure induzierte neuronale Dysfunktion konnte über die Aufnahme von Hy in C57BL/6-Mäusen verbessert werden. Die 14-tägige Gabe von 10 mg/kg KG konnte das räumliche Gedächtnis und das Arbeitsgedächtnis im RAM verbessern. Weiterhin konnte Hy fehlregulierten Signalwegen entgegenwirken, die mitochondriale Struktur erhalten sowie die Genexpression von SIRT1, CREB und BDNF erhöhen (Arun Sundar et al. 2015).

Auch wenn für Olivenpolyphenole weniger Daten verfügbar sind als für Traubenpolyphenole, liegen Hinweise vor, dass auch diese ihre Effekte auch über hormesisassoziierte Signalwege

einschließlich der Aktivierung von SIRT1, AMPK und der antioxidativen Abwehr vermitteln können (Rigacci and Stefani 2016). Im Gehirn von db/db diabetischen Mäusen des C57BL/6 Hintergrunds konnte die 8-wöchige Gabe von 10 und 50 mg/kg KG Hy den AMPK/SIRT1/PGC1 α -Signalweg induzieren und die Expression antioxidativer Enzyme wie die der SOD2 steigern. Für die höhere Hy-Konzentration war dies verbunden mit einer höheren Aktivität des mitochondrialen Komplexes I sowie einer gesteigerten Proteinexpression der Komplexe I und IV (Zheng et al. 2015).

Es liegen somit im Gegensatz zu der vorliegenden Studie einige Hinweise vor, die für ein neuroprotektives Potenzial von Hy sprechen. Möglich ist, dass die hier eingesetzte Dosis von 100 mg/kg KG als Langzeitfütterung zu hoch angesetzt war und eine geringere Dosis bessere Ergebnisse erzielen könnte. Neuere Studien arbeiten mit einer Dosierung von bis zu 50 mg/kg KG Hy. In der vorliegenden Studie konnte bei 100 mg/kg KG kein signifikanter Einfluss auf das Körpergewicht oder die Lebensspanne detektiert werden. (Auñon-Calles et al. 2013) schlagen bei Ratten eine sichere Dosis (*No observed adverse effect level*, NOAEL) von 500 mg/kg KG und somit umgerechnet auf die Maus (Nair and Jacob 2016) von ca. 1 g/kg KG vor. Die Dosis von 100 mg/kg KG wurde auf Grundlage einer zuvor durchgeführten Studie ausgewählt, welche in Mäusen nach einer Fütterung über 12 Tagen in dissoziierten Hirnzellen Effekte auf die mitochondriale Funktion und oxidativen Stress gezeigt hatte (Schaffer et al. 2007). Zum einen war die Fütterungsperiode in der vorliegenden Studie jedoch deutlich länger und zum anderen wurde Hy in Form des OMWW-Extrakts Ol über die Knopfkanüle verabreicht. Zudem könnte der Unterschied des Alters entscheidend sein. In der Studie von Schaffer et al. (2007) wurden junge NMRI-Mäuse (3-4 Monate alt) im Gegensatz zu alten Mäusen (20 Monate alt) in dieser Studie untersucht.

Zusammenfassend konnte die 6-monatige Fütterung mit Hy mit einer geschätzten täglichen Aufnahme von 100 mg/kg KG in 20 Monate alten C57BL/6J-Mäusen keine signifikante Verbesserung der mitochondrialen oder kognitiven Dysfunktion erbringen. Aufgrund einiger Studien, die im Bereich von 4-50 mg/kg KG Hy neuroprotektive Effekte erzielen konnten, könnte für weiterführende Studien der Einsatz einer geringeren Dosis sinnvoll sein.

5.5.3 Übertragung auf den Menschen

Eine Hy-Aufnahme von 100 mg/kg KG in der Maus kann unter Einbezug der Körperoberfläche auf eine Dosis beim Menschen mit 60-70 kg KG von ca. 0,5 g Hy geschätzt werden. Diese auf den Menschen umgerechnete Dosis kann nicht über die normale Ernährung erreicht werden. In

mediterranen Ländern wird die Aufnahmemenge an Olivenöl auf 25-50 ml geschätzt. Die tägliche Aufnahmemenge von Hy über die übliche Nahrung wird nach Schätzungen vermutlich 7 mg/Tag nicht überschreiten (Rodriguez-Morato et al. 2015). Die Aufnahme kann jedoch mit dem Polyphenolgehalt des Olivenöls und den individuellen Gewohnheiten stark variieren (siehe Kapitel 1.3.2 und 1.3.4). In der EPIC-Kohorte lag die tägliche Menge an Oleuropein bei Männern in mediterranen Ländern bei 3 mg/Tag (Zamora-Ros et al. 2016). In der spanischen PRE-DIMED Kohorte wurde eine Aufnahme von Polyphenolen aus Oliven und Olivenöl von 90,4 mg erfasst (Tresserra-Rimbau et al. 2013). Das von der EFSA erlassene *Health Claim* hinsichtlich des Schutzes von LDL-Partikeln vor oxidativen Schäden setzt die minimal benötigte Menge für günstige Effekte von Hy und seinen Derivaten auf 5 mg/Tag (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies 2011). Das in dieser Arbeit verwendete Hy erlangte 2015 in den Vereinigten Staaten den *Generally recognized as safe* (GRAS)-Status mit einem vorgeschlagenen Zusatz von Hy in Lebensmitteln von 5 mg/Portion. Diese Anreicherung würde schätzungsweise am Tag zu einer mittleren Aufnahmemenge von 25,5 mg und einer hohen Aufnahmemenge (90. Perzentile) von 50 mg führen (U.S. Food and Drug Administration 2015).

Humanstudien zu den Effekten von Hy auf die Gehirnalterung oder AD konnten über die Literaturrecherche nicht identifiziert werden. Entgegen der Hormesis-Hypothese zeigte eine erste Humanstudie nach 1-wöchiger Aufnahme von 5 und 25 mg Hy über Öl keinen Einfluss auf die Genexpression von Phase-II-Enzymen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Crespo et al. 2015). Eine randomisiert-kontrollierte Studie liefert zudem Hinweise, dass phenolange-reichertes Olivenöl die intestinale Immunfunktion verbessern kann (Martín-Peláez et al. 2016; Martín-Peláez et al. 2017). Es wird zunehmend vorgeschlagen, dass die intestinale Mikrobiota einen Einfluss auf kognitive Beeinträchtigungen hat und Ernährungsweisen wie die MeDi diesbezüglich günstige Auswirkungen haben könnten (Caracciolo et al. 2014).

5.6 Effekte von Trauben- und Olivenpolyphenolen (TOP) im AD-Modell

In dieser Arbeit sollte die Annahme geprüft werden, dass TOP vor mitochondrialer Dysfunktion schützen können und so Alterungsprozessen entgegenwirken und in Folge vor Neurodegeneration schützen können. Basis dieser Hypothese ist die Annahme, dass der Gehirnalterung und der AD ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde liegt. Nach der *Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis* wird die spät auftretende AD nicht von A β initiiert, sondern von

Dysfunktionen der Mitochondrien, die im Laufe des Lebens auftreten und von einer erhöhten Menge an ROS begleitet werden. Veränderungen in der A β -Homöostase stellen danach Kennzeichen einer normalen Alterung dar. Wird eine individuell bestimmte Grenze in Folge des Kreislaufs aus ROS und mitochondrialer Dysfunktion überschritten, resultiert ein Zusammenbruch der Energieproduktion und Neurodegeneration. Die histopathologischen Kennzeichen der AD könnten möglicherweise zu einer weiteren Beeinflussung der mitochondrialen Funktion führen (Grimm et al. 2016).

Der Fokus der vorliegenden Arbeit wurde auf die Vorbeugung der Gehirnalterung als früher Ansatzpunkt für die Prävention einer AD gelegt. Werden mitochondriale Dysfunktionen und Alterungsprozesse durch die Aufnahme von Polyphenolen vermindert, könnte dies in Folge zu einem Schutz vor Neurodegeneration führen.

Darüber hinaus wurden mit dem PC12_{sw}-Zellmodell und dem Thy-1-APP-Mausmodell zwei Modelle mit erhöhter A β -Produktion eingesetzt. Traubenpolyphenole können vermutlich auf verschiedenen Wegen die A β -Neuropathologie günstig beeinflussen. So können sie Einfluss auf die Bildung, abnormale Oligomerisierung und Beseitigung von A β nehmen. Die neuroprotektiven Eigenschaften gehen dabei vermutlich von einer Mischung an Traubenpolyphenolen aus (Pasinetti et al. 2015). Als besonders effektive Inhibitoren der Oligomerisierung und Aggregation von A β in Traubenkernextrakt haben sich die monomeren Flavanole gezeigt, die auch zugänglich für das Gehirn sind (Hayden et al. 2015). Traubenpolyphenole haben in PC12-Zellen günstige Effekte auf A β -induzierte mitochondriale Dysfunktionen und oxidativen Stress gezeigt. So konnten Traubenkernproanthocyanidine und Anthocyane aus der violetten Süßkartoffel beispielsweise vor der A β -induzierten Beeinträchtigung des MMPs, erhöhten ROS-Leveln, Lipidperoxidation und vor Apoptose schützen (Ye et al. 2010; Lian et al. 2016). Auch Hy konnte in Neuroblastomzellen einen Schutz vor A β -Toxizität zeigen (St-Laurent-Thibault et al. 2011). Im APP/PS1-Mausmodell schützte Hy vor mitochondrialer Dysfunktion, hatte jedoch keinen Einfluss auf die A β -Level im Gehirn (Peng et al. 2016a).

In dieser Arbeit konnte die Behandlung von PC12_{sw}-Zellen mit Acy und Res vor SNP-induzierter mitochondrialer Dysfunktion schützen. Die protektiven Effekte waren zum Teil weniger ausgeprägt als die in PC12_{neo}-Zellen beobachteten Effekte. Da das PC12_{sw}-Zellmodell selbst schon ein Krankheitsmodell mit mitochondrialer Dysfunktion darstellt, ist es möglicherweise schwieriger, einem zusätzlichen SNP-Stress entgegenzuwirken. Die basalen ATP-Spiegel nach Res- und Acy-Behandlung zeigten eine tendenzielle Erhöhung der ATP-Spiegel in PC12_{sw}-Zellen. Die hochauflösende Respirometrie könnte hier weiteren Aufschluss über die Effekte der

Traubenextrakte auf die mitochondriale Atmung liefern. Hinsichtlich der Olivenpolyphenole zeigte Ol eine signifikante Erhöhung der basalen ATP-Spiegel, die selektiv in der Konzentration $25 \mu\text{M}_{\text{Hy}\ddot{a}\text{q}}$ auftrat. Wie in PC12_{neo}-Zellen konnte Ol keinen Schutz vor SNP-induzierter mitochondrialer Dysfunktion vermitteln.

Im AD-Modell Thy-1-APP sollte weiterhin der Effekt einer Kombination aus TOP und zusätzlicher Stimulierung durch *Environmental Enrichment* untersucht werden (RO- und ROEn-Interventionen). Aufgrund der fehlenden mitochondrialen und kognitiven Dysfunktion des Thy-1-APP-Modells, die in Kapitel 5.2.3 und 5.3.2 bereits erläutert worden sind, hat das Modell keine Eignung zur Untersuchung der mitochondrialen und kognitiven Dysfunktion bei der AD gezeigt. Darüber hinaus konnten die Interventionen keine günstigen Effekte vermitteln.

Es liegen somit insgesamt aus dieser Arbeit zu wenig Daten vor, um Schlussfolgerungen hinsichtlich des Schutzes von TOP vor mitochondrialer Dysfunktion im AD-Modell zu ziehen. Basierend auf der Theorie, dass die AD eine Progression von Alterungsprozessen darstellt, die eine mitochondriale Dysfunktion involvieren, könnte eine Prävention der Alterung als erster Schritt zum Schutz vor Neurodegeneration gewertet werden.

5.7 Effekte multipler Anregungsansätze bei der Gehirnalterung und AD

Neben den Einzelkomponenten Traubenextrakt und Hy/Ol sollte in der vorliegenden Arbeit der Effekt einer Kombination der beiden Komponenten sowie die zusätzliche Stimulierung im Mausmodell über eine anregende Umgebung (*Environmental Enrichment*) geprüft werden. Die Effekte der multiplen Anregungsansätze auf die mitochondriale Funktion sind im Vergleich zu den Einzelbehandlungen in Tab. 5.4 zusammengefasst. TOP konnten in Kombination in der vorliegenden Arbeit insgesamt keine besseren Effekte erzielen als ihre Einzelkomponenten.

Tab. 5.4: Zusammenfassung der Effekte von TOP auf die mitochondriale Funktion.

	PC12 _{neo}	PC12 _{sw}	C57BL/6J	NMRI	Thy-1-APP
Acy	MMP n. SNP ↑ [25 µg/ml] ATP n. SNP ↑ [25;50 µg/ml] ATP ↓ [50 µM]	MMP n. SNP ↑ [50 µM] ATP n. SNP ↑ [50 µM]	ATP, MMP (↑) KI+II ↑		
Hy	ATP ↑ [2,5 µM] ATP ↓ [50 µM] ATP n. SNP ↑ ETS ↑ [25 µM]	MMP ↓ [25 µM]	ATP n. SNP ↑		
Acy+Hy	MMP n. SNP ↑ [50+25] ATP ↓ [50+10]		KIV ↓		
Res	ATP n. SNP ↑ [25;50 µg/ml] ATP ↓ [50 µM]	ATP n. SNP ↑ [25;50 µg/ml]			
Ol	MMP ↓ [25;50 µM] ATP ↓ [25 µM]	ATP ↑ [25 µM] MMP ↓ ATP n. SNP ↓ [50 µM]			
Res+Ol	→ ATP ↓ [50+10]	ATP, MMP n. SNP ↑ [50+12,5] MMP n. SNP ↑ [25+10]		ATP, MMP (↑) KI-Gex. ↑	→
Res+Ol +En				ATP, MMP (↑) KI, KIV-Gex. ↑	KIV ↓

↑/↓: signifikante Erhöhung/Verminderung vs. Kontrolle, (↑/↓): tendenzieller Effekt; →: kein Effekt, En: *Environmental Enrichment*, ETS: Elektronentransportsystem; Gex: Genexpression, K: mitochondrialer Komplex, MMP: mitochondriales Membranpotenzial; n. SNP: nach SNP-Behandlung

5.7.1 Kombination aus TOP

5.7.1.1 Zellmodell PC12

Im PC12_{neo}-Modell konnte der deutliche Schutzeffekt vor der SNP-bedingten mitochondrialen Dysfunktion, der von Acy und Hy als Einzelkomponenten ausging, in der Kombination nicht wiedergefunden werden. Die Kombination aus Res und Ol führte im Zellmodell nur in der Kombination 50 µg/ml Acy+ 12,5 µM_{HyÄq} Ol in PC12_{sw}-Zellen zu einem Schutz vor dem SNP-bedingten Abfall der ATP-Spiegel. Dieser Schutz war vergleichbar mit der Einzelkomponente Res im gleichen Modell, die jedoch auch schon bei 25 µg/ml signifikant protektiv wirkte.

Die hier eingesetzten Kombinationen aus TOP beinhalten eine Reihe verschiedener Verbindungen. Traubenprodukte als solches verfügen schon über ein Polyphenolprofil, dass potenziell synergistische Effekte haben kann (Mertens-Talcott and Percival 2005; Kowalczyk et al. 2010). Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Schutzeffekte von TOP vor SNP-bedingter mitochondrialer Dysfunktion lagen insgesamt in einem Konzentrationsbereich, der mit direkten antioxidativen, radikalneutralisierenden Effekten verbunden sein kann (Sandoval-Acuna et al.

2014). Die Weinpolyphenole Resveratrol, Catechin, Quercetin, Gallussäure und Kaffeesäure zeigten in *in vitro* Untersuchungen zur antioxidativen Aktivität abhängig von der Testmethode synergistische und auch antagonistische Effekte (Kurin et al. 2012; Skroza et al. 2015). Polyphenole wurden nur im nanomolaren Bereich im Gehirn detektiert. Der Schutz über eine Beeinflussung von Signalwegen, wie beispielsweise die Induktion von NFE2L2 und somit Erhöhung von antioxidativen Enzymen, ist folglich von größerer Bedeutung (Sandoval-Acuna et al. 2014). Weiterhin können Polyphenole, wie Acy in der vorliegenden Studie im Gehirn gezeigt hat, ihre Effekte über die Aktivierung von SIRT1-Signalwegen vermitteln. *In vitro* wurden die Effekte von potenziellen SIRT1-Aktivatoren, einschließlich Catechin, Tyrosol und Resveratrol sowie ihre Kombination von Giovannini and Bianchi untersucht. Eine signifikant synergistische Erhöhung der SIRT1-Expression erfolgte beispielsweise für verschiedene Kombinationen aus Tyrosol und Catechin. Jedoch konnten nicht alle Kombinationen in diesen Studien einen solchen Effekt zeigen. Auch hatte die Einzelbehandlung der untersuchten Substanzen eine höhere AMPK-Aktivierung zur Folge als die Kombinationen (Giovannini and Bianchi 2017). Eine solche gegenteilige Interaktion der Polyphenole könnte auch in dieser Arbeit vorliegen.

In der Literatur finden sich zu den Effekten von Kombination aus TOP nur wenig Studien. Die Kombination von 1 μ M Resveratrol und 10 μ M Hy konnte gegenüber den Einzelsubstanzen einen leicht synergistischen Effekt hinsichtlich der Verminderung von Prostaglandin E2 in Lipopolysaccharid-stimulierten Makrophagen vermitteln (Bigagli et al. 2017). Die Kombination von 3 μ M Resveratrol und 10 μ M Tyrosol reduzierte die H₂O₂-Produktion von Makrophagen, die mit oxidiertem LDL stimuliert wurden. Die Einzelsubstanzen hatten nur in höheren Konzentrationen einen Effekt (Vivancos and Moreno 2008). Im Tiermodell wurde der fertige Extrakt Oleogrape[®]SEED mit 6,5 mg Hy und 30 mg Traubenkernprocyanidinen/100 g von Mevel et al. untersucht. Die 3-monatige Gabe des Extrakts vermittelte in Osteoarthritis-Modellen der Maus und des Kaninchens antiinflammatorische und chondroprotektive Effekte. Auch in primären Chondrozyten konnten diese Effekte sowohl nach Inkubation mit dem nativen Extrakt als auch nach Inkubation mit Kaninchenserum infolge einer 6-tägigen Extraktfütterung beobachtet werden. Im Serum der gefütterten Kaninchen wurden eine Reihe von Polyphenolmetaboliten detektiert, einschließlich Sulfat- und Glucuronid-Konjugate von Hy, Tyrosol, Catechinen sowie mikrobielle Abbauprodukte (Mével et al. 2016). *In vitro* wurden synergistische Effekte für Epigallocatechingallat und Quercetin hinsichtlich der Zellproliferation beobachtet. Durch die Hemmung der Catechol-*O*-Methyltransferase ließ Quercetin in Prostatakarzinomzel-

len die Konzentration an unmethyliertem antiproliferativ wirkenden Epigallocatechingallat ansteigen (Wang et al. 2012b). Eine gegenseitige Beeinflussung des Metabolismus ist somit auch möglich.

5.7.1.2 Mausmodell C57BL/6J

Im Gehirn gealterter C57BL/6J-Mäuse konnte durch die Fütterung der Einzelkomponenten Acy (200 mg/kg KG) und Hy (100 mg/kg KG) eine milde Verbesserung ausgewählter mitochondrialer Parameter erzielt werden. Die Fütterung der Kombination Acy+Hy hatte keinen günstigen Einfluss auf die erfassten Parameter und verminderte die Komplex IV-Aktivität signifikant.

Inwieweit die Verminderung der Effekte der Polyphenolkombinationen in den Zellkulturstudien über die Interaktion bei direkten antioxidativen Mechanismen ausgelöst worden sind oder ob andere Mechanismen wie der SIRT1-oder NFE2L2-Signalweg involviert waren, die auch für die Effekte im Mausgehirn von Relevanz sein können, bleibt zu klären.

Die in den Tierstudien beobachtete verminderte Aktivität von Komplex IV nach Acy+Hy-Fütterung steht im Gegensatz zu anderen Tierstudien, in denen eine Erhöhung der Komplex V-Aktivität nach Aufnahme von Polyphenolen im Gehirn beobachtet wurde (Ortmann et al. 2016; Porquet et al. 2014). Negative Effekte auf die Komplex IV-Aktivität wurden von Oliveira et al. nach Gabe von klinischen Vitamin A-Dosen (4.500 und 9.000 IU/kg/Tag) im Striatum von Ratten beobachtet. Die Autoren finden eine erhöhte Komplex I-III-Aktivität, aber eine signifikant verminderte Komplex IV-Aktivität sowie eine gesteigerte mitochondriale Lipidperoxidation und antioxidative Abwehr (Oliveira et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die verminderte Komplex IV-Aktivität nicht von erhöhten Aktivitäten anderer mitochondrialer Komplexe begleitet. Eine verminderte Cyt c-Konzentration ist ein weiterer Faktor, der zu einem Rückgang der Komplex IV-Aktivität führen könnte. In der Vitamin A-Studie war die Komplex IV-Verminderung nicht mit einer Caspase-3-induzierten erhöhten Cyt c-Freisetzung aus den Mitochondrien verbunden (Oliveira et al. 2009).

Wie schon für Hy als Einzelsubstanz ausführlich diskutiert, liegt die Hy-Dosis von 100 mg/kg KG zwar deutlich unter dem NOAEL, jedoch höher als in anderen Studien, die neuro- und mitoprotektive Effekte beobachten konnten. In der Acy+Hy Gruppe wurde diese Dosis mit 200 mg/kg KG des Traubenextrakts Acy kombiniert, der als Einzelsubstanz milde günstige Effekte gezeigt hatte. Auch die Dosis des Traubenextrakts liegt in einem sicher einsetzbaren Bereich. Zur Erlangung des GRAS-Status eines Traubenextrakts des ExGrape-Herstellers wurden Toxizitätsdaten von Traubenkern- und Traubenschalenextrakten analysiert und ein NOAEL bei Ratten von ca. 1,8 g/kg KG vorgeschlagen (U.S. Food and Drug Administration 2013). Umgerechnet auf die Maus würde sich daraus somit eine Dosis von ca. 3,5 g/kg KG

ergeben (Nair and Jacob 2016). Dennoch ist es nicht auszuschließen, dass die Kombination mit der hohen Dosis Hy zu gegenteiligen Effekten führen kann.

Nach der Hormesis-Theorie sind Polyphenole Verbindungen, die in den normal konsumierten Mengen adaptive Stressabwehrmechanismen aktivieren und günstige Effekte haben. Werden sie in sehr hohen Mengen konsumiert, können sie negative Auswirkungen haben (Murugaiyah and Mattson 2015). Nach Calabrese et al. (2007) hat der Effekt eines hormetischen Stressors einen zweiphasigen Verlauf. Mit steigender Dosis kommt es zunächst zu einem günstigen Effekt, der nach einem Maximum wieder in Richtung des unstimulierten Zustands vermindert wird. Nach Überschreitung der günstigen Dosis (10-20-facher Dosisbereich) geht die Kurve in einen negativen Effekt über (Calabrese et al. 2007). Eine geringe Aktivierung von Rezeptoren des Neurotransmitters Glutamat kann beispielsweise auch Stressabwehrmechanismen in Neuronen anregen und Neuroplastizität vermitteln, wohingegen eine sehr hohe Aktivierung (Exzitotoxizität) zum Absterben der Nervenzellen führt (Calabrese et al. 2007).

