

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft
Professur für Molekulare Ernährungsforschung
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Bedeutung nukleärer Hormonrezeptoren
im Rahmen β -Amyloid-induzierter Degeneration
in einem Alzheimermodell des Nematoden
*Caenorhabditis elegans***

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. troph.)
im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Anne Erdmute Leiteritz, M. Sc. troph.

geboren in Templin

Gießen, Dezember 2019

PROFESSUR FÜR MOLEKULARE ERNÄHRUNGSFORSCHUNG



**Bedeutung nukleärer Hormonrezeptoren
im Rahmen β -Amyloid-induzierter Degeneration
in einem Alzheimermodell des Nematoden
*Caenorhabditis elegans***

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. troph.)
im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Anne Erdmute Leiteritz, M. Sc. troph.

geboren in Templin

Gießen, Dezember 2019

Mit Genehmigung des Fachbereichs Agrarwissenschaften,
Ökotoxikologie und Umweltmanagement der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Prüfungskommission:

1. Gutachter:	Prof. Dr. Uwe Wenzel
2. Gutachter:	Prof. Dr. Gunter P. Eckert
Prüfer:	Prof. Dr. Klaus Eder
Prüferin:	Prof. Dr. Anika E. Wagner
Vorsitzender:	Prof. Dr. Mathias Fasshauer

Tag der Disputation: 26.05.2020

Für meine Familie.

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Morbus Alzheimer	1
1.1.1 Pathophysiologie.....	3
1.1.1.1 β -Amyloid (A β)	3
1.1.1.2 Tau-Protein	6
1.1.2 Zelluläre Dysfunktion/Neurotoxizität.....	7
1.1.3 Genetische Faktoren	8
1.2 Ausgewählte nutritive Faktoren mit Einfluss auf die Alzheimer-Pathogenese.....	10
1.2.1 Cholesterol	10
1.2.2 Vitamin D	11
1.3 Transkriptionsfaktoren	14
1.3.1 Die nukleären Hormonrezeptoren VDR und PPAR	15
1.3.2 Der FOXO Transkriptionsfaktor.....	18
1.4 Die Proteindegradation als Bestandteil der Proteostase.....	20
1.4.1 Ubiquitin-Proteasom-System.....	20
1.4.2 Autophagie.....	22
1.5 Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	24
1.5.1 Anatomie und Physiologie.....	25
1.5.2 Das Alzheimermodell CL2006	30
1.5.3 Der Insulin/IGF-Signalweg in <i>C. elegans</i>	31
1.5.4 Nukleäre Hormonrezeptoren des Steroid-Signalweges in <i>C. elegans</i>	33
1.5.5 Die nukleäre Hormonrezeptorfamilie der PPARs in <i>C. elegans</i>	34
1.5.6 UPS- und Autophagie-vermittelter Proteinabbau in <i>C. elegans</i>	34
2 ZIELSETZUNG	37
3 METHODEN.....	39
3.1 Kultivierung von <i>C. elegans</i>	39
3.1.1 Herstellung von NGM-Agar-Platten.....	39

3.1.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> OP50 Bakterien.....	40
3.1.3	Alterssynchronisation von <i>C. elegans</i> mittels <i>Egg-Preparation</i>	40
3.1.4	Kultivierung von <i>C. elegans</i> in NGM-Flüssigmedium.....	41
3.1.5	RNA-Interferenz in <i>C. elegans</i>	42
3.1.6	Inkubation von <i>C. elegans</i> mit Effektoren.....	44
3.2	Messung der Paralyserate.....	45
3.3	Fluoreszenzmikroskopische Messungen	46
3.3.1	Analyse der DAF-16::GFP Translokation	46
3.3.2	Expressionsanalyse mittels des <i>sod-3p::gfp</i> Transgens.....	47
3.3.3	Quantifizierung der Lysosomen mittels Lysotracker® Red	47
3.3.4	Quantifizierung der Cholesterolaufnahme mittels Dehydroergosterol	48
3.3.5	Bestimmung der A β -Aggregation mittels NIAD-4	49
3.4	Proteinextraktion mittels des Precellys Homogenisators	50
3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	50
3.6	Messung der Proteasomaktivität	51
3.7	PCR-Verfahren.....	52
3.7.1	Single Worm-PCR	52
3.7.1.1	Wurmlyse.....	52
3.7.1.2	cDNA-Synthese	53
3.7.1.3	<i>Single Worm</i> -Polymerase Kettenreaktion.....	53
3.7.1.4	DNA-Gelelektrophorese	54
3.7.2	Quantitative Echtzeit-PCR.....	54
3.7.2.1	RNA-Isolierung	55
3.7.2.2	qRT-PCR	55
3.8	Statistische Auswertung	57
4	ERGEBNISSE.....	58
4.1	Interaktionen zwischen dem Steroid-Signalweg und Insulin/IGF-Signalweg beeinflussen die A β -induzierte Paralyse in CL2006.....	58
4.1.1	Die Aktivierung des nukleären Hormonrezeptors DAF-12 des Steroid- Signalweges steigert die Paralyse in CL2006.....	58
4.1.2	Der Einfluss von DAF-12 auf die Paralyse in CL2006 wird durch dessen Interaktion mit DAF-16 des Insulin/IGF-Signalweges vermittelt	59