In der APP-Thy-1-Studie wurde keine Verminderung der Komplex IV-Aktivität nach Fütterung mit Res+Ol (RO-Gruppe) gefunden, jedoch auch keine weiteren günstigen Effekte. Für diese Studie wurde die über Ol erreichte Hy-Dosis von 100 auf 50 mg/kg KG heruntersetzt. Weiterhin erfolgte die Fütterung nur über einen Zeitraum von 8 Wochen anstatt 6 Monaten. Demgegenüber zeigte sich in der Gruppe, die zusätzlich zu der RO-Intervention über *Environmental Enrichment* stimuliert wurden (ROEn) eine verminderte Komplex IV-Aktivität. Besonders für die ROEn Männchen konnte zudem eine erhöhte Aggressivität festgestellt werden, die mit einer hohen Sterberate verbunden war. Es ist somit möglich, dass in diesem Fall die Addition der günstigen „Stressoren“ zu einem negativen Effekt geführt hat.

Wie in Kapitel 1.3.6 beschrieben, ist die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen im Gehirn sehr gering, sodass sich die Frage stellt, inwieweit die hier eingesetzten Konzentrationen ausreichen, um negative Effekte zu vermitteln. Auch steht diese Überlegung in einem gewissen Gegensatz zu der Vermutung, dass die Polyphenole im Acy eine zu geringe Bioverfügbarkeit hatten, um ausgeprägte Effekte zu vermitteln. Dennoch könnten diesbezüglich Unterschiede zwischen TOP vorliegen. Beispielsweise könnte die BBB erst bei höheren Konzentrationen permeabel für bestimmte Hy-Metabolite sein. Zu diesem Schluss kommen (Lopez de las Hazas et al. 2015), die Ratten oral Hy in den Dosen 1 mg, 10 mg und 100 mg/kg KG verabreichten. Nach 100 mg/kg KG stiegen die Gehirnkonzentrationen von Hy-Sulfat, Homovanillinsäure und dessen Sulfat sowie Homovanillinalkoholsulfat signifikant gegenüber den niedrigeren Dosen an (Lopez de las Hazas et al. 2015). Eine hohe kombinierte Dosis könnte weiterhin die Enzyme der Phase-

II-Enzyme sättigen, sodass mehr unkonjugierte, aktive Verbindungen das Gehirn erreichen (Manach et al. 2004; Wang et al. 2012b).

Im Gegensatz zu den diskutierten Ergebnissen in C57BL/6J-Mäusen hatte die Kombination von TOP in gealterten NMRI-Mäusen keinen vermindernden Effekt auf die Komplex IV-Aktivität, auch nicht in Kombination mit *Environmental Enrichment*. Vielmehr zeigte sich ein günstiger Effekt auf die Expression von Genen, die mit der mitochondrialen Funktion und Hormesis verbunden sind. Die Ergebnisse der Studie sollen in Kapitel 5.7.2 separat diskutiert werden.

Diese unterschiedlichen Effekte im C57BL/6J- und NMRI-Mausmodell könnten im Zusammenhang mit den in Kapitel 5.2 ausführlich diskutierten Einschränkungen des C57BL/6J-Modells und einer daraus resultierenden höheren Anfälligkeit für „Stressoren“ und möglicherweise auch hohen Polyphenoldosen stehen. Weiterhin wurde in der Studie an NMRI-Mäusen die Hydosis halbiert, die hier zudem in Form des natürlichen OMWW-Extrakts verabreicht wurde.

5.7.2 Kombination aus TOP mit zusätzlicher Stimulierung

Neben der Ernährung als Lebensstilfaktor kommt der körperlichen Aktivität und/oder der geistigen Aktivität bei der Erhaltung der Funktionsfähigkeit des Gehirns große Bedeutung zu. Eine Intervention, die als Stimulierung der körperlichen und geistigen Aktivität im Tiermodell eingesetzt wird, ist das *Environmental Enrichment (En)* (Mora 2013). Dieses Modell bezeichnet die Haltung von Tieren in großen Käfigen, die mit Plattformen, Tunnel, Spielzeugen und Laufrädern bestückt sind und so die sozialen Interaktionen, das Lernen und das Gedächtnis erhöhen sollen. Der Einsatz von *En* bei Nagern konnte signifikante zelluläre, molekulare und verhaltensbezogene Veränderungen, besonders im Hippocampus hervorbringen. Ratten und Mäuse, die in einem *En* gehalten werden, zeigen beispielsweise eine bessere Lern- und Gedächtnisfähigkeit, eine gesteigerte Neurogenese im Hippocampus und die Bildung neuer Synapsen. Wie die körperliche Aktivität führt auch *En* zu einer Erhöhung von Neurotrophinen einschließlich BDNF, ein Faktor der generell für die gesteigerte Neurogenese dieser Interventionen im Hippocampus verantwortlich sein könnte (Mora et al. 2007). In Mausmodellen der AD konnte *En* die kognitive Leistung verbessern (Wolf et al. 2006; Jankowsky et al. 2005) und die Akkumulation von A β vermindern (Lazarov et al. 2005).

Eine wichtige Komponente des *En*s ist das Laufrad, das auf freiwilliger Basis von den Tieren genutzt werden kann. Eine Reihe von Studien weisen darauf hin, dass körperliche Aktivität bei Nagern einen positiven Einfluss auf den Energiemetabolismus und die Funktion des Gehirns nehmen kann. Gealterte Mäuse, die für einen Monat ein Laufrad benutzen, zeigten Verbesserungen im Lernen sowie eine gesteigerte Neurogenese im Hippocampus (van Praag et al. 2005). Nach 8-wöchiger forcierter körperlicher Aktivität über der Laktatgrenze zeigten gealterte

Mäuse Zeichen einer erhöhten mitochondrialen Biogenese und Neurogenese. Kürzliche Studien mit Nagern verstärken die Hinweise, dass den Mitochondrien bei den durch körperliche Aktivität vermittelten Effekten im Gehirn eine entscheidende Bedeutung zukommt. Die forcierte körperliche Aktivität verbesserte sowohl im Gehirn alter Mäuse sowie junger Ratten mitochondriale Funktionen, einschließlich der mitochondrialen Komplexe (Gusdon et al. 2017; Marques-Aleixo et al. 2015). Auch Studien in Mausmodellen der AD zeigen relativ konsistent, dass körperliche Aktivität eine Verbesserung des räumlichen Gedächtnisses und der Funktion des Hippocampus erbringen kann (Intlekofer and Cotman 2013).

In einer Studie an NMRI-Mäusen sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit die TOP-Kombination aus Res (200 mg/kg KG) und Ol (50 mg/kg KG Hy) bei einer Fütterung über 6 Monate allein (RO) sowie durch zusätzliche *En*-Intervention (ROEn), beginnend im Alter von 12 Monaten, vor der Gehirnalterung schützen kann. Die Effekte im Alter von 18 Monaten wurden mit einer gleichaltrigen Kontrolle und einer jungen Gruppe im Alter von 3 Monaten verglichen. Die Ergebnisse der Studie sind in Abb. 5.5 zusammenfassend dargestellt.

Die RO- und ROEn-Intervention über 8 Wochen im AD-Modell Thy-1-APP sollen aufgrund der fehlenden mitochondrialen und kognitiven Dysfunktion neben der schon diskutierten Komplex IV-Verminderung nicht weiter behandelt werden.

5.7.2.1 Genexpression und mitochondriale Dysfunktion

Wie bereits in Kapitel 5.2.2 beschrieben, zeigten NMRI-Mäuse in einem Alter von 18 Monaten gegenüber 3 Monate alten Tieren im Gehirn signifikante Abnahmen der Genexpression von CREB, PGC1 α , AMPK und Komplex IV, eine numerisch deutliche Abnahme von BDNF sowie Abnahmen von SIRT1, SIRT3 und Komplex I. Die alleinige RO-Intervention konnte die verminderte Expression von Komplex I signifikant sowie von CREB, PGC1 α , SIRT3 und Komplex IV numerisch erhöhen. Einen insgesamt stärkeren Effekt zeigte ROEn mit einer signifikanten Erhöhung von CREB, PGC1 α , Komplex I und IV, sowie einer numerischen Erhöhung von AMPK und BDNF. Die Genexpression wurde nur im männlichen Teil der gemischten Studiengruppe erfasst, da sich dort hinsichtlich der ATP-Spiegel und der mitochondrialen Atmung ein größerer Alterseffekt ergab. Weiterhin war nur in dieser Gruppe ein, wenn auch nicht signifikanter, aber deutlicher Effekt der Interventionen auf die ATP-Spiegel (für ROEn bis auf das Level der jungen Gruppe) zu beobachten. Hinsichtlich des MMPs und der mitochondrialen Atmung zeigte sich dieser Effekt jedoch nicht. Interessant wäre somit weiterhin, inwieweit sich die Genexpression der Weibchen von den Männchen unterscheidet. Außer der Genexpression

wurden alle anderen Parameter aufgrund der sonst kleinen Gruppengröße und folglich großen Variabilitäten insgesamt in der gemischten Gruppe beurteilt.

Die Hochregulierung der hier untersuchten Gene kann eine stärkere zelluläre Abwehr, erhöhte mitochondriale Biogenese und einen verbesserten Energiestoffwechsel induzieren. Dies wiederum kann einen günstigen Einfluss auf die synaptische Plastizität und Neurogenese nehmen und das Lernen und Gedächtnis verbessern. Die Abfolge der Signalkette ist vereinfacht in Abb. 5.5 dargestellt und wurde bereits in Kapitel 1.3.7 und 5.4.2 beschrieben. Auf einzelne Aspekte soll separat an geeigneter Stelle eingegangen werden.

Trotz einem signifikanten Effekt auf die Genexpression von PGC1 α als Masterregulator der mitochondrialen Biogenese konnte kein Einfluss der Alterung oder Interventionen auf die in der Signalkette folgenden Faktoren Tfam und Nrf1 beobachtet werden. Passend dazu konnte in alten Kontrolltieren nur ein numerischer Abfall der CS als Marker der mitochondrialen Masse und keine Erhöhung der CS in den Interventionsgruppen beobachtet werden. Neben einem fehlenden Effekt auf die mitochondriale Masse war auch der Einfluss der Polyphenolkombination und des zusätzlichen *Ens* auf funktionaler Ebene der Mitochondrien gering. Es wurden lediglich numerische Verbesserungen der ATP-Spiegel und des MMPs detektiert sowie keine Effekte auf die mitochondriale Atmung. Da die Verbesserung der ATP-Spiegel in der gemischten Gruppe durch die Interventionen auf die Männchen zurückzuführen war, könnte es sein, dass die Änderungen der Genexpression in den Weibchen weniger stark ausgeprägt sind. Dementgegen konnte weder in der Gesamtgruppe noch in den Männchen ein Effekt auf die mitochondriale Atmung detektiert werden. Dies steht im Gegensatz zu der beobachteten hochregulierten Genexpression von Komplex I und IV durch RO und im stärkeren Ausmaß durch ROEn.

In der vorliegenden Arbeit wurde nur die mRNA-Expression erfasst, sodass die geringen funktionalen Effekte auch auf eine geringere mRNA-Translation zurückzuführen sein können bzw. auf veränderte Aktivierungen von regulierenden Faktoren. Die Kinase AMPK, deren Genexpression durch die ROEn-Intervention hochreguliert wurde, inhibiert beispielweise die Aktivität der Kinase *Target of rapamycin* (mTOR). Neben der Aktivierung von AMPK und SIRT1 können Polyphenole, u.a. Resveratrol, auch die Phosphorylierung von mTOR hemmen. Generell wird die Inhibierung von mTOR durch Polyphenole als bedeutender Mechanismus für die günstigen Effekte von Polyphenolen auf die Lebensspanne und altersbedingte Erkrankungen angesehen.

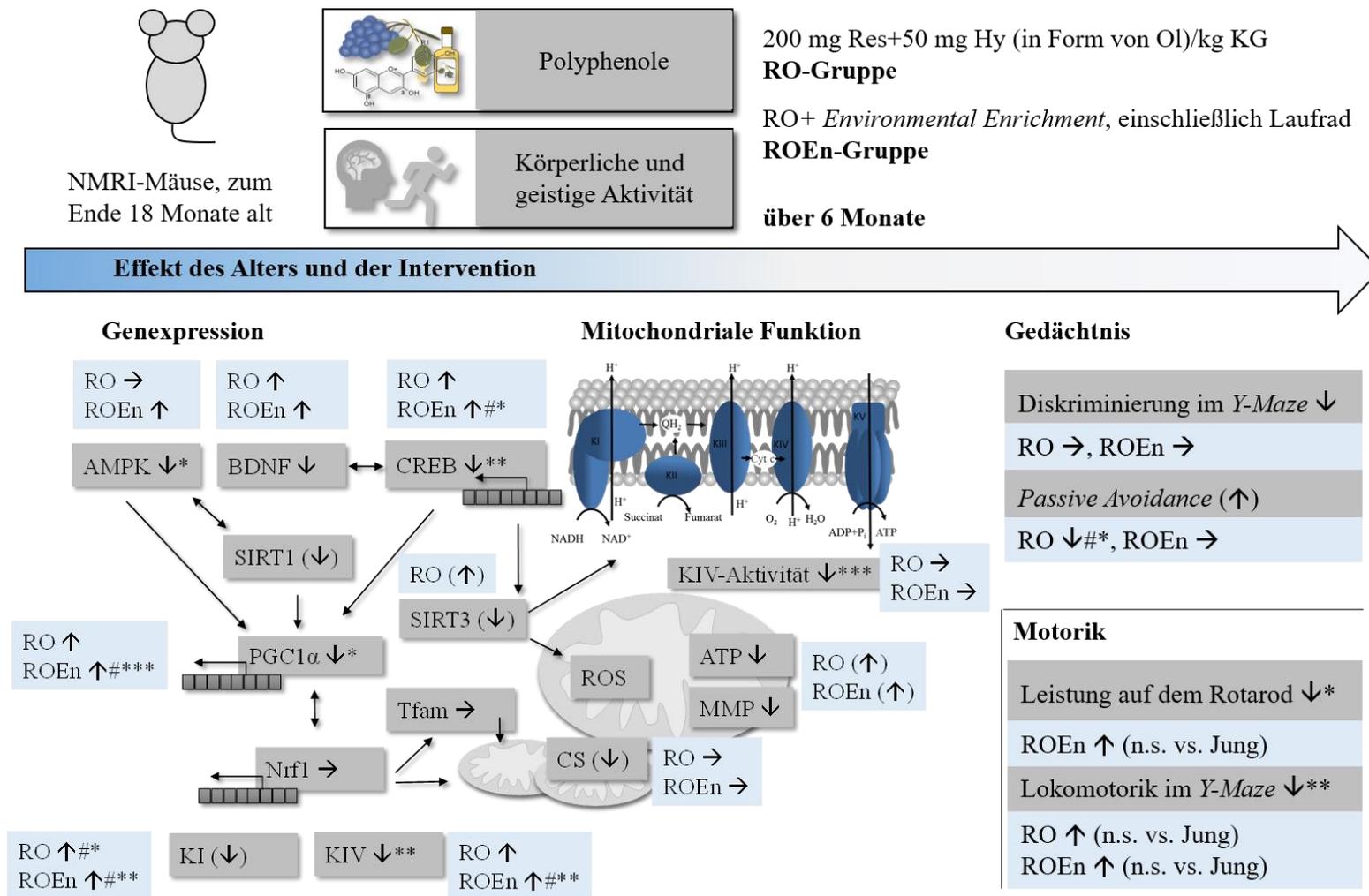


Abb. 5.5: Zusammenfassung der Effekte von RO und ROEn in gealterten NMRI-Mäusen. Effekte in grauen Kästen stellen die Effekte der Alterung (Alt vs. Jung) dar, Effekte in blauen Kästen stellen Effekte der Interventionen (Alt RO/ROEn vs. Alt) dar; ↑/↓*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ vs. Jung; ↑/↓#** $p < 0,01$, #* $p < 0,05$, vs. Alt, ↑/↓: deutliche numerische Effekte, (↑/↓): geringere numerische Effekte, →: kein Effekt; die Genexpression wurde nur im männlichen Teil der gemischten Gruppe erhoben, CS: Citratsynthase-Aktivität, n.s.: nicht signifikant.

Da der mTOR-Signalweg neben der Hemmung der Autophagie jedoch auch für die Hochregulierung der Proteinsynthese zuständig ist, könnte eine verminderte Proteinsynthese in der vorliegenden Studie eine Rolle gespielt haben (Pazoki-Toroudi et al. 2016). Der mTOR-Signalweg stimuliert beispielsweise die Synthese von Tfam und Komplex I und V durch die Erhöhung ihrer mRNA-Translation. Er reguliert jedoch auch die PGC1 α -Expression hoch (Morita et al. 2015). Für Resveratrol wurde beispielsweise eine Hemmung der Proteintranslation in HepG2-Zellen beobachtet (Villa-Cuesta et al. 2011).

Weiterhin ist es möglich, dass Effekte in spezifischen Subpopulationen der Mitochondrien wie beispielsweise in präsynaptischen Mitochondrien vorliegen, die in dem heterogenen Mitochondrienisolat nicht erfasst wurden (Stauch et al. 2015). Die Effekte von TOP einzeln und in Kombination wurden in den vorherigen Kapiteln bereits Ergebnissen anderer Studien gegenübergestellt. Ein weiterer Punkt der angemerkt werden soll, ist der unterschiedliche Effekt auf die SIRT1-Genexpression nach Acy-Fütterung und der Kombination mit Res. Während nach der Fütterung mit Acy im Gehirn der C57BL/6J-Mäuse eine signifikante SIRT1-Erhöhung beobachtet wurde, blieb SIRT1 nach der Fütterung der Kombination von Ol mit Res und somit einem höheren Resveratrolgehalt bei NMRI-Mäusen unbeeinflusst. Dies steht im Gegensatz zu einer Reihe anderer bereits beschriebenen Studien, die eine SIRT1-Induktion durch Resveratrol fanden. Auch über die Verabreichung von Res lag die tägliche Aufnahme von Resveratrol in der NMRI-Studie jedoch nur bei < 1 mg/kg KG.

5.7.2.2 Genexpression, Gedächtnis und Motorik

In den durchgeführten Verhaltenstests zur Gedächtnisleistung konnten keine interventionsvermittelten Effekte beobachtet werden. An dieser Stelle ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die Untersuchungen zur Gedächtnisleistung generell wenig Unterschiede auch hinsichtlich eines Effekts der Alterung ermitteln konnten (siehe dazu Kapitel 5.3.1). Die Untersuchung von Genen, die mit neuronaler Plastizität verbunden sind, zeigten in gealterten NMRI-Mäusen eine verminderte Expression. Das präsynaptische Vesikelprotein Synaptophysin 1 wies eine signifikant verminderte Genexpression im Gehirn gealterter Kontrolltiere auf. Die Interventionen konnten die Expression gering anheben, sodass sich diese nicht mehr signifikant von den jungen Kontrolltieren unterschieden. Synaptophysin 1 wird mit dem Alter beim Menschen und der Maus im Hippocampus sowie verschiedenen kortikalen Hirnregionen vermindert vorgefunden und konnte in gealterten Mäusen durch *En*-Intervention erhöht werden (Frick and Fernandez 2003; Tarsa and Goda 2002). BDNF ist ein Neurotrophin, welches entscheidene Aufgaben bei der Differenzierung von Nervenzellen, dem Neuritenauswuchs und der Bildung neuer Synapsen

übernimmt. Eine verminderte BDNF-Signalgebung wird mit einem verminderten Hirnmetabolismus und Neurodegeneration verbunden (Marosi and Mattson 2014). Die numerisch deutlich erniedrigte BDNF-Genexpression in gealterten Mäusen konnte durch die RO- und stärker durch die ROEn-Intervention angehoben werden. Die BDNF-Genexpression kann von CREB stimuliert werden, dessen Expression durch die RO- und wiederum stärker und signifikant durch die ROEn-Intervention gesteigert wurde. BDNF ist in der Lage, über verschiedene Wege die neuronale ATP-Produktion zu erhöhen. Dazu gehört ein vermehrter Glucosetransport, die Hochregulierung von PGC1 α , eine bessere Kopplungseffizienz der synaptischen Mitochondrien und eine verbesserte antioxidative Abwehr (Marosi and Mattson 2014).

Die mitochondriale Dysfunktion im Alter betrifft nicht nur das Gehirn. Auch im Muskel findet sich beispielweise eine verminderte PGC1 α -Signalgebung und folglich mitochondriale Biogenese (Kang et al. 2013). Mitochondriale Dysfunktionen werden mit dem im Alter auftretenden zunehmenden Abbau von Muskelmasse und Muskelkraft in Verbindung gebracht und PGC1 α -Stimulatoren, wie körperliche Aktivität oder Polyphenole, können diesem möglicherweise entgegenwirken (Rodriguez-Bies et al. 2016). Die Fütterung mit Resveratrol förderte bei alten Mäusen den Effekt von forcierter körperlicher Aktivität und verbesserte die Ausdauer, die Koordination auf dem Rotarod und die Muskelkraft (Rodriguez-Bies et al. 2016).

In der vorliegenden Arbeit war, im Gegensatz zu der kognitiven Leistung, die motorische Leistung auf dem Rotarod sowie die lokomotorische Aktivität im *Y-Maze* in den alten Gruppen gegenüber der jungen Gruppe signifikant vermindert. Durch die Interventionen mit RO und ROEn deuteten sich leichte Verbesserungen der Motorik an. Die lokomotorische Aktivität in den beiden Interventionsgruppen lag zwar numerisch unterhalb der Gruppe Jung, unterschied sich im Gegensatz zur Kontrollgruppe Alt jedoch nicht signifikant von der Gruppe Jung. Gleiches gilt für die Gruppe Alt ROEn hinsichtlich der Leistung auf dem Rotarod. Eine signifikante Erhöhung gegenüber der Leistung der Kontrollgruppe Alt konnte in beiden Fällen jedoch nicht detektiert werden. Die Untersuchung der mitochondrialen Funktion im Muskelgewebe wäre hier weiterführend interessant. Hinsichtlich der antioxidativen Antwort durch Resveratrol und Bewegung wurde beispielsweise eine Organabhängigkeit detektiert (Tung et al. 2015). Darüber hinaus konnte bei Ratten die forcierte Bewegung auf dem Laufrad der altersbedingten verminderten Synthese mitochondrialer Proteine im Muskel entgegenwirken (Kang et al. 2013). Bei Mäusen hatte der lebenslange Gebrauch eines Laufrads, aber nicht die Verabreichung von Resveratrol einen Effekt auf mitochondriale Markerproteine im Muskel. Weiterhin zeigte die Kombination aus beidem keine besseren Effekte als die körperliche Aktivität allein, die über PGC1 α vermittelt wurde (Ringholm et al. 2013). Dies steht im Gegensatz zu (Rodriguez-Bies et al.

2016), die einen positiven Effekt der Kombination mit Resveratrol finden, jedoch den Ansatz der forcierten Aktivität verfolgen.

Neben den Veränderungen von mitochondrialen Funktionen im Muskel könnten auch Hirnregionen beeinflusst werden, die in der vorliegenden Studie nicht erfasst wurden. Bei altersbedingten Beeinträchtigungen der Motorkoordination sind beispielsweise Veränderungen im Cerebellum involviert (Bickford et al. 1999; Arshad and Seemungal 2016). In die hier durchgeführten Untersuchungen zur mitochondrialen Funktion ging das Cerebellum nicht ein.

Die ROEn-Intervention mit zusätzlichem En zeigte hinsichtlich der meisten der untersuchten Parameter einen höheren Effekt als die alleinige Futteranreicherung mit TOP. Jedoch wurden auch für ROEn insgesamt in NMRI-Mäusen nur geringe Effekte auf die mitochondriale Funktion und die untersuchten Verhaltensparameter detektiert.

Wenige Studien untersuchten bisher den Einfluss einer Kombination aus Polyphenolen mit *En* oder mit körperlicher Aktivität auf die mitochondriale oder kognitive Funktion. Eine Intervention mit *En* oder zusätzlicher Fütterung mit Resveratrol konnte im Gehirn von jungen Mäusen die Malondialdehyd-Konzentrationen senken (Muhammad et al. 2017). Im APP/PS1-Mausmodell der AD konnte die Kombination von Epicatechin und forciertes körperlicher Aktivität kognitive Defizite reduzieren sowie A β -Level und oxidativen Stress vermindern. (Zhang et al. 2016). In C57BL/6J-Mäusen hatte Epicatechin zudem besonders zusammen mit einem Laufrad günstige Effekte auf die Gedächtnisleistung im MWM (van Praag et al. 2007)

5.7.3 Übertragung auf den Menschen

In der vorliegenden Arbeit wurden Polyphenole als ausgewählte Komponenten der MeDi untersucht, die möglicherweise zu dem protektiven Potenzial einer solchen Ernährungsweise beitragen können (vergleiche Kapitel 1.3.1). Neben epidemiologischen Studien beschäftigen sich auch erste klinische Studien mit dem Effekt von Komponenten der MeDi. Eine randomisierte, doppel-blinde Studie untersuchte beispielsweise den Effekt eines Polyphenolextraktgemisches (370 mg Polyphenole/Tag) aus Früchten und Gemüse, die in der MeDi üblicherweise konsumiert werden. Die 12-wöchige Aufnahme des Extraktgemisches konnte im Blut von übergewichtigen Frauen die SOD-Aktivität erhöhen und die Malondialdehydkonzentrationen senken (Cases et al. 2015). Schlussendlich ist die Ernährung des Menschen von sehr viel komplexerer Natur als die Anreicherung einer Standardnahrung in Studien an Mäusen oder auch unter den Bedingungen einer klinischen Studie. Auch wenn diese Standardbedingungen die Identifizie-

rung von Effekten einzelner Verbindungen ermöglichen, können in der menschlichen Ernährung wie beispielsweise der MeDi eine Vielzahl von Inhaltsstoffen einen Einfluss haben und so die günstigen Effekte vermitteln (Jacobs and Tapsell 2013). In einer klinischen Studie wird derzeit untersucht, wie gut sich über 65-Jährige mit normalen kognitiven Leistungen, MCI und AD an eine MeDi über 6 Wochen halten können (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02921672).

Körperliche Aktivität ist eine zunehmend wahrgenommene Strategie, um die Prozesse der Alterung und Neurodegeneration zu vermindern. In einer prospektiven Kohortenstudie stellten die starke Orientierung an der MeDi und die körperliche Aktivität zwei unabhängige Faktoren dar, die mit einem verminderten AD-Risiko assoziiert waren (Scarmeas et al. 2009b).

Körperliche Aktivität stimuliert die Angiogenese und Neurogenese. Sie hat einen günstigen Einfluss auf die mitochondriale Funktion und induziert Neurotrophine und Wachstumsfaktoren, welche die Neuroplastizität erhöhen und Funktionen des Hippocampus verbessern, sogar im fortgeschrittenen Alter oder bei bestehender AD (Intlekofer and Cotman 2013). Beim alternden Menschen konnte die körperliche Aktivität kognitive Leistungen sowohl nach akuter Belastung als auch nach Langzeittraining oder Lebensstilkomponente günstig beeinflussen. Nach 30-minütiger moderater aerober körperlicher Aktivität zeigte sich beispielsweise bei älteren Probanden eine verbesserte allgemeine kognitive Funktion sowie eine spezielle Verbesserung der exekutiven Fähigkeiten (Chu et al. 2015). Eine Metaanalyse kommt zu dem Schluss, dass aerobe körperliche Aktivität für 1-12 Monate das Gedächtnis, die Aufmerksamkeit, die Verarbeitungsgeschwindigkeit und die exekutiven Funktionen bei älteren Menschen verbessern kann. Der Einfluss bei MCI-Patienten könnte der Analyse nach ausgeprägter sein als bei Gesunden (Smith et al. 2010). Ältere gesunde Erwachsene aus der *Canadian Study of Health and Aging* zeigten zudem über eine 5-Jahres-Periode durch körperliche Aktivität ein geringes Risiko für Demenz, wenn sie keine APOE4-Träger waren (Fenesi et al. 2017). Auch die generelle körperliche Aktivität im Laufe des Lebens hat einen positiven Einfluss auf die Kognition. So konnte kürzlich eine Verbindung zwischen einer verbesserten kognitiven Leistung im Alter und der körperlichen Aktivität im Leben insgesamt, der körperlichen Aktivität des letzten Jahres und der körperlichen Aktivität mit hoher Intensität identifiziert werden (Gill et al. 2015).

Auch der Effekt einer Kombination aus Polyphenolen und körperlicher Aktivität wird derzeit in ersten klinischen Studien erforscht. Die Kombination einer Resveratrol-Supplementierung mit körperlicher Aktivität soll in über 65-Jährigen hinsichtlich des Einflusses auf physische Funktionen geprüft werden (ClinicalTrials.gov: NCT02523274). Der Einfluss von Resveratrol

auf die mitochondriale Funktion soll weiterhin in einer Studie mit über 65-Jährigen über 3 Monate im Muskelgewebe erforscht werden. Zu den erfassten Parametern gehören die mitochondriale Atmung, die Komplex IV-Aktivität sowie Proteinexpressionsraten von PGC1 α , SIRT1 und 3 und AMPK. Begleitend werden Untersuchungen zur physischen Leistung, Muskelermüdung und Ganggeschwindigkeit durchgeführt (ClinicalTrials.gov: NCT02123121).

Die Stimulierung der geistigen Aktivität, die auch eine Komponente der *En*-Intervention in der vorliegenden Arbeit war, wird hinsichtlich der Alterung und Neurodegeneration umfassend erforscht. Vemuri et al. (2014) zeigen in einer longitudinalen Studie mit 70-89-Jährigen aus der *Mayo Clinic Study of Aging*, dass ein höherer Bildungsgrad bzw. Berufslevel sowie die kognitive Aktivität in der mittleren bis späten Phase des Lebens mit einer höheren kognitiven Leistung assoziiert ist. Die Autoren postulieren weiterhin, dass eine hohe geistige Anregung im Leben gegenüber einer geringen Anregung das Auftreten von kognitiven Verlusten bei APOE4-Trägern um 8,7-8,8 Jahre verzögern könnte (Vemuri et al. 2014). Eine Metaanalyse von Hill und Kollegen (2017) untersuchte den Effekt von computerbasiertem kognitiven Training bei älteren Menschen und Demenzkranken. Das Training konnte bei Menschen mit MCI, aber nicht Demenz, die allgemeine kognitive Leistung, das Gedächtnis und die Aufmerksamkeit verbessern (Hill et al. 2017). In einer kürzlich veröffentlichten randomisiert-kontrollierten Studie konnte durch computerbasiertes kognitives Training bei Patienten mit milder AD eine Verbesserung hinsichtlich des Gedächtnis, der Sprache und der exekutiven Funktion erzielt werden, die über 6 Monate stabil blieb (Cavallo et al. 2016).

5.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sollte die Annahme geprüft werden, dass TOP die mitochondriale Dysfunktion im Gehirn über Mechanismen der Hormesis vermindern können und so vor Beeinträchtigungen der kognitiven Funktionen bei der Alterung und AD schützen können.

Der anthocyanreiche Traubenextrakt Acy konnte in gealterten Mäusen nur geringe Effekte auf die mitochondriale Funktion im Gehirn vermitteln. Die SIRT1-Genexpression lag im Gehirn erhöht vor, führte aber nicht zu einer gesteigerten Expression von PGC1 α und nachfolgenden Faktoren in der Signalkette der mitochondrialen Biogenese oder einer erhöhten CS. Auch konnten keine eindeutigen Verbesserungen in Gedächtnistests ermittelt werden. Eine Verbesserung der mitochondrialen und kognitiven Dysfunktion über die Steigerung der mitochondrialen Bi-

ogenese konnte kürzlich für einen Reiskleie-Extrakt in einer vergleichbaren Studie gezeigt werden (Hagl et al. 2016a). Ein solcher Effekt konnte somit in dieser Arbeit für Acy nicht bestätigt werden.

Ein bedeutender Faktor im Zusammenhang mit den Effekten von Acy könnte die Bioverfügbarkeit der enthaltenen Polyphenole sein. Im Zellmodell konnte Acy vor mitochondrialer Dysfunktion schützen. Im Organismus unterliegen Polyphenole jedoch einem extensiven Metabolismus und müssen die BBB überqueren, sodass im Gehirn oftmals Metabolite vorliegen sowie sehr geringe Konzentrationen (vergleiche Kapitel 1.3.5). Zwei mögliche Abbauprodukte von TOP zeigten im Zellmodell gegenüber den Ausgangsverbindungen geringere bis keine Effekte. Eine stärkere Konzentrierung auf *in vivo* Metabolite in physiologischen Konzentrationen wäre im *in vitro* Modell weiterhin sinnvoll. Acy beinhaltet einen großen Anteil an Proanthocyanidinen, deren Bioverfügbarkeit gering ist (siehe Kapitel 1.3.5). Bensalem et al. setzen beispielsweise ein Gemisch aus Trauben- und Heidelbeerpolyphenolen ein, das speziell aus Verbindungen mit geringem Molekulargewicht besteht (Bensalem et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit war die Analyse von Polyphenolen und deren Metaboliten im Blut oder Gehirn von Mäusen nach Aufnahme von Acy nicht möglich. Die nur milden Effekte im Gehirn könnten darauf zurückzuführen sein, dass nur sehr geringe Mengen an Polyphenolen das Gehirn erreicht haben. Wang et al. setzen ein Gemisch aus Concord-Traubensaft, Traubenkernpolyphenolen und Resveratrol ein, dessen Bioverfügbarkeit bei Ratten bestätigt wurde (Wang et al. 2012a; Wang et al. 2014). Nach der Beobachtung von günstigen Effekten hinsichtlich der kognitiven Leistung u.a. in einem AD-Mausmodell (Wang et al. 2014) wird der Effekt momentan in einer Humanstudie hinsichtlich der MCI untersucht (NCT02502253).

Im Zusammenhang mit der möglicherweise geringen Bioverfügbarkeit von Acy könnten die Effekte außerhalb des Gehirns von ausgeprägterer Natur sein. Eine lebenslange Verabreichung im Trinkwasser führte insgesamt zu keiner signifikant verschobenen Lebenskurve der Mäuse, hatte jedoch einen lebensverlängernden Effekt in einem Altersbereich, der beim Menschen einem Alter von ca. 70 Jahren entsprechen könnte. Weiterhin konnte die 6-monatige Futteranreicherung mit Acy die Genexpression in der Leber gegenüber dem Gehirn stärker beeinflussen. Bei dem Vergleich von Studien mit unterschiedlicher Verabreichungsform darf der Einfluss der Nahrungsmatrix jedoch nicht außer Acht gelassen werden (Bohn 2014).

Die Fütterung mit dem Olivenpolyphenol Hy konnte als Einzelsubstanz sowie in der Kombination mit Acy zu keiner deutlichen Verbesserung der mitochondrialen oder kognitiven Funktion führen. Die eingesetzte Hy-Dosis war in den Studien sehr hoch angesetzt und wird umgerechnet auf den Menschen, auch über eine Nahrungsanreicherung schwer erreicht. Es bleibt somit zu

klären, ob geringere Hy-Mengen bessere Effekte hinsichtlich der hier untersuchten Parameter zeigen können. Die Kombination aus Hy über den natürlichen Flüssigextrakt Ol mit dem weniger anthocyanreichen resveratrolangereicherten Traubenextrakt Res konnte die altersbedingte verminderte Expression von Genen in Mäusen verbessern, die in Zusammenhang mit der mitochondrialen Funktion und Hormesis stehen. Auch in dieser Studie waren die Effekte auf mitochondrialer und funktioneller Ebene gering. Eine Kombination von Res oder auch Acy mit einer geringeren Hy-Dosis könnte möglicherweise bessere Effekte erzielen.

Im Vergleich zu der Polyphenolintervention mit Res und Ol allein, konnte die zusätzliche Stimulierung der körperlichen und geistigen Aktivität über *En* einen höheren Effekt erbringen. Auf mitochondrialer und funktionaler Ebene war der Einfluss auch hier gering. Eine isolierte Betrachtung der *En*-Intervention zum Vergleich mit den Effekten in Kombination wäre hier weiterführend interessant. Abb. 5.6 liefert eine Zusammenfassung der vorangegangenen Überlegungen.

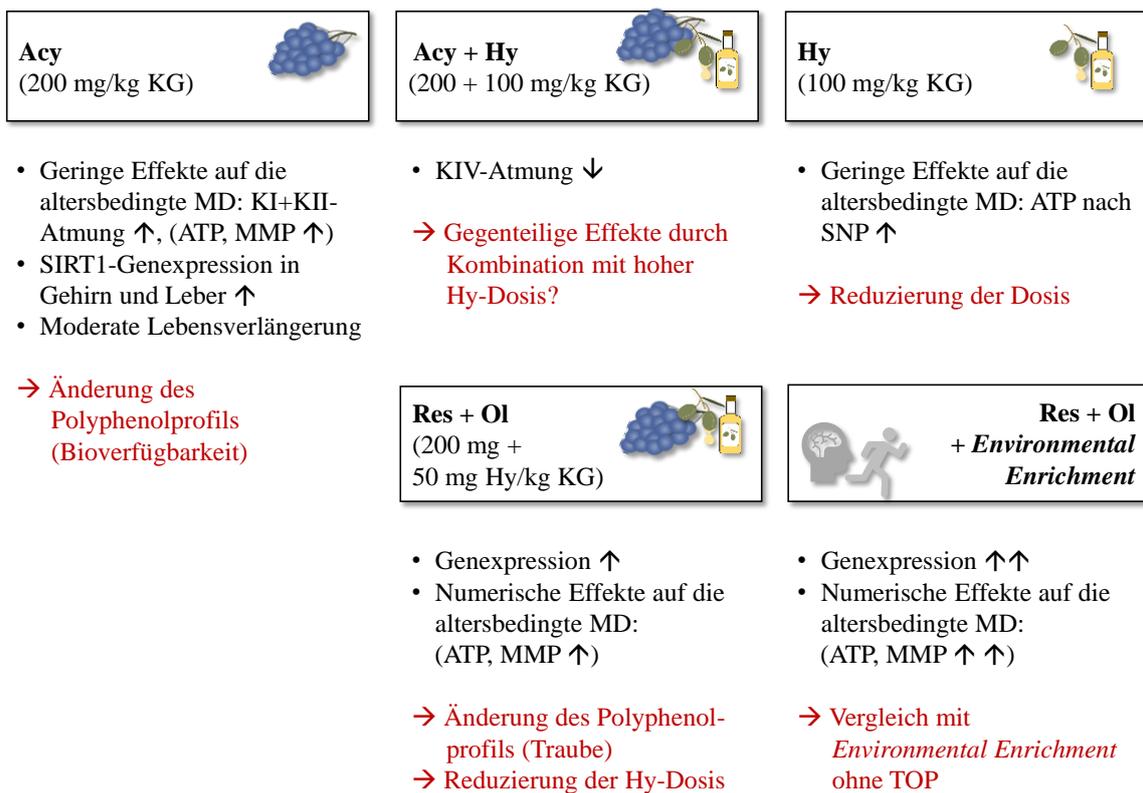


Abb. 5.6: Mögliche Ansatzpunkte für weiterführende Studien mit TOP. K: mitochondrialer Komplex, KG: Körpergewicht; MD: mitochondriale Dysfunktion, MMP: mitochondriales Membranpotenzial, SIRT: Sirtuin

6 Zusammenfassung

Immer mehr Menschen erreichen heutzutage ein hohes Lebensalter. Die Möglichkeiten, die sich aus einer langen Lebenszeit ergeben, sind stark davon abhängig, ob die gewonnene Lebenszeit bei guter Gesundheit ohne Erkrankungen und Beeinträchtigungen verbracht werden kann. Bei der Gehirnalterung kommt es zu unterschiedlich stark ausgeprägten Beeinträchtigungen der kognitiven und motorischen Fähigkeiten. Darüber hinaus steigt die Anfälligkeit gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Erkrankung (AD) für die bisher keine Therapie über die Linderung der Symptome hinaus existiert. Die AD trägt zum großen Teil zu den Demenzerkrankungen bei, die sich voraussichtlich in den nächsten 35 Jahren verdreifachen werden. Großer Bedeutung kommt daher der Identifizierung von präventiven Maßnahmen zu, die Alterungsprozesse verlangsamen können und somit vor neurodegenerativen Prozessen im Gehirn schützen können.

Ein Ansatzpunkt in diesem Zusammenhang ist die mitochondriale Dysfunktion (MD), die einen Schlüsselfaktor bei der Gehirnalterung und AD darstellen könnte. Mitochondrien als „Kraftwerke der Zellen“ versorgen Nervenzellen, die einen besonders hohen Energiebedarf haben, über die oxidative Phosphorylierung mit ATP. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die bei der mitochondrialen Atmung unweigerlich entstehen, können im Übermaß zu oxidativen Schäden an Mitochondrien führen, sodass ein Kreislauf aus MD und ROS in Gang gesetzt wird. Eine Stärkung der adaptiven Stressabwehr könnte in diesen Kreislauf eingreifen und somit vor den Prozessen der Hirnalterung und Neurodegeneration schützen.

Eine Steigerung von adaptiven Abwehrmechanismen ist nach dem Prinzip der Hormesis über den Einfluss von mildem zellulären Stress z. B. durch körperliche Aktivität und die Aufnahme von Polyphenolen möglich. Polyphenole aus Trauben und Oliven werden besonders reich bei der traditionellen mediterranen Ernährungsweise (MeDI) konsumiert, der ein mögliches neuroprotektives Potenzial hinsichtlich Alterungsprozessen und der AD zugesprochen wird.

Das Ziel dieser Forschungsarbeit war es, die Effekte von Trauben- und Olivenpolyphenolen (TOP) auf die mitochondriale und kognitive Dysfunktion bei der Gehirnalterung und AD im Zell- und Mausmodell zu untersuchen. Es sollte der Annahme nachgegangen werden, dass TOP eine MD im Gehirn über Mechanismen der Hormesis vermindern können und so vor Funktionsverlusten und Neurodegeneration schützen können.

Im Fokus der Untersuchungen stand zunächst der Traubenextrakt ExGrape Acy (Acy) mit hohem Anteil an Anthocyanen und Proanthocyanidinen. Im neuronenenähnlichen Zellmodell PC12

zeigte Acy ein erstes protektives Potenzial hinsichtlich der MD. Beeinträchtigungen des mitochondrialen Membranpotenzials (MMPs) und der ATP-Spiegel, die über die Induktion des NO-Donors SNP ausgelöst wurden, konnten sowohl in PC12_{neo}-Zellen als auch im zugehörigen AD-Modell PC12_{sw} vermindert werden. Weiterführend wurde Acy (200 mg/kg KG) in drei Studien mit C57BL/6J-Mäusen untersucht. Der Schwerpunkt der Untersuchung lag auf der altersbedingten MD im Gehirn, die sich bei gealterten Tieren (19-22 Monate alt) gegenüber jungen Tieren (3 Monate alt) durch verminderte ATP-Spiegel in dissoziierten Hirnzellen und teils verminderte Aktivitäten des mitochondrialen Komplexes (K)IV in respiratorischen Messungen zeigten. In der Kurzzeitstudie konnte die 3-wöchige Acy-Verabreichung über die Knopfkanüle keinen Effekt auf die altersbedingte MD erbringen. In der Langzeitstudie erhöhte die 6-monatige Acy-Anreicherung des Futters im Gehirn gealterter Tiere die mitochondriale Atmung (KI+KII) und hob die verminderten ATP-Spiegel und das MMP tendenziell an. Weiterhin wiesen die Tiere eine gesteigerte SIRT1-Genexpression auf. SIRT1 ist ein intrazellulärer Energiesensor, der die mitochondriale Biogenese erhöhen kann – ein Vorgang den Acy in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht vermittelte. In Übereinstimmung mit den geringen Effekten auf mitochondrialer Ebene führte die Fütterung mit Acy lediglich zu einer tendenziellen Verbesserung des räumlichen Gedächtnisses im *Y-Maze*-Test. Die durchgeführten Verhaltenstests brachten generell keine eindeutigen Leistungsunterschiede zwischen jungen und alten Tieren hervor, wodurch die Aussagekraft der Tests begrenzt wird. Die Aktivierung von SIRT1 durch Kalorienrestriktion oder spezielle Polyphenole wird im Zusammenhang mit einer verlängerten Lebensspanne diskutiert. In der Lebenszeitstudie konnte Acy, nach Verabreichung ab einem Alter von 6 Monaten bis zum Lebensende, die Lebenskurve der Mäuse insgesamt nicht verändern, hatte jedoch einen moderaten lebensverlängernden Effekt in einem Altersbereich, der beim Menschen einem Alter von ca. 70 Jahren entsprechen würde. Auf Grundlage der Resultate aus den Untersuchungen des Lebergewebes nach 6-monatiger Acy-Verabreichung in der Langzeitstudie, könnte dieser milde lebensverlängernde Effekt über die Hochregulierung von SIRT1 und folgenden protektiven Signalwegen einschließlich einer verbesserten antioxidativen Abwehr vermittelt worden sein. Die Verhaltenstests weisen weiterhin auf einen möglichen Einfluss von Acy auf das Angst- oder Erkundungsverhalten hin.

Das Olivenpolyphenol Hydroxytyrosol (Hy) konnte im PC12_{neo}-Modell vor MD schützen und die maximale mitochondriale Atmungskapazität erhöhen. Die 6-monatige Hy-Verabreichung über das Futter (100 mg/kg KG) hingegen hatte bei 20 Monate alten C57BL/6J-Mäusen nur geringen Einfluss auf die altersbedingte MD im Gehirn und nur eine tendenziell verbesserte

räumliche Gedächtnisleistung im Y-Maze-Test zur Folge. Dies steht im Gegensatz zu aktuellen Nagetierstudien, die neuroprotektive Effekte geringerer Hy-Dosen zeigen.

Weiterhin sollten Kombinationen aus TOP als gemeinsame Komponenten der MeDi geprüft werden. Im Zell- und Mausmodell führten die Kombinationen insgesamt verglichen mit den Einzelkomponenten zu schlechteren Ergebnissen. Nach 6-monatiger Fütterung mit 200 mg Acy und 100 mg Hy/kg KG wiesen 20 Monate alte C57BL/6J-Mäuse eine verminderte KIV-Aktivität und keine Linderung der altersbedingten MD im Gehirn auf. Weiterhin wurde der Traubenextrakt ExGrape Res (Res) mit höherem Anteil an Resveratrol und Proanthocyanidinen in Kombination mit dem natürlichen Hy-reichen Extrakt Hytolive (Ol) untersucht. Im AD-Mausmodell Thy-1-APP lag die KIV-Aktivität im Gehirn nicht allein durch die 8-wöchige Gabe einer Kombination aus 200 mg Res und 50 mg Hy (über Ol)/kg KG (RO-Intervention) vermindert vor, jedoch bei zusätzlicher Stimulierung mit *Environmental Enrichment* (ROEn-Intervention). Basierend auf den Resultaten könnte postuliert werden, dass bei den multiplen Anregungsansätzen insgesamt eine zu starke Stimulierung zu gegenteiligen Effekten geführt hat.

In Gehirnen gealterter NMRI-Mäusen konnte die 6-monatige RO-Intervention die altersbedingte verminderte Expression von Genen, die mit der mitochondrialen Funktion und Hormesis verbunden sind, im Alter von 18 Monaten gegenüber 3 Monaten verbessern. Die ROEn-Intervention zeigte zumeist eine stärkere Ausprägung der Effekte. Demgegenüber war der Einfluss von RO und ROEn auf die mitochondriale Funktion insgesamt sehr gering und es wurde keine Verbesserung der Leistung in Gedächtnistests beobachtet. Der deutlichen altersbedingten Abnahme der motorischen Leistung konnten die RO- und ROEn-Interventionen in geringem Maß entgegenwirken.

Im AD-Mausmodell Thy-1-APP konnte die erwartete MD nicht nachgewiesen werden. Eine Aussage zu einem Einfluss von TOP auf die AD über die Prävention von Alterungsprozessen hinaus kann auf Basis der hier gewonnenen Daten nicht getroffen werden.

TOP konnten insgesamt in dieser Arbeit zwar teilweise Signalwege der Hormesis anregen, jedoch keinen eindeutigen Effekt hinsichtlich einer mitochondrialen oder kognitiven Dysfunktion im Alter zeigen. Große Bedeutung bei dem geringen Einfluss von TOP auf das Gehirn könnte der Polyphenolzusammensetzung und Bioverfügbarkeit zukommen. Weitere Studien sind nötig, um die Stellung von TOP bei einer nutritiven Strategie zur Verlangsamung von Gehirnalterungsprozessen und somit Prävention von Neurodegeneration zu klären.

7 Summary

Human life expectancy is increasing globally. However, the value of this extended period of life heavily depends on one person's overall health as well as physical and mental capacities. In the brain, the aging process leads to individually distinct grades of impaired cognitive and motor function. Moreover, the aging process makes the brain more vulnerable to neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease (AD) with no existing cure on the horizon. AD accounts for a main part of dementia cases which are estimated to triple within the next 35 years. The identification of strategies to slow down brain aging and thereby prevention of neurodegenerative processes represents a promising approach to reduce the burden of dementia.

As proposed key player in brain aging and AD, mitochondrial dysfunction (MD) may be a potential target for preventive strategies. Mitochondria, referred to as the cell's powerhouse, produce energy in form of ATP by oxidative phosphorylation and supply highly energy-demanding neurons. Reactive oxygen species (ROS) which are physiologically formed during mitochondrial respiration may, if produced in excess, damage mitochondria and initiate a vicious circle of MD and further ROS formation. A strong adaptive stress response may act on this damaging circle and potentially protect against brain aging and neurodegeneration. According to the hormesis theory, the induction of mild stress through actions including physical activity or high intake of polyphenols can boost cellular defense mechanisms. The traditional Mediterranean Diet (MeDi) is especially rich in grape and olive oil polyphenols (GOP) and both, the MeDi in general and GOP, have been shown to have a high neuroprotective potential.

Based on this background, the present research project aimed to study the effects of GOP on mitochondrial and cognitive dysfunction in brain aging and AD using cellular and animal models. The study should further prove the potential of GOP to reduce MD in the brain by hormetic mechanisms thereby protecting against functional loss and neurodegeneration. As sources for GOP two polyphenol-rich grape extracts, the olive oil polyphenol hydroxytyrosol (Hy) and the Hy-rich olive mill water waste extract Hytolive (Ol) as well as their combinations were used. Mitochondrial dysfunction was assessed by determining ATP-levels and mitochondrial membrane potential (MMP) as well as by respiratory measurements. In addition, gene expression analysis and behavioral testing were conducted in animal studies.

The first part of the project focused on ExGrape Acy (Acy), a polyphenol-rich grape extract with high proportions of anthocyanins and proanthocyanins. In the neuronal-like cell line PC12, Acy showed initial protecting potential regarding MD by reducing impairments of MMP and

ATP level which were externally induced by the NO-donor sodium nitroprusside (SNP). Moreover, the effect of Acy (200 mg/kg body weight) on C57BL/6J mice was assessed in three feeding studies (short-term, long-term, life-long). The focus of the conducted studies laid on the effect of Acy on age-related MD at the age of 19-22 months compared to 3 months, which was demonstrated by decreased ATP levels in dissociated brain cells and partly impaired activity of brain mitochondrial complex (C)IV in respirometry measurements. In a short-term study, 3-week feeding by oral gavage had no impact on age-related MD. However, in a long-term study, 6-month feeding of a diet enriched with Acy increased mitochondrial respiration (CI+CII) and tended to ameliorate the MMP and ATP levels. Besides, Acy-fed mice showed higher gene expression levels of SIRT1, an intracellular energy sensor which can induce increased mitochondrial biogenesis. In the present study though, Acy-fed mice did not show elevated biogenesis of brain mitochondria. In line with the minor effects on mitochondria, Acy only tended to result in improved performance of aged mice in spatial memory testing. As the cognitive testing in general did not prove to clearly indicate age-related impairment, the significance of the testing is, however, limited. A great deal of research proposes SIRT1 activation, by calorie restriction or polyphenols, to be related to lifespan extension. In the present study, life-long feeding of mice with Acy beginning at the age of 6 months did not lead to a significant right shift of the overall survival curve but mediated a moderate effect on survival at a stage of age comparable to approximately 70 years in humans. Based on the findings from gene expression analysis in brain and liver tissue of mice after 6-months feeding (long-term study), the mild life-extending effect of Acy in the life-long study may involve upregulation of SIRT1 and associated protective pathways including antioxidant defense mechanisms. Behavioral testing further suggested a possible impact on anxiety or exploratory behavior.

In further studies, the olive polyphenol Hy protected PC12 cells against SNP-induced MD and increased their maximal mitochondrial respiratory capacity. In a long-term study with C57BL/6J mice, however, 6-month feeding (100 mg/kg body weight) had only very little impact on age-related MD in the brain of 20 months old animals and only tended to result in an increase of spatial memory. The minor effects of Hy found in the present *in vivo* study stand in contrast to recent animal studies showing neuroprotective potential of lower doses of Hy.

TOP combinations, as concerted components of the MeDi, were further tested in cellular and animal models, and, in total, demonstrated less neuroprotective potential than the single components. After 6-month feeding with 200 mg Acy and 100 mg Hy/kg body weight, 20-month-old C57BL/6J mice had decreased mitochondrial CIV-activity and showed no improvement of

age-related MD in their brains. Further studies concentrated on ExGrape Res (Res), a grape extract with higher proportion of resveratrol and proanthocyanidins, in combination with the Hy-rich extract Ol. In the AD mouse model Thy-1-APP there was no decrease in mitochondrial CIV-activity after exclusively feeding 200 mg Res and 50 mg Hy (provided through Ol)/kg body weight (RO intervention), but in addition to stimulation by environmental enrichment (ROEn intervention). Therefore, contrary effects as consequence of very high stimulation could be speculated.

In 18-month-old NMRI mice, the 6-month RO intervention, and mostly to a higher extent the ROEn intervention, ameliorated the age-related decrease in expression of genes associated with mitochondrial function and hormesis as compared to 3-month-old mice. In contrast, there was only very little effect on mitochondrial function and no improvement in memory testing. Motor function was considerably impaired at 18 months of age and showed minor improvement in RO and ROEn intervention groups.

The AD model Thy-1-APP did not show the expected MD in mouse brain. Therefore, based on the data achieved in the present project, conclusions regarding the effect of GOP on AD which go beyond the prevention of the process of aging could not be drawn.

In conclusion, the present research project revealed GOP to partly induce signaling pathways related to hormesis in aged mice without showing a major impact on age-related mitochondrial and cognitive dysfunction. Polyphenol composition and bioavailability may be crucial factors regarding the minor effects demonstrated in the present work. Further studies are needed to clarify the role of GOP with regard to nutritional strategies for slowing down brain aging and thus prevention of neurodegeneration.

8 Literaturverzeichnis

- Abd El Mohsen MM, Kuhnle G, Rechner AR, Schroeter H, Rose S, Jenner P, Rice-Evans CA (2002) Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radical Biology & Medicine* 33(12):1693–1702
- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282(5739):615–616
- Afshordel S, Hagl S, Werner D, Rohner N, Kogel D, Bazan NG, Eckert GP (2015) Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve mitochondrial dysfunction in brain aging - Impact of Bcl-2 and NPD-1 like metabolites. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 92C:23–31
- Alexander GE, Ryan L, Bowers D, Foster TC, Bizon JL, Geldmacher DS, Glisky EL (2012) Characterizing cognitive aging in humans with links to animal models. *Frontiers in Aging Neuroscience* 4:21
- Allam F, Dao AT, Chugh G, Bohat R, Jafri F, Patki G, Mowrey C, Asghar M, Alkadhi KA, Salim S (2013) Grape powder supplementation prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior, memory impairment, and high blood pressure in rats. *The Journal of Nutrition* 143(6):835–842
- Allouche N, Fki I, Sayadi S (2004) Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(2):267–273
- Alzheimer A (1906) Über einen eigenartigen schweren Krankheitsprozess der Hirnrinde. *Zentralblatt für Nervenkrankheiten*(25):1134
- Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clinical Anatomy* (New York, N 8(6):429–431
- Alzheimer Europe (2013) Prevalence of dementia in Europe. <http://www.alzheimer-europe.org/Policy-in-Practice2/Country-comparisons/2013-The-prevalence-of-dementia-in-Europe>. Zuletzt geprüft am 23.01.2017
- Alzheimer's Association (2016) Alzheimer's Disease Facts and Figures: Alzheimer's & Dementia. http://www.alz.org/documents_custom/2016-facts-and-figures.pdf. Zuletzt geprüft am 23.01.2017

- Alzheimer's Disease International (2015) World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia. <http://www.worldalzreport2015.org/downloads/world-alzheimer-report-2015.pdf>. Zuletzt geprüft am 23.01.2017
- Andrews ZB, Diano S, Horvath TL (2005) Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. *Nature Reviews. Neuroscience* 6(11):829–840
- Appeldoorn MM, Vincken JP, Am Aura, Hollman PC, Gruppen H (2009) Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone as the major metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(3):1084–1092
- Aragones G, Suarez M, Ardid-Ruiz A, Vinaixa M, Rodriguez MA, Correig X, Arola L, Blade C (2016) Dietary proanthocyanidins boost hepatic NAD(+) metabolism and SIRT1 expression and activity in a dose-dependent manner in healthy rats. *Scientific Reports* 6:24977
- Archibald JM (2015) Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Current Biology* 25(19):R911-21
- Arola-Arnal A, Oms-Oliu G, Crescenti A, del Bas JM, Ras MR, Arola L, Caimari A (2013) Distribution of grape seed flavanols and their metabolites in pregnant rats and their fetuses. *Molecular Nutrition & Food Research* 57(10):1741–1752
- Arshad Q, Seemungal BM (2016) Age-Related Vestibular Loss: Current Understanding and Future Research Directions. *Frontiers in Neurology* 7:231
- Arunsundar M, Shanmugarajan TS, Ravichandran V (2015) 3,4-dihydroxyphenylethanol attenuates spatio-cognitive deficits in an Alzheimer's disease mouse model: Modulation of the molecular signals in neuronal survival-apoptotic programs. *Neurotoxicity Research* 27(2):143–155
- Asha Devi S, Sagar Chandrasekar BK, Manjula KR, Ishii N (2011) Grape seed proanthocyanidin lowers brain oxidative stress in adult and middle-aged rats. *Experimental Gerontology* 46(11):958–964
- Asseburg H, Hagl S, Eckert GP (2014) Nutritional approaches for healthy aging of the brain and the prevention of neurodegenerative diseases. *Pharma Nutrition - An Overview*, Springer, Stuttgart
- Asseburg H, Schafer C, Muller M, Hagl S, Pohland M, Berressem D, Borchiellini M, Plank C, Eckert GP (2016) Effects of Grape Skin Extract on Age-Related Mitochondrial Dysfunction, Memory and Life Span in C57BL/6J Mice. *Neuromolecular Medicine* 18(3):378–395
- Auñon-Calles D, Canut L, Visioli F (2013) Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology* 55:498–504

- Aura A-M (2012) Colon-Derived Microbial Metabolites of Dietary Phenolic Compounds. In: Spencer JPE (ed) *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function*, vol 20121374. CRC Press, Hoboken
- Aura A-M, Martin-Lopez P, O'Leary KA, Williamson G, Oksman-Caldentey K-M, Poutanen K, Santos-Buelga C (2005) In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European Journal of Nutrition* 44(3):133–142
- Azorin-Ortuno M, Yanez-Gascon MJ, Vallejo F, Pallares FJ, Larrosa M, Lucas R, Morales JC, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT, Espin JC (2011) Metabolites and tissue distribution of resveratrol in the pig. *Molecular Nutrition & Food Research* 55(8):1154–1168
- Baldelli S, Aquilano K, Ciriolo MR (2013) Punctum on two different transcription factors regulated by PGC-1 α : nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 and nuclear respiratory factor 2. *Biochimica et Biophysica acta* 1830(8):4137–4146
- Bao L, Cai X, Dai X, Ding Y, Jiang Y, Li Y, Zhang Z, Li Y (2014) Grape seed proanthocyanidin extracts ameliorate podocyte injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α in low-dose streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. *Food & Function* 5(8):1872
- Bao L, Cai X, Zhang Z, Li Y (2015) Grape seed procyanidin B2 ameliorates mitochondrial dysfunction and inhibits apoptosis via the AMP-activated protein kinase-silent mating type information regulation 2 homologue 1-PPAR γ co-activator-1 α axis in rat mesangial cells under high-dose glucosamine. *The British Journal of Nutrition* 113(1):35–44
- Barberger-Gateau P, Raffaitin C, Letenneur L, Berr C, Tzourio C, Dartigues JF, Alperovitch A (2007) Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study. *Neurology* 69(20):1921–1930
- Bensalem J, Servant L, Alfos S, Gaudout D, Laye S, Pallet V, Lafenetre P (2016) Dietary Polyphenol Supplementation Prevents Alterations of Spatial Navigation in Middle-Aged Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 10:9
- Berg JM, Held A, Stryer L, Lange C, Mahlke K, Maxam G, Seidler L, Zellerhoff N, Häcker B, Jarosch B (2015) *Stryer Biochemie*. Springer Berlin Heidelberg
- Bernard JA, Seidler RD (2014) Moving forward: age effects on the cerebellum underlie cognitive and motor declines. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 42:193–207
- Berti V, Murray J, Davies M, Spector N, Tsui WH, Li Y, Williams S, Pirraglia E, Vallabhajosula S, McHugh P, Pupi A, Leon MJ de, Mosconi L (2015) Nutrient patterns and brain biomarkers of Alzheimer's disease in cognitively normal individuals. *The Journal of Nutrition, Health & Aging* 19(4):413–423

- Bickford PC, Shukitt-Hale B, Joseph J (1999) Effects of aging on cerebellar noradrenergic function and motor learning: Nutritional interventions. *Mechanisms of Ageing and Development* 111(2-3):141–154
- Bigagli E, Cinci L, Paccosi S, Parenti A, D'Ambrosio M, Luceri C (2017) Nutritionally relevant concentrations of resveratrol and hydroxytyrosol mitigate oxidative burst of human granulocytes and monocytes and the production of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *International Immunopharmacology* 43:147–155
- Birbaumer N, Schmidt RF (2011a) Kognitive Funktionen und Denken. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (eds) *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*, 31., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Birbaumer N, Schmidt RF (2011b) Lernen und Gedächtnis. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (eds) *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*, 31., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Bizon JLP, Foster TC, Alexander GE, Glisky EL (2012) Characterizing cognitive aging of working memory and executive function in animal models. *Frontiers in Aging Neuroscience* 4:19
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L (2003) Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Experimental Neurology* 184(1):247–263
- Blanchard J, Martel G, Guillou J-L, Nogues X, Micheau J (2008) Impairment of spatial memory consolidation in APP(751SL) mice results in cue-guided response. *Neurobiology of Aging* 29(7):1011–1021
- Blanchard J, Decorte L, Nogues X, Micheau J (2009) Characterization of cognition alteration across the course of the disease in APP751SL mice with parallel estimation of cerebral Abeta deposition. *Behavioural Brain Research* 201(1):147–157
- Blanchard J, Martel G, Brayda-Bruno L, Noguès X, Micheau J (2011) Detection of age-dependent working memory deterioration in APP751SL mice. *Behavioural Brain Research* 218(1):129–137
- Bohn T (2014) Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews* 72(7):429–452
- Bonkowski MS, Sinclair DA (2016) Slowing ageing by design: the rise of NAD⁺ and sirtuin-activating compounds. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17(11):679–690

- Boocock DJ, Faust GES, Patel KR, Schinas AM, Brown VA, Ducharme MP, Booth TD, Crowell JA, Perloff M, Gescher AJ, Steward WP, Brenner DE (2007) Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 16(6):1246–1252
- Boto-Ordonez M, Urpi-Sarda M, Queipo-Ortuno MI, Corella D, Tinahones FJ, Estruch R, Andres-Lacueva C (2013) Microbial metabolomic fingerprinting in urine after regular dealcoholized red wine consumption in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(38):9166–9175
- Boto-Ordonez M, Rothwell JA, Andres-Lacueva C, Manach C, Scalbert A, Urpi-Sarda M (2014) Prediction of the wine polyphenol metabolic space: an application of the Phenol-Explorer database. *Molecular Nutrition & Food Research* 58(3):466–477
- Boveris A, Navarro A (2008) Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life* 60(5):308–314
- Bratic A, Larsson N-G (2013) The role of mitochondria in aging. *The Journal of Clinical Investigation* 123(3):951–957
- Brenmoehl J, Hoeflich A (2013) Dual control of mitochondrial biogenesis by sirtuin 1 and sirtuin 3. *Mitochondrion* 13(6):755–761
- Brown GC (1999) Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1411(2-3):351–369
- Burke SN, Ryan L, Barnes CA (2012) Characterizing cognitive aging of recognition memory and related processes in animal models and in humans. *Frontiers in Aging Neuroscience* 4:15
- Cai X, Bao L, Ren J, Li Y, Zhang Z (2016) Grape seed procyanidin B2 protects podocytes from high glucose-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis via the AMPK-SIRT1-PGC-1 α axis in vitro. *Food & Function* 7(2):805–815
- Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, et al. (2007) Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology* 222(1):122–128
- Canter RG, Penney J, Tsai L-H (2016) The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. *Nature* 539(7628):187–196
- Cao K, Xu J, Zou X, Li Y, Chen C, Zheng A, Li H, Li H, Szeto IM-Y, Shi Y, Long J, Liu J, Feng Z (2014) Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radical Biology & Medicine* 67:396–407

- Caracciolo B, Xu W, Collins S, Fratiglioni L (2014) Cognitive decline, dietary factors and gut-brain interactions. *Mechanisms of Ageing and Development* 136-137:59–69
- Cardozo MG, Medeiros N, Lacerda DdS, Almeida DCd, Henriques JAP, Dani C, Funchal C (2013) Effect of Chronic Treatment with Conventional and Organic Purple Grape Juices (*Vitis labrusca*) on Rats Fed with High-Fat Diet. *Cellular and Molecular Neurobiology* 33(8):1123–1133
- Carey AN, Gomes SM, Shukitt-Hale B (2014) Blueberry supplementation improves memory in middle-aged mice fed a high-fat diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(18):3972–3978
- Carey AN, Miller MG, Fisher DR, Bielinski DF, Gilman CK, Poulouse SM, Shukitt-Hale B (2017) Dietary supplementation with the polyphenol-rich acai pulps (*Euterpe oleracea* Mart. and *Euterpe precatoria* Mart.) improves cognition in aged rats and attenuates inflammatory signaling in BV-2 microglial cells. *Nutritional Neuroscience* 20(4):238–245
- Caruana M, Cauchi R, Vassallo N (2016) Putative Role of Red Wine Polyphenols against Brain Pathology in Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Frontiers in nutrition* 3:31
- Casadesus G, Shukitt-Hale B, Stellwagen HM, Zhu X, Lee H-g, Smith MA, Joseph JA (2004) Modulation of hippocampal plasticity and cognitive behavior by short-term blueberry supplementation in aged rats. *Nutritional Neuroscience* 7(5-6):309–316
- Casamenti F, Grossi C, Rigacci S, Pantano D, Luccarini I, Stefani M (2015) Oleuropein Aglycone: A Possible Drug against Degenerative Conditions. In Vivo Evidence of its Effectiveness against Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 45(3):679–688
- Cases J, Romain C, Dallas C, Gerbi A, Cloarec M (2015) Regular consumption of Fiit-ns, a polyphenol extract from fruit and vegetables frequently consumed within the Mediterranean diet, improves metabolic ageing of obese volunteers: a randomized, double-blind, parallel trial. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 66(1):120–125
- Cavallo M, Hunter EM, van der Hiele K, Angilletta C (2016) Computerized Structured Cognitive Training in Patients Affected by Early-Stage Alzheimer's Disease is Feasible and Effective: A Randomized Controlled Study. *Archives of Clinical Neuropsychology* 31(8):868–876
- Charradi K, Mahmoudi M, Bedhiafi T, Kadri S, Elkahoui S, Limam F, Aouani E (2017) Dietary supplementation of grape seed and skin flour mitigates brain oxidative damage induced by a high-fat diet in rat: Gender dependency. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 87:519–526

- Chen Y, Mao Y, Zhou D, Hu X, Wang J, Ma Y (2010) Environmental enrichment and chronic restraint stress in ICR mice: effects on prepulse inhibition of startle and Y-maze spatial recognition memory. *Behavioural Brain Research* 212(1):49–55
- Chen W, Muller D, Richling E, Wink M (2013) Anthocyanin-rich purple wheat prolongs the life span of *Caenorhabditis elegans* probably by activating the DAF-16/FOXO transcription factor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(12):3047–3053
- Chen T-Y, Kritchevsky J, Hargett K, Feller K, Klobusnik R, Song BJ, Cooper B, Jouni Z, Ferruzzi MG, Janle EM (2015) Plasma bioavailability and regional brain distribution of polyphenols from apple/grape seed and bilberry extracts in a young swine model. *Molecular Nutrition & Food Research* 59(12):2432–2447
- Cheng X-r, Zhou W-x, Zhang Y-x (2014) The behavioral, pathological and therapeutic features of the senescence-accelerated mouse prone 8 strain as an Alzheimer's disease animal model. *Ageing Research Reviews* 13:13–37
- Chou L-M, Lin C-I, Chen Y-H, Liao H, Lin S-H (2016) A diet containing grape powder ameliorates the cognitive decline in aged rats with a long-term high-fructose-high-fat dietary pattern. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 34:52–60
- Chu C-H, Chen A-G, Hung T-M, Wang C-C, Chang Y-K (2015) Exercise and fitness modulate cognitive function in older adults. *Psychology and Aging* 30(4):842–848
- Chung S, Yao H, Caito S, Hwang J-W, Arunachalam G, Rahman I (2010) Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501(1):79–90
- Ciriminna R, Meneguzzo F, Fidalgo A, Ilharco LM, Pagliaro M (2016) Extraction, benefits and valorization of olive polyphenols. *European Journal of Lipid Science and Technology* 118(4):503–511
- Clark J, Simon DK (2009) Transcribe to survive: transcriptional control of antioxidant defense programs for neuroprotection in Parkinson's disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 11(3):509–528
- Clifford M, Rio D (2012) Bioavailability of Dietary Monomeric and Polymeric Flavan-3-ols. In: Spencer JPE (ed) *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function*. CRC Press, Hoboken
- Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P, Dartigues JF (2000) Intake of flavonoids and risk of dementia. *European Journal of Epidemiology* 16(4):357–363

- Corder R, Crozier A, Koon PA (2003) Drinking your health? It's too early to say. *Nature* 426(6963):119
- Corona G, Tzounis X, Assunta Dessi M, Deiana M, Debnam ES, Visioli F, Spencer JPE (2006) The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: Implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radical Research* 40(6):647–658
- Corona G, Spencer JPE, Dessi MA (2009) Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicology and Industrial Health* 25(4-5):285–293
- Corona G, Vauzour D, Amini A, Spencer JP (2014) The Impact of Gastrointestinal Modifications, Blood-Brain Barrier Transport, and Intracellular Metabolism on Polyphenol Bioavailability. In: Watson RR, Preedy VR, Zibadi S (eds) *Polyphenols in human health and disease*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp 591–604
- Cottart C, Nivet-Antoine V, Laguillier-Morizot C, Beaudeux J (2010) Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 54(1):7–16
- Crespo MC, Tome-Carneiro J, Burgos-Ramos E, Loria Kohen V, Espinosa MI, Herranz J, Visioli F (2015) One-week administration of hydroxytyrosol to humans does not activate Phase II enzymes. *Pharmacological Research* 95-96:132–137
- Croft KD (2016) Dietary polyphenols: Antioxidants or not? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 595:120–124
- Crusio WE, Sluyter F, Gerlai RT, Pietropaolo S (2013) Behavioral genetics of the mouse: Vol. 1: Genetics of behavioral phenotypes. *Behavioral genetics of the mouse*
- da Luz PL, Tanaka L, Brum PC, Dourado PMM, Favarato D, Krieger JE, Laurindo FRM (2012) Red wine and equivalent oral pharmacological doses of resveratrol delay vascular aging but do not extend life span in rats. *Atherosclerosis* 224(1):136–142
- Dai Q, Borenstein AR, Wu Y, Jackson JC, Larson EB (2006) Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. *The American Journal of Medicine* 119(9):751–759
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329(1-2):23–38
- D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, Pontoni G, Galletti P, Zappia V (2001) Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabolism & Disposition* 29(11):1492–1498
- Davis C, Bryan J, Hodgson J, Murphy K (2015) Definition of the Mediterranean Diet; a Literature Review. *Nutrients* 7(11):9139–9153

- Day AJ, Cañada F, Díaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G (2000) Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters* 468
- Deacon R (2012) Assessing Burrowing, Nest Construction, and Hoarding in Mice. *JoVE* 59:e2607
- Deacon RMJ, Koros E, Bornemann KD, Rawlins JNP (2009) Aged Tg2576 mice are impaired on social memory and open field habituation tests. *Behavioural Brain Research* 197(2):466–468
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* 18(14):1818–1892
- Demetrius LA, Driver JA (2015) Preventing Alzheimer's disease by means of natural selection. *Journal of the Royal Society, Interface* 12(102):20140919
- Demetrius LA, Simon DK (2012) An inverse-Warburg effect and the origin of Alzheimer's disease. *Biogerontology* 13(6):583–594
- Demetrius LA, Magistretti PJ, Pellerin L (2014) Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis and the Inverse Warburg effect. *Frontiers in Physiology* 5:522
- Denzer I, Munch G, Friedland K (2016) Modulation of mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases via activation of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 by food-derived compounds. *Pharmacological Research* 103:80–94
- Desquiret-Dumas V, Gueguen N, Leman G, Baron S, Nivet-Antoine V, Chupin S, et al. (2013) Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells. *The Journal of Biological Chemistry* 288(51):36662–36675
- Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. (2016) Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/infoblatt1_haeufigkeit_demenzerkrankungen_dalzg.pdf. Zuletzt geprüft am 23.01.2017
- Deuschl G, Maier W, et al. (2016) S3-Leitlinie Demenzen: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie
- Diamanti J, Mezzetti B, Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Quiles JL, Gonzalez-Alonso A, Ramirez-Tortosa MdC, Granados-Principal S, Gonzales-Paramas AM, Santos-Buelga C, Battino M (2014) Doxorubicin-induced oxidative stress in rats is efficiently counteracted by dietary anthocyanin differently enriched strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(18):3935–3943

- Dias GP, Cocks G, do Nascimento Bevilaqua MC, Nardi AE, Thuret S (2016) Resveratrol: A Potential Hippocampal Plasticity Enhancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016:9651236
- Dinkova-Kostova AT, Abramov AY (2015) The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radical Biology & Medicine* 88(Pt B):179–188
- Divakaruni AS, Brand MD (2011) The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak. *Physiology* 26(3):192–205
- Draganski B, Lutti A, Kherif F (2013) Impact of brain aging and neurodegeneration on cognition: evidence from MRI. *Current Opinion in Neurology* 26(6):640–645
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, et al. (2014) Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: The IWG-2 criteria. *The Lancet Neurology* 13(6):614–629
- Duffy KB, Spangler EL, Devan BD, Guo Z, Bowker JL, Janas AM, Hagepanos A, Minor RK, DeCabo R, Mouton PR, Shukitt-Hale B, Joseph JA, Ingram DK (2008) A blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats. *Neurobiology of Aging* 29(11):1680–1689
- Eaton MJ, Duplan H (2004) Useful cell lines derived from the adrenal medulla. *Molecular and Cellular Endocrinology* 228(1-2):39–52
- Eckert A, Steiner B, Marques C, Leutz S, Romig H, Haass C, Müller WE (2001) Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation. *Journal of Neuroscience Research* 64(2):183–192
- Eckert A, Keil U, Scherping I, Hauptmann S, Müller WE (2005) Stabilization of Mitochondrial Membrane Potential and Improvement of Neuronal Energy Metabolism by Ginkgo Biloba Extract EGb 761. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1056(1):474–485
- Eckert A, Hauptmann S, Scherping I, Rhein V, Müller-Spahn F, Gotz J, Müller WE (2008) Soluble beta-amyloid leads to mitochondrial defects in amyloid precursor protein and tau transgenic mice. *Neuro-Degenerative Diseases* 5(3-4):157–159
- Eckert G, Franke C, Nöldner M, Rau O, Wurglics M, Schubert-Zsilavecz M (2010) Plant derived omega-3-fatty acids protect mitochondrial function in the brain. *European Journal of Pharmacology* 61(3):234–241
- Eckert G, Lipka U, Müller WE (2012a) Omega-3 fatty acids, mitochondria and neurodegenerative diseases. *Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids* 88(1):105–114

- Eckert SH, Eckmann J, Renner-Sattler K, Eckert GP, Leuner K, Mueller WE (2012b) Dimebon Ameliorates Amyloid-beta Induced Impairments of Mitochondrial Form and Function. *Journal of Alzheimer's disease* 31(1):21–32
- Eckert GP, Renner K, Eckert SH, Eckmann J, Hagl S, Abdel-Kader RM, Kurz C, Leuner K, Muller WE (2012c) Mitochondrial dysfunction-a pharmacological target in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology* 46(1):136–150
- Eckmann J, Eckert SH, Leuner K, Muller WE, Eckert GP (2013) Mitochondria: mitochondrial membranes in brain ageing and neurodegeneration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45(1):76–80
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2011) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external agents” (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 9(4):2033
- El Mohsen MA, Marks J, Kuhnle G, Moore K, Debnam E, Srail SK, Rice-Evans C, Spencer JPE (2006a) Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats. *British Journal of Nutrition* 95(01):51
- El-Mohsen MA, Bayele H, Kuhnle G, Gibson G, Debnam E, Srail SK, Rice-Evans C, Spencer JPE (2006b) Distribution of [H]trans-resveratrol in rat tissues following oral administration. *British Journal of Nutrition* 96(01):62
- Faria A, Pestana D, Teixeira D, Azevedo J, Freitas V de, Mateus N, Calhau C (2010) Flavonoid transport across RBE4 cells: A blood-brain barrier model. *Cellular & Molecular Biology Letters* 15(2):234–241
- Faria A, Pestana D, Teixeira D, Couraud P-O, Romero I, Weksler B, Freitas V de, Mateus N, Calhau C (2011) Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier. *Food & Function* 2(1):39–44
- Faria A, Mateus N, Calhau C (2012) Flavonoid transport across blood-brain barrier: Implication for their direct neuroprotective actions. *Nutrition and Aging* 1(2):89–97

- Faria A, Meireles M, Fernandes I, Santos-Buelga C, Gonzalez-Manzano S, Duenas M, Freitas V de, Mateus N, Calhau C (2014) Flavonoid metabolites transport across a human BBB model. *Food Chemistry* 149:190–196
- Farr SA, Price TO, Dominguez LJ, Motisi A, Saiano F, Niehoff ML, Morley JE, Banks WA, Ercal N, Barbagallo M (2012) Extra virgin olive oil improves learning and memory in SAMP8 mice. *Journal of Alzheimer's disease* 28(1):81–92
- Fenesi B, Fang H, Kovacevic A, Oremus M, Raina P, Heisz JJ (2017) Physical Exercise Moderates the Relationship of Apolipoprotein E (APOE) Genotype and Dementia Risk: A Population-Based Study. *Journal of Alzheimer's disease* 56(1):297–303
- Fernández-Bolaños J, Rodríguez G, Rodríguez R, Heredia A, Guillén R, Jiménez A (2002) Production in Large Quantities of Highly Purified Hydroxytyrosol from Liquid–Solid Waste of Two-Phase Olive Oil Processing or “Alperujo”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(23):6804–6811
- Ferruzzi MG, Lobo JK, Janle EM, Cooper B, Simon JE, Wu Q-L, Welch C, Ho L, Weaver C, Pasinetti GM (2009) Bioavailability of gallic acid and catechins from grape seed polyphenol extract is improved by repeated dosing in rats: implications for treatment in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* 18(1):113–124
- Fester L, Rune GM (2015) Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus. *Brain Research* 1621:162–169
- Fisher-Wellman KH, Lin C-T, Ryan TE, Reese LR, Gilliam LAA, Cathey BL, Lark DS, Smith CD, Muoio DM, Neuffer PD (2015) Pyruvate dehydrogenase complex and nicotinamide nucleotide transhydrogenase constitute an energy-consuming redox circuit. *The Biochemical journal* 467(2):271–280
- Fleschhut J, Kratzer F, Rechkemmer G, Kulling SE (2006) Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition* 45(1):7–18
- Fornasaro S, Ziberna L, Gasperotti M, Tramer F, Vrhovsek U, Mattivi F, Passamonti S (2016) Determination of cyanidin 3-glucoside in rat brain, liver and kidneys by UPLC/MS-MS and its application to a short-term pharmacokinetic study. *Scientific Reports* 6:22815
- Foster TC (2007) Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell* 6(3):319–325
- Foster TC, Defazio RA, Bizon JL (2012) Characterizing cognitive aging of spatial and contextual memory in animal models. *Frontiers in Aging Neuroscience* 4:12

- Foster TC, Kyritsopoulos C, Kumar A (2017) Central role for NMDA receptors in redox mediated impairment of synaptic function during aging and Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research* 322(Pt B):223–232
- Freeman HC, Hugill A, Dear NT, Ashcroft FM, Cox RD (2006) Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: A new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes* 55(7):2153–2156
- Frick KM, Fernandez SM (2003) Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiology of Aging* 24(4):615–626
- Friedman JR, Nunnari J (2014) Mitochondrial form and function. *Nature* 505(7483):335–343
- Gallardo E, Palma-Valdes R, Espartero JL, Santiago M (2014) In vivo striatal measurement of hydroxytyrosol, and its metabolite (homovanillic alcohol), compared with its derivative nitrohydroxytyrosol. *Neuroscience Letters* 579:173–176
- Gasperotti M, Passamonti S, Tramer F, Masuero D, Guella G, Mattivi F, Vrhovsek U (2015) Fate of microbial metabolites of dietary polyphenols in rats: is the brain their target destination? *ACS Chemical Neuroscience* 6(8):1341–1352
- Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT (2000) Intestinal Transport of Quercetin Glycosides in Rats Involves Both Deglycosylation and Interaction with the Hexose Transport Pathway. *The Journal of Nutrition* 130(11):2765–2771
- Gerber M (2016) Implementing the Mediterranean Diet: A French Perspective and Comparisons with Other Mediterranean Countries. In: Romagnolo DF, Selmin OI (eds) *Mediterranean diet: Dietary guidelines and impact on health and disease*. Humana Press, Cham, pp 57–67
- Ghanim H, Sia CL, Korzeniewski K, Lohano T, Abuaysheh S, Marumganti A, Chaudhuri A, Dandona P (2011) A Resveratrol and Polyphenol Preparation Suppresses Oxidative and Inflammatory Stress Response to a High-Fat, High-Carbohydrate Meal. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96(5):1409–1414
- Giachin G, Bouverot R, Acajjaoui S, Pantalone S, Soler-Lopez M (2016) Dynamics of Human Mitochondrial Complex I Assembly: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences* 3:43
- Giblin W, Skinner ME, Lombard DB (2014) Sirtuins: guardians of mammalian healthspan. *Trends in Genetics* 30(7):271–286

- Gill SJ, Friedenreich CM, Sajobi TT, Longman RS, Drogos LL, Davenport MH, Tyndall AV, Eskes GA, Hogan DB, Hill MD, Parboosingh JS, Wilson BJ, Poulin MJ (2015) Association between Lifetime Physical Activity and Cognitive Functioning in Middle-Aged and Older Community Dwelling Adults: Results from the Brain in Motion Study. *Journal of the International Neuropsychological Society* 21(10):816–830
- Giordano E, Dangles O, Rakotomanomana N, Baracchini S, Visioli F (2015) 3-O-Hydroxytyrosol glucuronide and 4-O-hydroxytyrosol glucuronide reduce endoplasmic reticulum stress in vitro. *Food & Function* 6(10):3275–3281
- Giovannini L, Bianchi S (2017) Role of nutraceutical SIRT1 modulators in AMPK and mTOR pathway: Evidence of a synergistic effect. *Nutrition* 34:82–96
- Glisky E (2007) Changes in Cognitive Function in Human Aging. In: Riddle DR (ed) *Brain aging: Models, methods, and mechanisms*. CRC Press, Boca Raton, Fla. u.a, pp 3–20
- Gnaiger E (2001) Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respiration Physiology* 128(3):277–297
- Goldstein DS, Sullivan P, Cooney A, Jinsmaa Y, Kopin IJ, Sharabi Y (2015) Rotenone decreases intracellular aldehyde dehydrogenase activity: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 133(1):14–25
- Goldstein DS, Jinsmaa Y, Sullivan P, Holmes C, Kopin IJ, Sharabi Y (2016) 3,4-Dihydroxyphenylethanol (Hydroxytyrosol) Mitigates the Increase in Spontaneous Oxidation of Dopamine During Monoamine Oxidase Inhibition in PC12 Cells. *Neurochemical Research* 41(9):2173–2178
- Gonzalez-Santiago M, Fonolla J, Lopez-Huertas E (2010) Human absorption of a supplement containing purified hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, and evidence for its transient association with low-density lipoproteins. *Pharmacological Research* 61(4):364–370
- Goyarzu P, Malin DH, Lau FC, Taglialatela G, Moon WD, Jennings R, Moy E, Moy D, Lippold S, Shukitt-Hale B, Joseph JA (2004) Blueberry supplemented diet: effects on object recognition memory and nuclear factor-kappa B levels in aged rats. *Nutritional Neuroscience* 7(2):75–83
- Grimm A, Friedland K, Eckert A (2016) Mitochondrial dysfunction: The missing link between aging and sporadic Alzheimer's disease. *Biogerontology* 17(2):281–296
- Grossi C, Rigacci S, Ambrosini S, Ed Dami T, Luccarini I, Traini C, Failli P, Berti A, Casamenti F, Stefani M (2013) The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A β plaque pathology. *PLoS One* 8(8):e71702

- Guan S, Jiang B, Bao YM, An LJ (2006) Protocatechuic acid suppresses MPP⁺-induced mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology* 44(10):1659–1666
- Guilford JM, Pezzuto JM (2011) Wine and Health: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture* 62(4):471–486
- Gusdon AM, Callio J, DiStefano G, O'Doherty RM, Goodpaster BH, Coen PM, Chu CT (2017) Exercise increases mitochondrial complex I activity and DRP1 expression in the brains of aged mice. *Experimental Gerontology* 90:1–13
- Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MRC, Rodrigues MV, Schmatz R, Pimentel VC, Vieira JM, Rosa MM, Marisco P, Ribeiro DA, Leal C, Rubin MA, Mazzanti CM, Spanevello R (2012) Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. *Life Sciences* 91(23-24):1221–1228
- Hagl S, Heinrich M, Kocher A, Schiborr C, Frank J, Eckert GP (2014) Curcumin micelles improve mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* 1(2):80–83
- Hagl S (2014) Stabilized Rice Bran and Curcumin for the Prevention of age-related Neurodegeneration. Dissertation, Goethe-Universität
- Hagl S, Berressem D, Bruns B, Sus N, Frank J, Eckert GP (2015a) Beneficial Effects of Ethanolic and Hexanic Rice Bran Extract on Mitochondrial Function in PC12 Cells and the Search for Bioactive Components. *Molecules* 20(9):16524–16539
- Hagl S, Kocher A, Schiborr C, Kolesova N, Frank J, Eckert GP (2015b) Curcumin micelles improve mitochondrial function in neuronal PC12 cells and brains of NMRI mice - Impact on bioavailability. *Neurochemistry International* 89:234–242
- Hagl S, Grewal R, Ciobanu I, Helal A, Khayyal MT, Muller WE, Eckert GP (2015c) Rice bran extract compensates mitochondrial dysfunction in a cellular model of early Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 43(3):927–938
- Hagl S, Asseburg H, Heinrich M, Sus N, Blumrich E-M, Dringen R, Frank J, Eckert GP (2016a) Effects of Long-Term Rice Bran Extract Supplementation on Survival, Cognition and Brain Mitochondrial Function in Aged NMRI Mice. *Neuromolecular Medicine* 18(3):347–363
- Hagl S, Berressem D, Grewal R, Sus N, Frank J, Eckert GP (2016b) Rice bran extract improves mitochondrial dysfunction in brains of aged NMRI mice. *Nutritional Neuroscience* 19(1):1–10

- Hardman RJ, Kennedy G, Macpherson H, Scholey AB, Pipingas A (2016) Adherence to a Mediterranean-Style Diet and Effects on Cognition in Adults: A Qualitative Evaluation and Systematic Review of Longitudinal and Prospective Trials. *Frontiers in Nutrition* 3:22
- Hardy J (2017) The Discovery of Alzheimer causing Mutations in the APP Gene and the Formulation of the “Amyloid Cascade Hypothesis”. *The FEBS Journal* 284(7):1040–1044
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297(5580):353–356
- Harman D (1983) Free radical theory of aging: Consequences of mitochondrial aging. *AGE* 6(3):86–94
- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 11(3):298–300
- Hartman RE, Shah A, Fagan AM, Schwetye KE, Parsadanian M, Schulman RN, Finn MB, Holtzman DM (2006) Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 24(3):506–515
- Hashimoto T, Ibi M, Matsuno K, Nakashima S, Tanigawa T, Yoshikawa T, Yabe-Nishimura C (2004) An endogenous metabolite of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free Radical Biology & Medicine* 36(5):555–564
- Hauptmann S, Scherping I, Droese S, Brandt U, Schulz KL, Jendrach M, Leuner K, Eckert A, Müller WE (2009) Mitochondrial dysfunction: an early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice. *Neurobiology of Aging* 30(10):1574–1586
- Hayden EY, Yamin G, Beroukhi S, Chen B, Kibalchenko M, Jiang L, Ho L, Wang J, Pasinetti GM, Teplow DB (2015) Inhibiting amyloid beta-protein assembly: Size-activity relationships among grape seed-derived polyphenols. *Journal of Neurochemistry* 135(2):416–430
- Hector KL, Lagisz M, Nakagawa S (2012) The effect of resveratrol on longevity across species: a meta-analysis. *Biology Letters* 8(5):790–793
- Hekimi S, Lapointe J, Wen Y (2011) Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology* 21(10):569–576
- Hepple RT, Rice CL (2016) Innervation and neuromuscular control in ageing skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 594(8):1965–1978
- Hill NTM, Mowszowski L, Naismith SL, Chadwick VL, Valenzuela M, Lampit A (2017) Computerized Cognitive Training in Older Adults With Mild Cognitive Impairment or Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The American Journal of Psychiatry* 174(4):329–340

- Ho L, Chen LH, Wang J, Zhao W, Talcott ST, Ono K, Teplow D, Humala N, Cheng A, Percival SS, Ferruzzi M, Janle E, Dickstein DL, Pasinetti GM (2009) Heterogeneity in red wine polyphenolic contents differentially influences Alzheimer's disease-type neuropathology and cognitive deterioration. *Journal of Alzheimer's Disease* 16(1):59–72
- Hoffman R, Gerber M (2013) Evaluating and adapting the Mediterranean diet for non-Mediterranean populations: a critical appraisal. *Nutrition Reviews* 71(9):573–584
- Hokayem M, Blond E, Vidal H, Lambert K, Meugnier E, Feillet-Coudray C, et al. (2013) Grape polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 36(6):1454–1461
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang L-L, Scherer B, Sinclair DA (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425(6954):191–196
- Hughes RN (2004) The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28(5):497–505
- Huitema LFA, van Weeren PR, Barneveld A, van de Lest CHA, Helms JB, Vaandrager AB (2006) Iron ions derived from the nitric oxide donor sodium nitroprusside inhibit mineralization. *European Journal of Pharmacology* 542(1-3):48–53
- Hunter SK, Pereira HM, Keenan KG (2016) The aging neuromuscular system and motor performance. *Journal of Applied Physiology* 121(4):982–995
- Hyman BT, Trojanowski JQ (1997) Editorial on Consensus Recommendations for the Postmortem Diagnosis of Alzheimer Disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56(10):1095–1097
- Intlekofer KA, Cotman CW (2013) Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 57:47–55
- Izquierdo I, Furini CRG, Myskiw JC (2016) Fear Memory. *Physiological Reviews* 96(2):695–750
- Jackson Laboratory (2015) Baseline life span data. <https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/available-data>. Zuletzt geprüft am 15.12.2015

- Jackson Laboratory (2017a) Life span as a biomarker. <https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/life-span-as-a-biomarker>. Zuletzt geprüft am 03.02.2017
- Jackson Laboratory (2017b) Nomenclature of inbred mice. Nnt mutation and function. <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/genetics-and-nomenclature/inbred-mice>. Zuletzt geprüft am 03.02.2017
- Jacobs DM, Fuhrmann JC, van Dorsten FA, Rein D, Peters S, Velzen, Ewoud J J van, Hollebrands B, Draijer R, van Duynhoven J, Garczarek U (2012) Impact of Short-Term Intake of Red Wine and Grape Polyphenol Extract on the Human Metabolome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(12):3078–3085
- Jacobs KM, Pennington JD, Bisht KS, Aykin-Burns N, Kim H-S, Mishra M, Sun L, Nguyen P, Ahn B-H, Leclerc J, Deng C-X, Spitz DR, Gius D (2008) SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression. *International Journal of Biological Sciences* 4(5):291–299
- Jacobs DR, Tapsell LC (2013) Food synergy: The key to a healthy diet. *The Proceedings of the Nutrition Society* 72(2):200–206
- Jankowsky JL, Melnikova T, Fadale DJ, Xu GM, Slunt HH, Gonzales V, Younkin LH, Younkin SG, Borchelt DR, Savonenko AV (2005) Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience* 25(21):5217–5224
- Janle EM, Lila MA, Grannan M, Wood L, Higgins A, Yousef GG, Rogers RB, Kim H, Jackson GS, Ho L, Weaver CM (2010) Pharmacokinetics and Tissue Distribution of 14 C-Labeled Grape Polyphenols in the Periphery and the Central Nervous System Following Oral Administration. *Journal of Medicinal Food* 13(4):926–933
- Janus C, Flores AY, Xu G, Borchelt DR (2015) Behavioral abnormalities in APPSwe/PS1dE9 mouse model of AD-like pathology: comparative analysis across multiple behavioral domains. *Neurobiology of Aging* 36(9):2519–2532
- Jiang Y, Liu Y, Zhu C, Ma X, Ma L, Zhou L, Huang Q, Cen L, Pi R, Chen X (2015) Minocycline enhances hippocampal memory, neuroplasticity and synapse-associated proteins in aged C57 BL/6 mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 121:20–29
- Jin X, Chen M, Yi L, Chang H, Zhang T, Wang L, Ma W, Peng X, Zhou Y, Mi M (2014) Delphinidin-3-glucoside protects human umbilical vein endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein-induced injury by autophagy upregulation via the AMPK/SIRT1 signaling pathway. *Molecular Nutrition & Food Research* 58(10):1941–1951

- Jones E, Hughes RE (1982) Quercetin, flavonoids and the life-span of mice. *Experimental Gerontology* 17(3):213–217
- Joseph JA, Bartus RT, Clody D, Morgan D, Finch C, Beer B, Sesack S (1983) Psychomotor performance in the senescent rodent: Reduction of deficits via striatal dopamine receptor up-regulation. *Neurobiology of Aging* 4(4):313–319
- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, Bickford PC (1999) Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *The Journal of Neuroscience* 19(18):8114–8121
- Joseph JA, Denisova NA, Arendash G, Gordon M, Diamond D, Shukitt-Hale B, Morgan D (2003) Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. *Nutritional Neuroscience* 6(3):153–162
- Juan ME, Maijo M, Planas JM (2010) Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51(2):391–398
- Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR (2011) Assessment of social interaction behaviors. *Journal of visualized experiments* 48:2473
- Kalt W, Blumberg JB, McDonald JE, Vinqvist-Tymchuk MR, Fillmore SAE, Graf BA, O'Leary JM, Milbury PE (2008) Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(3):705–712
- Kang C, Chung E, Diffie G, Ji LL (2013) Exercise training attenuates aging-associated mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle: role of PGC-1alpha. *Experimental Gerontology* 48(11):1343–1350
- Kang JH, Ascherio A, Grodstein F (2005) Fruit and vegetable consumption and cognitive decline in aging women. *Annals of Neurology* 57(5):713–720
- Kay CD, Kroon PA, Cassidy A (2009) The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. *Molecular Nutrition & Food Research* 53 Suppl 1:S92-101
- Ke Z, Liu Y, Wang X, Fan Z, Chen G, Xu M, Bower KA, Frank JA, Ou X, Shi X, Luo J (2011) Cyanidin-3-glucoside ameliorates ethanol neurotoxicity in the developing brain. *Journal of Neuroscience Research* 89(10):1676–1684

- Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, Muller-Spahn F, Haass C, Czech C, Pradier L, Muller WE, Eckert A (2004a) Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 279(48):50310–50320
- Keil U, Bonert A, Marques CA, Strosznajder JB, Muller-Spahn F, Muller WE, Eckert A (2004b) Elevated nitric oxide production mediates beta-amyloid-induced mitochondria failure. *Polish Journal of Pharmacology* 56(5):631–634
- Kern M, Fridrich D, Reichert J, Skrbek S, Nussler A, Hofem S, Vatter S, Pahlke G, Rufer C, Marko D (2007) Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid. *Molecular Nutrition & Food Research* 51(9):1163–1172
- Kesse-Guyot E, Fezeu L, Andreeva VA, Touvier M, Scalbert A, Hercberg S, Galan P (2012) Total and specific polyphenol intakes in midlife are associated with cognitive function measured 13 years later. *The Journal of Nutrition* 142(1):76–83
- Keys A (1966) Epidemiological studies related to coronary heart disease: characteristics of men aged 40-59 in seven countries. *Acta Medica Scandinavica* 180:4–5
- Keys A (1995) Mediterranean diet and public health: Personal reflections. *The American Journal of Clinical Nutrition* 61(6):1321S-1323S
- Khymenets O, Crespo MC, Dangles O, Rakotomanomana N, Andres-Lacueva C, Visioli F (2016) Human hydroxytyrosol's absorption and excretion from a nutraceutical. *Journal of Functional Foods* 23:278–282
- Knight A, Bryan J, Wilson C, Hodgson JM, Davis CR, Murphy KJ (2016) The Mediterranean Diet and Cognitive Function among Healthy Older Adults in a 6-Month Randomised Controlled Trial: The MedLey Study. *Nutrients* 8(9):E579
- Kodali M, Parihar VK, Hattiangady B, Mishra V, Shuai B, Shetty AK (2015) Resveratrol prevents age-related memory and mood dysfunction with increased hippocampal neurogenesis and microvasculature, and reduced glial activation. *Scientific Reports* 5:8075
- Kogan JH, Frankland PW, Silva AJ (2000) Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus* 10(1):47–56
- Koivisto H, Leinonen H, Puurula M, Hafez HS, Barrera GA, Stridh MH, Waagepetersen HS, Tiainen M, Soininen P, Zilberter Y, Tanila H (2016) Chronic Pyruvate Supplementation Increases Exploratory Activity and Brain Energy Reserves in Young and Middle-Aged Mice. *Frontiers in Aging Neuroscience* 8:41

- Kong X, Wang R, Xue Y, Liu X, Zhang H, Chen Y, Fang F, Chang Y (2010) Sirtuin 3, a New Target of PGC-1 α , Plays an Important Role in the Suppression of ROS and Mitochondrial Biogenesis. *PloS One* 5(7):e11707
- Koo KA, Kim SH, Oh TH, Kim YC (2006) Acteoside and its aglycones protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity. *Life Sciences* 79(7):709–716
- Kowalczyk MC, Kowalczyk P, Tolstykh O, Hanausek M, Walaszek Z, Slaga TJ (2010) Synergistic effects of combined phytochemicals and skin cancer prevention in SENCAR mice. *Cancer Prevention Research* 3(2):170–178
- Krikorian R, Nash TA, Shidler MD, Shukitt-Hale B, Joseph JA (2010) Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. *The British Journal of Nutrition* 103(5):730–734
- Krikorian R, Boespflug EL, Fleck DE, Stein AL, Wightman JD, Shidler MD, Sadat-Hossieny S (2012) Concord grape juice supplementation and neurocognitive function in human aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(23):5736–5742
- Kromhout D, Keys A, Aravanis C, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M (1989) Food consumption patterns in the 1960s in seven countries. *The American Journal of Clinical Nutrition* 49(5):889–894
- Kuntz S, Asseburg H, Dold S, Rompp A, Frohling B, Kunz C, Rudloff S (2015) Inhibition of low-grade inflammation by anthocyanins from grape extract in an in vitro epithelial-endothelial co-culture model. *Food & Function* 6(4):1136–1149
- Kuntz S, Kunz C, Rudloff S (2017) Inhibition of pancreatic cancer cell migration by plasma anthocyanins isolated from healthy volunteers receiving an anthocyanin-rich berry juice. *European Journal of Nutrition* 56(1):203–214
- Kurin E, Mucaji P, Nagy M (2012) In vitro antioxidant activities of three red wine polyphenols and their mixtures: an interaction study. *Molecules* 17(12):14336–14348
- Lagouge M, Armann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127(6):1109–1122
- Lagouge M, Larsson N-G (2013) The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *Journal of Internal Medicine* 273(6):529–543
- Lalonde R (2002) The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 26(1):91–104

- Lamberty Y, Gower AJ (1992) Age-related changes in spontaneous behavior and learning in NMRI mice from middle to old age. *Physiology & Behavior* 51(1):81–88
- Lamport DJ, Lawton CL, Merat N, Jamson H, Myrissa K, Hofman D, Chadwick HK, Quadt F, Wightman JD, Dye L (2016) Concord grape juice, cognitive function, and driving performance: a 12-wk, placebo-controlled, randomized crossover trial in mothers of preteen children. *The American Journal of Clinical Nutrition* 103(3):775–783
- Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, Nielsen LB, Wibrand F, Stride N, Schroder HD, Boushel R, Helge JW, Dela F, Hey-Mogensen M (2012) Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *The Journal of Physiology* 590(14):3349–3360
- Laslo M, Sun X, Hsiao C-T, Wu WW, Shen R-F, Zou S (2013) A botanical containing freeze dried açai pulp promotes healthy aging and reduces oxidative damage in sod1 knockdown flies. *AGE* 35(4):1117–1132
- Lazarov O, Robinson J, Tang Y-P, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM-Y, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnic K, Sisodia SS (2005) Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 120(5):701–713
- Leal G, Afonso PM, Salazar IL, Duarte CB (2015) Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Research* 1621:82–101
- Leal SL, Yassa MA (2015) Neurocognitive Aging and the Hippocampus across Species. *Trends in Neurosciences* 38(12):800–812
- Lee J, Jo D-G, Park D, Chung HY, Mattson MP (2014) Adaptive cellular stress pathways as therapeutic targets of dietary phytochemicals: focus on the nervous system. *Pharmacological Reviews* 66(3):815–868
- Lee Y, Oh S (2015) Administration of red ginseng ameliorates memory decline in aged mice. *Journal of Ginseng Research* 39(3):250–256
- Lee J, Torosyan N, Silverman DH (2017) Examining the impact of grape consumption on brain metabolism and cognitive function in patients with mild decline in cognition: A double-blinded placebo controlled pilot study. *Experimental Gerontology* 87(Pt A):121–128
- Lehmann-Horn F (2007) Motorische Systeme. In: Schmidt RF, Lang F (eds) *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*, 30., neu bearbeitete und aktualisierte Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 143–183
- Letenneur L, Proust-Lima C, Le Gouge A, Dartigues JF, Barberger-Gateau P (2007) Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *American Journal of Epidemiology* 165(12):1364–1371

- Leuner K, Schutt T, Kurz C, Eckert SH, Schiller C, Occhipinti A, Mai S, Jendrach M, Eckert GP, Kruse SE, Palmiter RD, Brandt U, Drose S, Wittig I, Willem M, Haass C, Reichert AS, Muller WE (2012) Mitochondrion-derived reactive oxygen species lead to enhanced amyloid beta formation. *Antioxidants & Redox Signaling* 16(12):1421–1433
- Lian Q, Nie Y, Zhang X, Tan B, Cao H, Chen W, Gao W, Chen J, Liang Z, Lai H, Huang S, Xu Y, Jiang W, Huang P (2016) Effects of grape seed proanthocyanidin on Alzheimer's disease in vitro and in vivo. *Experimental and Therapeutic Medicine* 12(3):1681–1692
- Liang L, Liu X, Wang Q, Cheng S, Zhang S, Zhang M (2013) Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion study of resveratrol and its prodrug 3,5,4'-tri-O-acetylresveratrol in rats. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 20(6):558–563
- Lindenberger U (2014) Human cognitive aging: corriger la fortune? *Science* 346(6209):572–578
- Liu Y-M, Jiang B, Bao Y-M, An L-J (2008) Protocatechuic acid inhibits apoptosis by mitochondrial dysfunction in rotenone-induced PC12 cells. *Toxicology in vitro* 22(2):430–437
- Liu D, Xie K, Yang X, Gu J, Ge L, Wang X, Wang Z (2014) Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. *Behavioural Brain Research* 264:9–16
- Loef M, Walach H (2012) Fruit, vegetables and prevention of cognitive decline or dementia: a systematic review of cohort studies. *The Journal of Nutrition, Health & Aging* 16(7):626–630
- Long J, Gao H, Sun L, Liu J, Zhao-Wilson X (2009) Grape extract protects mitochondria from oxidative damage and improves locomotor dysfunction and extends lifespan in a *Drosophila* Parkinson's disease model. *Rejuvenation Research* 12(5):321–331
- Lopez de las Hazas M-C, Rubio L, Kotronoulas A, La Torre R de, Sola R, Motilva M-J (2015) Dose effect on the uptake and accumulation of hydroxytyrosol and its metabolites in target tissues in rats. *Molecular Nutrition & Food Research* 59(7):1395–1399
- Lopez de las Hazas M-C, Pinol C, Macia A, Motilva M-J (2017) Hydroxytyrosol and the Colonic Metabolites Derived from Virgin Olive Oil Intake Induce Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Colon Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(31):6467–6476
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153(6):1194–1217

- Lu J, Wu D-m, Zheng Y-l, Hu B, Cheng W, Zhang Z-f (2012) Purple sweet potato color attenuates domoic acid-induced cognitive deficits by promoting estrogen receptor-alpha-mediated mitochondrial biogenesis signaling in mice. *Free Radical Biology & Medicine* 52(3):646–659
- Luccarini I, Grossi C, Rigacci S, Coppi E, Pugliese AM, Pantano D, La Marca G, Ed Dami T, Berti A, Stefani M, Casamenti F (2015) Oleuropein aglycone protects against pyroglutamylated-3 amyloid-ss toxicity: biochemical, epigenetic and functional correlates. *Neurobiology of Aging* 36(2):648–663
- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiological reviews* 84(1):87–136
- Macbeth AH, Edds JS, Young WS3 (2009) Housing conditions and stimulus females: A robust social discrimination task for studying male rodent social recognition. *Nature Protocols* 4(11):1574–1581
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79(5):727–747
- Manczak M, Jung Y, Park BS, Partovi D, Reddy PH (2005) Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: Implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging. *Journal of Neurochemistry* 92(3):494–504
- Marco E de, Savarese M, Paduano A, Sacchi R (2007) Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry* 104(2):858–867
- Margalef M, Pons Z, Iglesias-Carres L, Bravo FI, Muguerza B, Arola-Arnal A (2015a) Lack of tissue accumulation of grape seed flavanols after daily long-term administration in healthy and cafeteria-diet obese rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(45):9996–10003
- Margalef M, Pons Z, Bravo FI, Muguerza B, Arola-Arnal A (2015b) Tissue distribution of rat flavanol metabolites at different doses. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 26(10):987–995
- Marosi K, Mattson MP (2014) BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 25(2):89–98
- Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Balca MM, Rizo-Roca D, Moreira PI, Oliveira PJ, Magalhaes J, Ascensao A (2015) Physical exercise improves brain cortex and cerebellum mitochondrial bioenergetics and alters apoptotic, dynamic and auto(mito)phagy markers. *Neuroscience* 301:480–495

- Martín S, González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP (2013) Protective Effects of Merlot Red Wine Extract and its Major Polyphenols in Pc12 Cells under Oxidative Stress Conditions. *Journal of Food Science* 78(1):H112–118
- Martinez-Lapiscina EH, Clavero P, Toledo E, San Julian B, Sanchez-Tainta A, Corella D, Lamuela-Raventos RM, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA (2013) Virgin olive oil supplementation and long-term cognition: the PREDIMED-NAVARRA randomized, trial. *The Journal of Nutrition, Health & Aging* 17(6):544–552
- Martin-Pelaez S, Mosele JI, Pizarro N, Farras M, La Torre R de, Subirana I, Perez-Cano FJ, Castaner O, Sola R, Fernandez-Castillejo S, Heredia S, Farre M, Motilva MJ, Fito M (2017) Effect of virgin olive oil and thyme phenolic compounds on blood lipid profile: implications of human gut microbiota. *European Journal of Nutrition* 56(1):119–131
- Martín-Peláez S, Castañer O, Solà R, Motilva MJ, Castell M, Pérez-Cano FJ, Fitó M (2016) Influence of Phenol-Enriched Olive Oils on Human Intestinal Immune Function. *Nutrients* 8(4):213
- Mattson MP (2008) Hormesis defined. *Ageing Research Reviews* 7(1):1–7
- Mattson MP, Magnus T (2006) Ageing and neuronal vulnerability. *Nature Reviews* 7(4):278–294
- Matzel LD, Light KR, Wass C, Colas-Zelin D, Denman-Brice A, Waddel AC, Kolata S (2011) Longitudinal attentional engagement rescues mice from age-related cognitive declines and cognitive inflexibility. *Learning & Memory* 18(5):345–356
- McCay C, Crowell M, Maynard L (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *Journal of Nutrition* (10):63–79
- McGaugh JL (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annual Review of Neuroscience* 27:1–28
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, JR, Kawas CH, et al. (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 7(3):263–269
- Mertens-Talcott SU, Percival SS (2005) Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Letters* 218(2):141–151

- Mevel E, Merceron C, Vinatier C, Krisa S, Richard T, Masson M, Lesoeur J, Hivernaud V, Gauthier O, Abadie J, Nourissat G, Houard X, Wittrant Y, Urban N, Beck L, Guicheux J (2016) Olive and grape seed extract prevents post-traumatic osteoarthritis damages and exhibits in vitro anti IL-1beta activities before and after oral consumption. *Scientific Reports* 6:33527
- Miro-Casas E, Covas M-I, Fito M, Farre-Albadalejo M, Marrugat J, La Torre R de (2003) Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *European Journal of Clinical Nutrition* 57(1):186–190
- Mitchell SJ, Scheibye-Knudsen M, Longo DL, Cabo R de (2015) Animal models of aging research: implications for human aging and age-related diseases. *Annual Review of Animal Biosciences* 3:283–303
- Monagas M, Urpi-Sarda M, Sanchez-Patan F, Llorach R, Garrido I, Gomez-Cordoves C, Andres-Lacueva C, Bartolome B (2010) Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function* 1(3):233–253
- Mondadori C, Waser PG, Huston JP (1977) Time-dependent effects of post-trial reinforcement, punishment or ECS on passive avoidance learning. *Physiology & Behavior* 18(6):1103–1109
- Montedoro G, Servili M, Baldioli M, Miniati E (1992) Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Initial characterization of the hydrolyzable fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40(9):1577–1580
- Montedoro G, Servili M, Baldioli M, Selvaggini R, Miniati E, Macchioni A (1993) Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41(11):2228–2234
- Mora F (2013) Successful brain aging: plasticity, environmental enrichment, and lifestyle. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 15(1):45–52
- Mora F, Segovia G, del Arco A (2007) Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Research Reviews* 55(1):78–88
- Moreno-Ulloa A, Nogueira L, Rodriguez A, Barboza J, Hogan MC, Ceballos G, Villarreal F, Ramirez-Sanchez I (2015) Recovery of Indicators of Mitochondrial Biogenesis, Oxidative Stress, and Aging With (-)-Epicatechin in Senile Mice. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 70(11):1370–1378

- Morita M, Gravel SP, Hulea L, Larsson O, Pollak M, St-Pierre J, Topisirovic I (2015) mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle* 14(4):473–480
- Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Wilson RS (2006) Associations of vegetable and fruit consumption with age-related cognitive change. *Neurology* 67(8):1370–1376
- Morrison JH, Baxter MG (2012) The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature Reviews. Neuroscience* 13(4):240–250
- Mosconi L (2013) Glucose metabolism in normal aging and Alzheimer's disease: Methodological and physiological considerations for PET studies. *Clinical and Translational Imaging* 1(4)
- Moussa C, Hebron M, Huang X, Ahn J, Rissman RA, Aisen PS, Turner RS (2017) Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation* 14(1):1
- Moy SS, Nadler JJ, Perez A, Barbaro RP, Johns JM, Magnuson TR, Piven J, Crawley JN (2004) Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain, and Behavior* 3(5):287–302
- Muhammad MS, Magaji RA, Mohammed A, Isa A-S, Magaji MG (2017) Effect of resveratrol and environmental enrichment on biomarkers of oxidative stress in young healthy mice. *Metabolic Brain Disease* 32(1):163–170
- Müller W, Eckert A, Kurz C, Eckert G, Leuner K (2010) Mitochondrial Dysfunction: Common Final Pathway in Brain Aging and Alzheimer's Disease—Therapeutic Aspects. *Molecular Neurobiology* 41:159–171
- Munoz-Gonzalez I, Jimenez-Giron A, Martin-Alvarez PJ, Bartolome B, Moreno-Arribas MV (2013) Profiling of microbial-derived phenolic metabolites in human feces after moderate red wine intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(39):9470–9479
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal* 417(1):1–13
- Murugaiyah V, Mattson MP (2015) Neurohormetic phytochemicals: An evolutionary-bioenergetic perspective. *Neurochemistry International* 89:271–280
- Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, Malinow R (2014) Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* 511(7509):348–352
- Nader K, Hardt O (2009) A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature reviews. Neuroscience* 10(3):224–234

- Nair AB, Jacob S (2016) A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* 7(2):27–31
- Nakagawa T, Guarente L (2011) Sirtuins at a glance. *Journal of Cell Science* 124(Pt 6):833–838
- Navarro A, Boveris A (2007) The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 292(2):C670-C686
- Navarro A, Boveris A (2010) Brain mitochondrial dysfunction in aging, neurodegeneration, and Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2:34
- Navarro A, Sanchez Del Pino MJ, Gomez C, Peralta JL, Boveris A (2002) Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *American Journal of Physiology* 282(4):92
- Navarro A, Bandez MJ, Lopez-Cepero JM, Gomez C, Boveris A (2011) High doses of vitamin E improve mitochondrial dysfunction in rat hippocampus and frontal cortex upon aging. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 300(4):R827-R834
- Nemeth K, Plumb GW, Berrin J-G, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA (2003) Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition* 42(1):29–42
- Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T (2005) SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}. *The Journal of Biological Chemistry* 280(16):16456–16460
- Neshatdoust S, Saunders C, Castle SM, Vauzour D, Williams C, Butler L, Lovegrove JA, Spencer JPE (2016) High-flavonoid intake induces cognitive improvements linked to changes in serum brain-derived neurotrophic factor: Two randomised, controlled trials. *Nutrition and Healthy Aging* 4(1):81–93
- Neveu V, Perez-Jimenez J, Vos F, Crespy V, Du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A (2010) Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* 2010:bap024
- Nicolo S de, Tarani L, Ceccanti M, Maldini M, Natella F, Vania A, Chaldakov GN, Fiore M (2013) Effects of olive polyphenols administration on nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the mouse brain. *Nutrition* 29(4):681–687
- Nikolai S, Pallauf K, Huebbe P, Rimbach G (2015) Energy restriction and potential energy restriction mimetics. *Nutrition Research Reviews* 28(2):100–120

- de Oliveira, Oliveira MW, Behr GA, Hoff ML, da RRF, Moreira JC (2009) Evaluation of the effects of vitamin A supplementation on adult rat substantia nigra and striatum redox and bioenergetic states: Mitochondrial impairment, increased 3-nitrotyrosine and alpha-synuclein, but decreased D2 receptor contents. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 33(2):353–362
- Ortmann CF, Reus GZ, Ignacio ZM, Abelaira HM, Titus SE, Carvalho P de, et al. (2016) Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trecul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress. *Neurotoxicity Research* 29(4):469–483
- Ortuño J, Covas M-I, Farre M, Pujadas M, Fito M, Khymenets O, Andres-Lacueva C, Roset P, Joglar J, Lamuela-Raventós RM, La Torre R de (2010) Matrix effects on the bioavailability of resveratrol in humans. *Food Chemistry* 120(4):1123–1130
- Pajuelo D, Quesada H, Diaz S, Fernandez-Iglesias A, Arola-Arnal A, Blade C, Salvado J, Arola L (2012) Chronic dietary supplementation of proanthocyanidins corrects the mitochondrial dysfunction of brown adipose tissue caused by diet-induced obesity in Wistar rats. *The British Journal of Nutrition* 107(2):170–178
- Pantano D, Luccarini I, Nardiello P, Servili M, Stefani M, Casamenti F (2017) Oleuropein aglycone and polyphenols from olive mill waste water ameliorate cognitive deficits and neuropathology. *British Journal of Clinical Pharmacology* 83(1):54–62
- Papandreou MA, Tsachaki M, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Lamari FN, Margarity M (2011) Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. *Behavioural Brain Research* 219(2):197–204
- Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM (2011) Mitochondrial dysfunction in brain aging: Role of oxidative stress and cardiolipin. *Neurochemistry International* 58(4):447–457
- Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G (2014) Cardiolipin and Mitochondrial Function in Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*
- Pasinetti GM, Wang J, Ho L, Zhao W, Dubner L (2015) Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta* 1852(6):1202–1208
- Passamonti S, Terdoslavich M, Franca R, Vanzo A, Tramer F, Braidot E, Petrusa E, Vianello A (2009) Bioavailability of flavonoids: a review of their membrane transport and the function of bilitranslocase in animal and plant organisms. *Current Drug Metabolism* 10(4):369–394

- Pastor A, Rodríguez-Morató J, Olesti E, Pujadas M, Pérez-Mañá C, Khymenets O, Fitó M, Covas M-I, Solá R, Motilva M-J, Farré M, La Torre R de (2016) Analysis of free hydroxytyrosol in human plasma following the administration of olive oil. *Journal of Chromatography A* 1437:183–190
- Patel KR, Brown VA, Jones DJL, Britton RG, Hemingway D, Miller AS, West KP, Booth TD, Perloff M, Crowell JA, Brenner DE, Steward WP, Gescher AJ, Brown K (2010) Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Research* 70(19):7392–7399
- Patki G, Ali Q, Pokkunuri I, Asghar M, Salim S (2015) Grape powder treatment prevents anxiety-like behavior in a rat model of aging. *Nutrition Research* 35(6):504–511
- Pazoki-Toroudi H, Amani H, Ajami M, Nabavi SF, Braidy N, Kasi PD, Nabavi SM (2016) Targeting mTOR signaling by polyphenols: A new therapeutic target for ageing. *Ageing Research Reviews* 31:55–66
- Peng C, Zuo Y, Kwan KM, Liang Y, Ma KY, Chan HYE, Huang Y, Yu H, Chen Z-Y (2012) Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* 47(2):170–178
- Peng S, Zhang B, Yao J, Duan D, Fang J (2015) Dual protection of hydroxytyrosol, an olive oil polyphenol, against oxidative damage in PC12 cells. *Food & Function* 6(6):2091–2100
- Peng Y, Hou C, Yang Z, Li C, Jia L, Liu J, Tang Y, Le Shi, Li Y, Long J, Liu J (2016a) Hydroxytyrosol mildly improve cognitive function independent of APP processing in APP/PS1 mice. *Molecular Nutrition & Food Research* 60
- Peng K, Tao Y, Zhang J, Wang J, Ye F, Dan G, Zhao Y, Cai Y, Zhao J, Wu Q, Zou Z, Cao J, Sai Y (2016b) Resveratrol Regulates Mitochondrial Biogenesis and Fission/Fusion to Attenuate Rotenone-Induced Neurotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016:6705621
- Perez-Jimenez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A (2010) Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(8):4959–4969
- Perez-Jimenez J, Fezeu L, Touvier M, Arnault N, Manach C, Hercberg S, Galan P, Scalbert A (2011) Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *The American Journal of Clinical Nutrition* 93(6):1220–1228
- Pervin M, Hasnat MA, Lee YM, Kim DH, Jo JE, Lim BO (2014) Antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition of grape skin anthocyanin (GSA). *Molecules* 19(7):9403–9418

- Petit-Taboue MC, Landeau B, Desson JF, Desgranges B, Baron JC (1998) Effects of healthy aging on the regional cerebral metabolic rate of glucose assessed with statistical parametric mapping. *NeuroImage* 7(3):176–184
- Phenol-Explorer (2017). <http://phenol-explorer.eu/>. Zuletzt geprüft am 10.02.2017
- Piroddi M, Albini A, Fabiani R, Giovannelli L, Luceri C, Natella F, Rosignoli P, Rossi T, Taticchi A, Servili M, Galli F (2017) Nutrigenomics of extra-virgin olive oil: A review. *BioFactors* 43(1):17–41
- Pitozzi V, Jacomelli M, Zaid M, Luceri C, Bigagli E, Lodovici M, Ghelardini C, Vivoli E, Norcini M, Gianfriddo M, Esposto S, Servili M, Morozzi G, Baldi E, Bucherelli C, Dolara P, Giovannelli L (2010) Effects of dietary extra-virgin olive oil on behaviour and brain biochemical parameters in ageing rats. *The British Journal of Nutrition* 103(11):1674–1683
- Pitozzi V, Jacomelli M, Catelan D, Servili M, Taticchi A, Biggeri A, Dolara P, Giovannelli L (2012) Long-term dietary extra-virgin olive oil rich in polyphenols reverses age-related dysfunctions in motor coordination and contextual memory in mice: role of oxidative stress. *Rejuvenation Research* 15(6):601–612
- Ploumi C, Daskalaki I, Tavernarakis N (2017) Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. *The FEBS Journal* 284(2):183–195
- Pohland M, Hagl S, Pellowska M, Wurglics M, Schubert-Zsilavec M, Eckert GP (2016) MH84: A Novel gamma-Secretase Modulator/PPARgamma Agonist--Improves Mitochondrial Dysfunction in a Cellular Model of Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research* 41(1-2):231–242
- Polidori MC, Pratico D, Mangialasche F, Mariani E, Aust O, Anlasik T, Mang N, Pientka L, Stahl W, Sies H, Mecocci P, Nelles G (2009) High fruit and vegetable intake is positively correlated with antioxidant status and cognitive performance in healthy subjects. *Journal of Alzheimer's disease* 17(4):921–927
- Porquet D, Casadesus G, Bayod S, Vicente A, Canudas AM, Vilaplana J, Pelegri C, Sanfeliu C, Camins A, Pallas M, del Valle J (2013) Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8. *Age* 35(5):1851–1865
- Porquet D, Grinan-Ferre C, Ferrer I, Camins A, Sanfeliu C, del Valle J, Pallas M (2014) Neuroprotective role of trans-resveratrol in a murine model of familial Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 42(4):1209–1220
- Poulose SM, Bielinski DF, Carey A, Schauss AG, Shukitt-Hale B (2017) Modulation of oxidative stress, inflammation, autophagy and expression of Nrf2 in hippocampus and frontal cortex of rats fed with acai-enriched diets. *Nutritional Neuroscience* 20(5):305–315

- Prasain JK, Peng N, Dai Y, Moore R, Arabshahi A, Wilson L, Barnes S, Michael Wyss J, Kim H, Watts RL (2009) Liquid chromatography tandem mass spectrometry identification of proanthocyanidins in rat plasma after oral administration of grape seed extract. *Phytomedicine* 16(2-3):233–243
- Preedy VR (ed) (2010) *Olives and olive oil in health and disease prevention*, 1. ed. Academic Press, Amsterdam
- Price NL, Gomes AP, Ling AJY, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, et al. (2012) SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metabolism* 15(5):675–690
- Prior R (2012) Anthocyanins. In: Spencer JPE (ed) *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function*, vol 20121374. CRC Press, Hoboken
- Prior RL, Wu X (2006) Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research* 40(10):1014–1028
- Rabøl R, Larsen S, Højberg PMV, Almdal T, Boushel R, Haugaard SB, Andersen JL, Madsbad S, Dela F (2010) Regional Anatomic Differences in Skeletal Muscle Mitochondrial Respiration in Type 2 Diabetes and Obesity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95(2):857–863
- Radak Z, Hart N, Sarga L, Koltai E, Atalay M, Ohno H, Boldogh I (2010). *Journal of Alzheimer's disease* 20(3):777–783
- Radak Z, Koltai E, Taylor AW, Higuchi M, Kumagai S, Ohno H, Goto S, Boldogh I (2013) Redox-regulating sirtuins in aging, caloric restriction, and exercise. *Free Radical Biology & Medicine* 58:87–97
- Raefsky SM, Mattson MP (2017) Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance. *Free Radical Biology & Medicine* 102:203–216
- Rangarajan P, Karthikeyan A, Lu J, Ling E-A, Dheen ST (2015) Sirtuin 3 regulates Foxo3a-mediated antioxidant pathway in microglia. *Neuroscience* 311:398–414
- Reiman EM (2016) Alzheimer's disease: Attack on amyloid-beta protein. *Nature* 537(7618):36–37
- Ren J, Wu YD, Chan JSY, Yan JH (2013) Cognitive aging affects motor performance and learning. *Geriatrics & Gerontology International* 13(1):19–27
- Renaud S, Lorgevil M de (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339(8808):1523–1526

- Rendeiro C, Vauzour D, Rattray M, Waffo-Teguo P, Merillon JM, Butler LT, Williams CM, Spencer JPE (2013) Dietary levels of pure flavonoids improve spatial memory performance and increase hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *PLoS One* 8(5):e63535
- Rhein V, Song X, Wiesner A, Ittner LM, Baysang G, Meier F, Ozmen L, Bluethmann H, Drose S, Brandt U, Savaskan E, Czech C, Gotz J, Eckert A (2009) Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(47):20057–20062
- Rigacci S, Stefani M (2016) Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. *International Journal of Molecular Sciences* 17(6)
- Ringholm S, Olesen J, Pedersen JT, Brandt CT, Halling JF, Hellsten Y, Prats C, Pilegaard H (2013) Effect of lifelong resveratrol supplementation and exercise training on skeletal muscle oxidative capacity in aging mice; impact of PGC-1alpha. *Experimental Gerontology* 48(11):1311–1318
- Roberson ED, Defazio RA, Barnes CA, Alexander GE, Bizon JL, Bowers D, Foster TC, Glisky EL, Levin BE, Ryan L, Wright CB, Geldmacher DS (2012) Challenges and opportunities for characterizing cognitive aging across species. *Frontiers in Aging Neuroscience* 4:6
- Rodriguez-Bies E, Tung BT, Navas P, Lopez-Lluch G (2016) Resveratrol primes the effects of physical activity in old mice. *The British Journal of Nutrition* 116(6):979–988
- Rodriguez-Morato J, Xicota L, Fito M, Farre M, Dierssen M, La Torre R de (2015) Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules* 20(3):4655–4680
- Rojanathammanee L, Puig KL, Combs CK (2013) Pomegranate polyphenols and extract inhibit nuclear factor of activated T-cell activity and microglial activation in vitro and in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Nutrition* 143(5):597–605
- Romero C, Benedí J, Villar A, Martín-Aragón S (2010) Involvement of Hsp70, a stress protein, in the resistance of long-term culture of PC12 cells against sodium nitroprusside (SNP)-induced cell death. *Archives of Toxicology* 84(9):699–708
- Ronchi JA, Figueira TR, Ravagnani FG, Oliveira HCF, Vercesi AE, Castilho RF (2013) A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. *Free Radical Biology & Medicine* 63:446–456

- Rotches-Ribalta M, Urpi-Sarda M, Llorach R, Boto-Ordóñez M, Jauregui O, Chiva-Blanch G, Perez-García L, Jaeger W, Guillen M, Corella D, Tinahones FJ, Estruch R, Andres-Lacueva C (2012a) Gut and microbial resveratrol metabolite profiling after moderate long-term consumption of red wine versus dealcoholized red wine in humans by an optimized ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Journal of Chromatography A* 1265:105–113
- Rotches-Ribalta M, Andres-Lacueva C, Estruch R, Escribano E, Urpi-Sarda M (2012b) Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. *Pharmacological Research* 66(5):375–382
- Rotches-Ribalta M, Urpi-Sarda M, Martí MM, Reglero G, Andres-Lacueva C (2014) Resveratrol metabolic fingerprinting after acute and chronic intakes of a functional beverage in humans. *Electrophoresis* 35(11):1637–1643
- Rothwell JA, Urpi-Sarda M, Boto-Ordóñez M, Knox C, Llorach R, Eisner R, Cruz J, Neveu V, Wishart D, Manach C, Andres-Lacueva C, Scalbert A (2012) Phenol-Explorer 2.0: a major update of the Phenol-Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and pharmacokinetics in humans and experimental animals. *Database* 2012:bas031
- Rothwell JA, Perez-Jimenez J, Neveu V, Medina-Remon A, M'hiri N, Garcia-Lobato P, Manach C, Knox C, Eisner R, Wishart DS, Scalbert A (2013) Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database* 2013:bat070
- Rothwell JA, Urpi-Sarda M, Boto-Ordóñez M, Llorach R, Farran-Codina A, Barupal DK, Neveu V, Manach C, Andres-Lacueva C, Scalbert A (2016) Systematic analysis of the polyphenol metabolome using the Phenol-Explorer database. *Molecular Nutrition & Food Research* 60(1):203–211
- Rubió L, Farràs M, La Torre R de, Macià A, Romero M-P, Valls RM, Solà R, Farré M, Fitó M, Motilva M-J (2014) Metabolite profiling of olive oil and thyme phenols after a sustained intake of two phenol-enriched olive oils by humans: Identification of compliance markers. *Food Research International* 65:59–68
- Ryan MT, Hoogenraad NJ (2007) Mitochondrial-nuclear communications. *Annual Review of Biochemistry* 76:701–722
- Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM (2005) The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature Medicine* 11(12):1306–1313
- Sahin E, DePinho RA (2012) Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 13(6):397–404

- Sakakibara H, Ogawa T, Koyanagi A, Kobayashi S, Goda T, Kumazawa S, Kobayashi H, Shimoi K (2009) Distribution and excretion of bilberry anthocyanins corrected in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(17):7681–7686
- Sandoval-Acuna C, Ferreira J, Speisky H (2014) Polyphenols and mitochondria: an update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 559:75–90
- Sano A, Yamakoshi J, Tokutake S, Tobe K, Kubota Y, Kikuchi M (2003) Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67(5):1140–1143
- Sardari M, Rezaeifard A, Khodagholi F (2015) Hippocampal signaling pathways are involved in stress-induced impairment of memory formation in rats. *Brain Research* 1625:54–63
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45(4):287–306
- Scarmeas N, Stern Y, Tang M-X, Mayeux R, Luchsinger JA (2006) Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 59(6):912–921
- Scarmeas N, Stern Y, Mayeux R, Manly JJ, Schupf N, Luchsinger JA (2009a) Mediterranean diet and mild cognitive impairment. *Archives of Neurology* 66(2):216–225
- Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, Stern Y (2009b) Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA* 302(6):627–637
- Schaffer S, Halliwell B (2012) Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. *Genes & Nutrition* 7(2):99–109
- Schaffer S, Podstawa M, Visioli F, Bogani P, Muller WE, Eckert GP (2007) Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and ex vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(13):5043–5049
- Schaffer S, Muller WE, Eckert GP (2010) Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacological Research* 62(4):322–327
- Schaffer S, Asseburg H, Kuntz S, Muller WE, Eckert GP (2012) Effects of polyphenols on brain ageing and Alzheimer's disease: focus on mitochondria. *Molecular Neurobiology* 46(1):161–178
- Scheffler IE (2001) A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1(1):3–31
- Schmitt-Schillig S, Schaffer S, Weber CC, Eckert GP, Muller WE (2005) Flavonoids and the aging brain. *Journal of Physiology and Pharmacology* 56 Suppl 1:23–36

- Seidler RD, Bernard JA, Burutolu TB, Fling BW, Gordon MT, Gwin JT, Kwak Y, Lipps DB (2010) Motor control and aging: links to age-related brain structural, functional, and biochemical effects. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 34(5):721–733
- Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine* 8(6):595–608
- Selmin OI, Romagnolo APG, Romagnolo DF (2016) Mediterranean Diet and Neurodegenerative Diseases. In: Romagnolo DF, Selmin OI (eds) *Mediterranean diet: Dietary guidelines and impact on health and disease*. Humana Press, Cham, pp 153–164
- Seo AY, Joseph A-M, Dutta D, Hwang, Judy C Y, Aris JP, Leeuwenburgh C (2010) New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *Journal of Cell Science* 123(Pt 15):2533–2542
- Serra A, Macia A, Romero M-P, Pinol C, Motilva M-J (2011) Rapid methods to determine procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B* 879(19):1519–1528
- Serra A, Rubió L, Borràs X, Macià A, Romero M, Motilva M (2012) Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Molecular Nutrition & Food Research* 56(3):486–496
- Servili M, Selvaggini R, Esposito S, Taticchi A, Montedoro G, Morozzi G (2004) Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography. A* 1054(1-2):113–127
- Servili M, Esposito S, Fabiani R, Urbani S, Taticchi A, Mariucci F, Selvaggini R, Montedoro GF (2009) Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology* 17(2):76–84
- Sevigny J, Chiao P, Bussiere T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y, O'Gorman J, Qian F, Arastu M, Li M, Chollate S, Brennan MS, Quintero-Monzon O, Scannevin RH, Arnold HM, Engber T, Rhodes K, Ferrero J, Hang Y, Mikulskis A, Grimm J, Hock C, Nitsch RM, Sandrock A (2016) The antibody aducanumab reduces Abeta plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 537(7618):50–56
- Shadel GS, Horvath TL (2015) Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell* 163(3):560–569

- Shih P-H, Chan Y-C, Liao J-W, Wang M-F, Yen G-C (2010) Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21(7):598–605
- Shoji H, Takao K, Hattori S, Miyakawa T (2016) Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Molecular Brain* 9:11
- Shukitt-Hale B, Carey A, Simon L, Mark DA, Joseph JA (2006) Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. *Nutrition* 22(3):295–302
- Shukitt-Hale B, Carey AN, Jenkins D, Rabin BM, Joseph JA (2007) Beneficial effects of fruit extracts on neuronal function and behavior in a rodent model of accelerated aging. *Neurobiology of Aging* 28(8):1187–1194
- Shukitt-Hale B, Cheng V, Joseph JA (2009) Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. *Nutritional Neuroscience* 12(3):135–140
- Shukitt-Hale B, Bielinski DF, Lau FC, Willis LM, Carey AN, Joseph JA (2015) The beneficial effects of berries on cognition, motor behaviour and neuronal function in ageing. *The British Journal of Nutrition* 114(10):1542–1549
- Siddiqui MA, Kashyap MP, Kumar V, Al-Khedhairy AA, Musarrat J, Pant AB (2010) Protective potential of trans-resveratrol against 4-hydroxynonenal induced damage in PC12 cells. *Toxicology in vitro* 24(6):1592–1598
- Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Murthy V, Ramassamy C (2008) Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(13):4855–4873
- 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. *Journal of Alzheimer's Disease* 39(2):271–282
- Skemiene K, Liobikas J, Borutaite V (2015) Anthocyanins as substrates for mitochondrial complex I - protective effect against heart ischemic injury. *The FEBS Journal* 282(5):963–971
- Skroza D, Generalić Mekinić I, Svilović S, Šimat V, Katalinić V (2015) Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures. *Journal of Food Composition and Analysis* 38:13–18
- Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(23):10540–10543

- Smith PJ, Blumenthal JA, Hoffman BM, Cooper H, Strauman TA, Welsh-Bohmer K, Brown-dyke JN, Sherwood A (2010) Aerobic exercise and neurocognitive performance: a meta-analytic review of randomized controlled trials. *Psychosomatic Medicine* 72(3):239–252
- Smolen P, Zhang Y, Byrne JH (2016) The right time to learn: mechanisms and optimization of spaced learning. *Nature Reviews. Neuroscience* 17(2):77–88
- Solfrizzi V, Frisardi V, Seripa D, Logroscino G, Imbimbo BP, D'Onofrio G, Addante F, Sancarlo D, Cascavilla L, Pilotto A, Panza F (2011) Mediterranean diet in pre-dementia and dementia syndromes. *Current Alzheimer Research* 8(5):520–542
- Spencer J (2001) Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine* 31(9):1139–1146
- Spencer JPE, Abd El Mohsen MM, Mini-hane A-M, Mathers JC (2008) Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: Strengths, limitations and application in nutrition research. *The British Journal of Nutrition* 99(1):12–22
- Stalmach A, Edwards CA, Wightman JD, Crozier A (2012) Gastrointestinal stability and bio-availability of (poly)phenolic compounds following ingestion of Concord grape juice by hu-mans. *Molecular Nutrition & Food Research* 56(3):497–509
- Stalmach A, Edwards CA, Wightman JD, Crozier A (2013) Colonic catabolism of dietary phe-nolic and polyphenolic compounds from Concord grape juice. *Food & Function* 4(1):52–62
- Stauch KL, Purnell PR, Villeneuve LM, Fox HS (2015) Proteomic analysis and functional char-acterization of mouse brain mitochondria during aging reveal alterations in energy metab-olism. *Proteomics* 15(9):1574–1586
- St-Laurent-Thibault C, Arseneault M, Longpre F, Ramassamy C (2011) Tyrosol and hydroxy-tyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid-beta-induced toxicity. Involvement of the NF-kappaB signaling. *Current Alzheimer Research* 8(5):543–551
- Stockburger C, Gold VAM, Pallas T, Kolesova N, Miano D, Leuner K, Muller WE (2014) A cell model for the initial phase of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's dis-ease* 42(2):395–411
- Stoupi S, Williamson G, Viton F, Barron D, King LJ, Brown JE, Clifford MN (2010) In vivo bioavailability, absorption, excretion, and pharmacokinetics of ¹⁴Cprocyanidin B2 in male rats. *Drug Metabolism and Disposition* 38(2):287–291

- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127(2):397–408
- Stranahan AM, Mattson MP (2012) Recruiting adaptive cellular stress responses for successful brain ageing. *Nature Reviews. Neuroscience* 13(3):209–216
- Strathearn KE, Yousef GG, Grace MH, Roy SL, Tambe MA, Ferruzzi MG, Wu Q-L, Simon JE, Lila MA, Rochet J-C (2014) Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinsons disease. *Brain Research* 1555:60–77
- Suárez M, Valls RM, Romero M-P, Macià A, Fernández S, Giralt M, Solà R, Motilva M-J (2011) Bioavailability of phenols from a phenol-enriched olive oil. *British Journal of Nutrition* 106(11):1691–1701
- Suganuma M, Okabe S, Oniyama M, Tada Y, Ito H, Fujiki H (1998) Wide distribution of 3H (-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis* 19(10):1771–1776
- Sumpio BJ, Cordova AC, Sumpio BE (2016) Wine, Polyphenols, and Cardioprotection. In: Romagnolo DF, Selmin OI (eds) *Mediterranean diet: Dietary guidelines and impact on health and disease*. Humana Press, Cham, pp 97–108
- Sundaresan NR, Gupta M, Kim G, Rajamohan SB, Isbatan A, Gupta MP (2009) Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 119(9):2758–2771
- Swerdlow RH, Khan SM (2004) A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses* 63(1):8–20
- Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM (2013) The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta* 1842(8):1219–1231
- Swindell WR (2012) Dietary restriction in rats and mice: a meta-analysis and review of the evidence for genotype-dependent effects on lifespan. *Ageing Research Reviews* 11(2):254–270
- Talavera S, Felgines C, Texier O, Besson C, Manach C, Lamaison J-L, Remesy C (2004) Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *The Journal of Nutrition* 134(9):2275–2279
- Talavera S, Felgines C, Texier O, Besson C, Gil-Izquierdo A, Lamaison J-L, Remesy C (2005) Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10):3902–3908

- Tang X, Shen T, Jiang X, Xia M, Sun X, Guo H, Ling W (2015) Purified anthocyanins from bilberry and black currant attenuate hepatic mitochondrial dysfunction and steatohepatitis in mice with methionine and choline deficiency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(2):552–561
- Tangney CC, Kwasny MJ, Li H, Wilson RS, Evans DA, Morris MC (2011) Adherence to a Mediterranean-type dietary pattern and cognitive decline in a community population. *American Journal of Clinical Nutrition* 93(3):601–607
- Tapsell LC (2014) Foods and food components in the Mediterranean diet: supporting overall effects. *BMC Medicine* 12:100
- Tarozzi A, Morroni F, Hrelia S, Angeloni C, Marchesi A, Cantelli-Forti G, Hrelia P (2007) Neuroprotective effects of anthocyanins and their in vivo metabolites in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters* 424(1):36–40
- Tarsa L, Goda Y (2002) Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(2):1012–1016
- Tavares L, Figueira I, McDougall GJ, Vieira HLA, Stewart D, Alves PM, Ferreira RB, Santos CN (2013) Neuroprotective effects of digested polyphenols from wild blackberry species. *European Journal of Nutrition* 52(1):225–236
- Terwel D, Nieland LJ, Schutte B, Reutelingsperger CP, Ramaekers FC, Steinbusch HW (2000) S-nitroso-N-acetylpenicillamine and nitroprusside induce apoptosis in a neuronal cell line by the production of different reactive molecules. *European Journal of Pharmacology* 400(1):19–33
- Tresserra-Rimbau A, Medina-Remon A, Perez-Jimenez J, Martinez-Gonzalez MA, Covas MI, Corella D, et al. (2013) Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: the PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases* 23(10):953–959
- Trichopoulou A, Kyzozis A, Rossi M, Katsoulis M, Trichopoulos D, La Vecchia C, Lagiou P (2015) Mediterranean diet and cognitive decline over time in an elderly Mediterranean population. *European Journal of Nutrition* 54(8):1311–1321
- Tung BT, Rodriguez-Bies E, Thanh HN, Le-Thi-Thu H, Navas P, Sanchez VM, Lopez-Lluch G (2015) Organ and tissue-dependent effect of resveratrol and exercise on antioxidant defenses of old mice. *Aging Clinical and Experimental Research* 27(6):775–783

- Turner RS, Thomas RG, Craft S, van Dyck CH, Mintzer J, Reynolds BA, Brewer JB, Rissman RA, Raman R, Aisen PS (2015) A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. *Neurology* 85(16):1383–1391
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 552(Pt 2):335–344
- U.S. Food and Drug Administration (2013) GRAS Notice (GRN) No. 446. <http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm337457.pdf>. Zuletzt geprüft am 16.02.2017
- U.S. Food and Drug Administration (2015) GRAS Notice (GRN) No. 600 for Hydroxytyrosol. <http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm494696.pdf>. Zuletzt geprüft am 16.02.2017
- Underwood E (2014) Starting young. *Science* 346(6209):568–571
- United Nations (2015) World Population Ageing 2015 (ST/ESA/SER.A/390). http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015_Report.pdf. Zuletzt geprüft am 20.01.2017
- Vafai SB, Mootha VK (2012) Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 491(7424):374–383
- Valls-Pedret C, Lamuela-Raventos RM, Medina-Remon A, Quintana M, Corella D, Pinto X, Martinez-Gonzalez MA, Estruch R, Ros E (2012) Polyphenol-rich foods in the Mediterranean diet are associated with better cognitive function in elderly subjects at high cardiovascular risk. *Journal of Alzheimer's Disease* 29(4):773–782
- Valls-Pedret C, Sala-Vila A, Serra-Mir M, Corella D, La Torre R de, Martinez-Gonzalez MA, Martinez-Lapiscina EH, Fito M, Perez-Heras A, Salas-Salvado J, Estruch R, Ros E (2015) Mediterranean Diet and Age-Related Cognitive Decline: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Internal Medicine* 175(7):1094–1103
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *The Journal of Neuroscience* 25(38):8680–8685
- van Praag H, Lucero MJ, Yeo GW, Stecker K, Heivand N, Zhao C, Yip E, Afanador M, Schroeter H, Hammerstone J, Gage FH (2007) Plant-derived flavanol (-)epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. *The Journal of Neuroscience* 27(22):5869–5878
- Vasto S, Buscemi S, Barera A, Di Carlo M, Accardi G, Caruso C (2014) Mediterranean Diet and Healthy Ageing: A Sicilian Perspective. *Gerontology* 60(6):508–518

- Vauzour D (2014) Effect of flavonoids on learning, memory and neurocognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(6):1042–1056
- Vemuri P, Lesnick TG, Przybelski SA, Machulda M, Knopman DS, Mielke MM, Roberts RO, Geda YE, Rocca WA, Petersen RC, Jack CR, JR (2014) Association of lifetime intellectual enrichment with cognitive decline in the older population. *JAMA Neurology* 71(8):1017–1024
- Vergheze J, Annweiler C, Ayers E, Barzilai N, Beauchet O, Bennett DA, et al. (2014) Motoric cognitive risk syndrome: multicountry prevalence and dementia risk. *Neurology* 83(8):718–726
- Villa-Cuesta E, Boylan JM, Tatar M, Gruppuso PA (2011) Resveratrol inhibits protein translation in hepatic cells. *PLoS One* 6(12):e29513
- Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli G, Caruso D (2000) Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters* 468(2-3):159–160
- Visioli F, Galli C, Grande S, Colonnelli K, Patelli C, Galli G, Caruso D (2003) Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *The Journal of Nutrition* 133(8):2612–2615
- Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJC, Leenen R, Katan MB (2002a) Olive Oil Phenols Are Absorbed in Humans. *The Journal of Nutrition* 132(3):409–417
- Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJC, Leenen R, Katan MB (2002b) Olive Oil Phenols Are Absorbed in Humans. *The Journal of Nutrition* 132(3):409–417
- Vissers MN, Zock PL, Katan MB (2004) Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: A review. *European Journal of Clinical Nutrition* 58(6):955–965
- Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, Ghidini C, Caporaso N, Vescovi PP, Fogliano V, Marchelli R (2005) Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 49(5):495–504
- Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, Galvano F, Gallo A, Scalfi L, Fogliano V (2007) Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *The Journal of Nutrition* 137(9):2043–2048
- Vitaglione P, Sforza S, Rio D (2012) Occurrence, Bioavailability and Metabolism of Resveratrol. In: Spencer JPE (ed) *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function*, vol 20121374. CRC Press, Hoboken

- Vivancos M, Moreno JJ (2008) Effect of resveratrol, tyrosol and beta-sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *The British Journal of Nutrition* 99(6):1199–1207
- Wahl D, Cogger VC, Solon-Biet SM, Waern RVR, Gokarn R, Pulpitel T, Cabo R de, Mattson MP, Raubenheimer D, Simpson SJ, Le Couteur DG (2016) Nutritional strategies to optimise cognitive function in the aging brain. *Ageing Research Reviews* 31:80–92
- Wang J, Ho L, Zhao W, Ono K, Rosensweig C, Chen L, Humala N, Teplow DB, Pasinetti GM (2008) Grape-derived polyphenolics prevent Abeta oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience* 28(25):6388–6392
- Wang J, Pflieger CM, Friedman L, Vittorino R, Zhao W, Qian X, Conley L, Ho L, Pasinetti GM (2010) Potential application of grape derived polyphenols in huntington's disease. *Translational Neuroscience* 1(2):95–100
- Wang J, Ferruzzi MG, Ho L, Blount J, Janle EM, Gong B, Pan Y, Gowda GAN, Raftery D, Arrieta-Cruz I, Sharma V, Cooper B, Lobo J, Simon JE, Zhang C, Cheng A, Qian X, Ono K, Teplow DB, Pavlides C, Dixon RA, Pasinetti GM (2012a) Brain-targeted proanthocyanidin metabolites for Alzheimer's disease treatment. *The Journal of Neuroscience* 32(15):5144–5150
- Wang P, Heber D, Henning SM (2012b) Quercetin increased the antiproliferative activity of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate in prostate cancer cells. *Nutrition and Cancer* 64(4):580–587
- Wang J, Bi W, Cheng A, Freire D, Vempati P, Zhao W, Gong B, Janle EM, Chen T-Y, Ferruzzi MG, Schmeidler J, Ho L, Pasinetti GM (2014) Targeting multiple pathogenic mechanisms with polyphenols for the treatment of Alzheimer's disease-experimental approach and therapeutic implications. *Frontiers in Aging Neuroscience* 6:42
- Wang L, Li YM, Lei L, Liu Y, Wang X, Ma KY, Chen Z-Y (2015a) Cranberry anthocyanin extract prolongs lifespan of fruit flies. *Experimental Gerontology* 69:189–195
- Wang D, Ho L, Faith J, Ono K, Janle EM, Lachcik PJ, Cooper BR, Jannasch AH, D'Arcy BR, Williams BA, Ferruzzi MG, Levine S, Zhao W, Dubner L, Pasinetti GM (2015b) Role of intestinal microbiota in the generation of polyphenol-derived phenolic acid mediated attenuation of Alzheimer's disease beta-amyloid oligomerization. *Molecular Nutrition & Food Research* 59(6):1025–1040

- Waterhouse AL (2002) Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957:21–36
- Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik, Linda J (2014) Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Frontiers in Genetics* 5:88
- Webster BR, Lu Z, Sack MN, Scott I (2012) The role of sirtuins in modulating redox stressors. *Free Radical Biology & Medicine* 52(2):281–290
- Weixelbaumer KM, Drechsler S, Wehrenpfennig P, Khadem A, Bahrami S, Tichy A, Palme R, Osuchowski MF (2014) Estrus cycle status defined by vaginal cytology does not correspond to fluctuations of circulating estrogens in female mice. *Shock* 41(2):145–153
- Wenz T (2013) Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1alpha under cellular stress. *Mitochondrion* 13(2):134–142
- Westerink RHS, Ewing AG (2008) The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiologica* 192(2):273–285
- Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A (2005) A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics* 288(2):369–376
- Wiese S, Esatbeyoglu T, Winterhalter P, Kruse H-P, Winkler S, Bub A, Kulling SE (2015) Comparative biokinetics and metabolism of pure monomeric, dimeric, and polymeric flavan-3-ols: a randomized cross-over study in humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 59(4):610–621
- Wilson MA, Shukitt-Hale B, Kalt W, Ingram DK, Joseph JA, Wolkow CA (2006) Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5(1):59–68
- Wilson RS, Segawa E, Boyle PA, Anagnos SE, Hizek LP, Bennett DA (2012) The Natural History of Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *Psychology and Aging* 27(4):1008–1017
- Wirz KTS, Keitel S, Swaab DF, Verhaagen J, Bossers K (2014) Early molecular changes in Alzheimer disease: can we catch the disease in its presymptomatic phase? *Journal of Alzheimer's disease* 38(4):719–740
- Witte AV, Kerti L, Margulies DS, Floel A (2014) Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *The Journal of Neuroscience* 34(23):7862–7870

- Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, Kempermann G (2006) Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry* 60(12):1314–1323
- World Health Organization (2015) World Report on Ageing and Health. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/186463/1/9789240694811_eng.pdf?ua=1. Zuletzt geprüft am 20.01.2017
- World Health Organization and Alzheimer's Disease International (2012) Dementia: A public health priority. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75263/1/9789241564458_eng.pdf?ua=1. Zuletzt geprüft am 23.12.2017
- Wu Y-T, Lin L-C, Tsai T-H (2009) Measurement of free hydroxytyrosol in microdialysates from blood and brain of anesthetized rats by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography. A* 1216(16):3501–3507
- Yagi S, Drewczynski D, Wainwright SR, Barha CK, Hershorn O, Galea LA (2017) Sex and estrous cycle differences in immediate early gene activation in the hippocampus and the dorsal striatum after the cue competition task. *Hormones and Behavior* 87:69–79
- Yankner BA, Lu T, Loerch P (2008) The aging brain. *Annual Review of Pathology* 3:41–66
- Ye J, Meng X, Yan C, Wang C (2010) Effect of purple sweet potato anthocyanins on beta-amyloid-mediated PC-12 cells death by inhibition of oxidative stress. *Neurochemical Research* 35(3):357–365
- Yin F, Boveris A, Cadenas E (2014) Mitochondrial energy metabolism and redox signaling in brain aging and neurodegeneration. *Antioxidants & Redox Signaling* 20(2):353–371
- Yokozawa T, Lee YA, Zhao Q, Matsumoto K, Cho EJ (2009) Persimmon oligomeric proanthocyanidins extend life span of senescence-accelerated mice. *Journal of Medicinal Food* 12(6):1199–1205
- Yokozawa T, Park CH, Noh JS, Roh SS (2014) Role of oligomeric proanthocyanidins derived from an extract of persimmon fruits in the oxidative stress-related aging process. *Molecules* 19(5):6707–6726
- Youdim KA, Shukitt-Hale B, Joseph JA (2004) Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free radical Biology & Medicine* 37(11):1683–1693
- Youle RJ, van der Bliek AM (2012) Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science* 337(6098):1062–1065

- Yousuf S, Atif F, Ahmad M, Hoda N, Ishrat T, Khan B, Islam F (2009) Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Research* 1250:242–253
- Yu SY, Zhang M, Luo J, Zhang L, Shao Y, Li G (2013) Curcumin ameliorates memory deficits via neuronal nitric oxide synthase in aged mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 45:47–53
- Yuan R, Ackert-Bicknell C, Paigen B, Peters L (2015) Aging study: Lifespan and survival curves for 31 inbred strains of mice: MPD:23401. Mouse Phenome Database web site. <http://phenome.jax.org>. Zuletzt geprüft am 15.12.2015
- Zamora-Ros R, Touillaud M, Rothwell JA, Romieu I, Scalbert A Measuring exposure to the polyphenol metabolome in observational epidemiologic studies: Current tools and applications and their limits. *The American Journal of Clinical Nutrition* 100 (1):11–26
- Zamora-Ros R, Urpi-Sarda M, Lamuela-Raventos RM, Estruch R, Martinez-Gonzalez MA, Bullo M, Aros F, Cherubini A, Andres-Lacueva C (2009) Resveratrol metabolites in urine as a biomarker of wine intake in free-living subjects: The PREDIMED Study. *Free Radical Biology & Medicine* 46(12):1562–1566
- Zamora-Ros R, Touillaud M, Rothwell JA, Romieu I, Scalbert A (2014) Measuring exposure to the polyphenol metabolome in observational epidemiologic studies: Current tools and applications and their limits. *The American Journal of Clinical Nutrition* 100(1):11–26
- Zamora-Ros R, Knaze V, Rothwell JA, Hemon B, Moskal A, Overvad K, et al. (2016) Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *European Journal of Nutrition* 55(4):1359–1375
- Zhang Z, Wu H, Huang H (2016) Epicatechin Plus Treadmill Exercise are Neuroprotective Against Moderate-stage Amyloid Precursor Protein/Presenilin 1 Mice. *Pharmacognosy Magazine* 12(Suppl 2):S139-46
- Zhao W, Wang J, Bi W, Ferruzzi M, Yemul S, Freire D, Mazzola P, Ho L, Dubner L, Pasinetti GM (2015) Novel application of brain-targeting polyphenol compounds in sleep deprivation-induced cognitive dysfunction. *Neurochemistry International* 89:191–197
- Zheng A, Li H, Xu J, Cao K, Li H, Pu W, Yang Z, Peng Y, Long J, Liu J, Feng Z (2015) Hydroxytyrosol improves mitochondrial function and reduces oxidative stress in the brain of db/db mice: role of AMP-activated protein kinase activation. *The British Journal of Nutrition* 113(11):1667–1676

- Zheng W, Chong C-M, Wang H, Zhou X, Zhang L, Wang R, Meng Q, Lazarovici P, Fang J (2016) Artemisinin conferred ERK mediated neuroprotection to PC12 cells and cortical neurons exposed to sodium nitroprusside-induced oxidative insult. *Free Radical Biology & Medicine* 97:158–167
- Zhu L, Liu Z, Feng Z, Hao J, Shen W, Li X, Sun L, Sharman E, Wang Y, Wertz K, Weber P, Shi X, Liu J (2010) Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21(11):1089–1098
- Zhu W, Chen S, Li Z, Zhao X, Li W, Sun Y, Zhang Z, Ling W, Feng X (2014) Effects and mechanisms of resveratrol on the amelioration of oxidative stress and hepatic steatosis in KKAY mice. *Nutrition & Metabolism* 11:35
- Zuo Y, Peng C, Liang Y, Ma KY, Yu H, Edwin Chan HY, Chen Z-Y (2012) Black rice extract extends the lifespan of fruit flies. *Food & Function* 3(12):1271

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit und der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Gunter P. Eckert für die Bereitstellung des Themas, viele anregende Diskussionen zum Fortgang meiner Arbeit, die stets angenehme und motivierende Arbeitsatmosphäre sowie spannende und erlebnisreiche Konferenzreisen und Arbeitsgruppenausflüge.

Gleichermaßen geht mein besonderer Dank an Prof. Clemens Kunz für das Ermöglichen der Promotion über den Kontakt zu Prof. Eckert und die Betreuung sowie umfassende Unterstützung in der ersten Phase meiner Promotion. An dieser Stelle möchte ich auch meinen herzlichen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe von Prof. Kunz richten, in der ich die Grundzüge des wissenschaftlichen Arbeitens erlernt und mein Interesse an der Promotion entwickelt habe.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Adriaan Dorresteyn für die Unterstützung und stets angenehme und unkomplizierte Zweitbetreuung meiner Arbeit bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an die Arbeitsgruppe des Pharmakologischen Instituts für Naturwissenschaftler in Frankfurt, in der ich meine experimentellen Arbeiten für die Promotion durchgeführt und eine ausgesprochen schöne Zeit verbracht habe. Speziell bedanken möchte ich mich bei Stephanie Hagl, Maximilian Pohland, Martina Heinrich, Rekha Grewal, Carola Stockburger und Carmina Schäfer. Wir haben viele Höhen und Tiefen während der Promotionszeit im Labor, aber auch in der Freizeit (u. a. beim Mountainbiken, Klettern, Skifahren) gemeinsam durchlebt und gemeistert. Ihr habt meine Zeit in Frankfurt zu einem ganz besonderen Abschnitt in meinem Leben gemacht.

Bei Stephanie Hagl möchte ich mich darüber hinaus für die außerordentlich geduldige und kompetente Einarbeitung in die Laborarbeiten und die Weitergabe wertvoller Erfahrungen und Kenntnisse bedanken.

Martina Piekorz danke ich für die Tierpflege, insbesondere der vielen Mäuse während der Lebenszeitstudie, sowie Uli Hermann für die Einarbeitung in die Zellkultur und die Zellpflege. Für die Unterstützung im Labor möchte ich mich weiterhin bei Sabrina Bothur, Christina Plank, Marta Borchiellini, Madeleine Müller und Carmina Schäfer bedanken, die im Rahmen ihrer Praktika, Bachelor-, Master- und Diplomarbeiten Daten für meine vorliegende Arbeit erstellt haben.

Bei der Alzheimer Forschung Initiative e.V. bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich meiner Familie danken, ohne die ich den Weg bis zu diesem Punkt nicht hätte gehen können. Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium der Ernährungswissenschaften ermöglicht haben und mir auch während der Promotionszeit stets zur Seite standen. Bei meinem Bruder möchte ich mich von ganzem Herzen für die Unterstützung, speziell zu Beginn der Promotionszeit und während der Fertigstellung der Arbeit, für seine Ratschläge, Korrekturen, motivierenden Worte und Zeit bedanken. Für das Korrekturlesen meiner Arbeit danke ich zudem herzlich Markus Hauke.

Der größte Dank geht an meinen Partner Stefan Hauke für die Unterstützung, Geduld und Liebe während der arbeitsintensiven Promotionszeit und unserer damit verbundenen, langjährigen örtlichen Trennung.

Veröffentlichte Original- und Übersichtsarbeiten

- Asseburg H, Schafer C, Muller M, Hagl S, Pohland M, Berressem D, Borchiellini M, Plank C, Eckert GP (2016) Effects of Grape Skin Extract on Age-Related Mitochondrial Dysfunction, Memory and Life Span in C57BL/6J Mice. *Neuromolecular Medicine* 18(3):378–395
- Hagl S, Asseburg H, Heinrich M, Sus N, Blumrich E-M, Dringen R, Frank J, Eckert GP (2016) Effects of Long-Term Rice Bran Extract Supplementation on Survival, Cognition and Brain Mitochondrial Function in Aged NMRI Mice. *Neuromolecular Medicine* 18(3):347–363
- Kuntz S, Rudloff S, Asseburg H, Borsch C, Fröhling B, Unger F, Dold S, Spengler B, Römpf A, Kunz C (2015) Uptake and bioavailability of anthocyanins and phenolic acids from grape/blueberry juice and smoothie in vitro and in vivo. *British Journal of Nutrition* 113:1044–1055
- Kuntz S, Asseburg H, Dold S, Rompp A, Frohling B, Kunz C, Rudloff S (2015) Inhibition of low-grade inflammation by anthocyanins from grape extract in an in vitro epithelial-endothelial co-culture model. *Food & Function* 6(4):1136–1149
- Asseburg H, Hagl S, Eckert GP (2014) Nutritional approaches for healthy aging of the brain and the prevention of neurodegenerative diseases. *Pharma Nutrition - An Overview*, Springer, Stuttgart
- Schaffer S, Asseburg H, Kuntz S, Muller WE, Eckert GP (2012) Effects of polyphenols on brain ageing and Alzheimer's disease: focus on mitochondria. *Molecular Neurobiology* 46(1):161–178

Erklärung

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

(Datum)

(Unterschrift)