4.1.3	Die Mitglieder des Steroid-Signalweges hemmen die nukleäre DAF-16-Lokalisation	60
4.2	Interaktion von Cholesterol und Cholecalciferol mit dem Steroid-Signalweg	67
4.2.1	Cholesterol aktiviert den Steroid-Signalweg und steigert die Paralyse in CL2006	67
4.2.2	Cholecalciferol senkt die Paralyse in CL2006 durch die Hemmung des Steroid-Signalweges	71
4.3	Die <i>daf-12</i> RNAi resultiert in einer verminderten Ablagerung von A β -Aggregaten	77
4.4	Die <i>daf-16</i> RNAi hemmt den lysosomalen und proteasomalen Abbau von A β	78
4.5	Die Bedeutung des PPAR α -Homolog NHR-49 und seiner Bindungspartner für die A β -Toxizität in CL2006	80
4.5.1	Die reduzierte Expression von <i>nhr-49</i> , <i>nhr-66</i> bzw. <i>nhr-80</i> bewirkt eine Steigerung der Paralyse	80
4.5.2	NHR-49 ist stromaufwärts des Steroid-Signalweges aktiv und zeigt zusammen mit seinen Bindungspartnern unterschiedliche Effekte auf die nukleäre Lokalisation und transkriptionelle Aktivität von DAF-16	81
4.5.3	Der Paralyse-hemmende Effekt von NHR-80 beruht auf der Steigerung der β -Oxidation	84
5	DISKUSSION	86
5.1	DAF-12 beeinflusst die A β -Toxizität in CL2006 über die Interaktion mit dem DAF-16 Transkriptionsfaktor und in Abhängigkeit von der Bindung von Cholesterol und Cholecalciferol	88
5.2	Die Aktivität des PPAR α -Homologs NHR-49 wirkt sich protektiv auf die β -Amyloid-induzierte Toxizität in CL2006 aus	96
6	ZUSAMMENFASSUNG	100
7	SUMMARY	102
8	LITERATURVERZEICHNIS	104
9	ANHANG: MATERIAL	134
9.1	Verbrauchsmaterialien	134
9.2	Geräte ..	135
9.3	Chemikalien und Reagenzien	137

9.4 Puffer und Lösungen	139
9.5 Medien	144
9.6 <i>C. elegans</i> Stämme.....	146
9.7 Bakterienstämme.....	146
9.8 RNAi-Klone	147
9.9 Kits	147
9.10 Oligonukleotide.....	148
9.11 Software	148
DANKSAGUNG	149
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	151

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung der APP-Prozessierung	4
Abbildung 1.2:	Stoffwechsel und Funktion von Vitamin D im humanen Organismus.	12
Abbildung 1.3:	Der UPS-vermittelte Proteinabbau.....	21
Abbildung 1.4:	Die drei Arten des Autophagie-vermittelten Proteinabbaus.	23
Abbildung 1.5:	Anatomie des adulten <i>C. elegans</i> -Hermaphroditen.	26
Abbildung 1.6:	Lebenszyklus des <i>C. elegans</i> Hermaphroditen bei 22°C.	29
Abbildung 1.7:	Die Aktivität des Steroid-Signalwegs hat Einfluss auf die DAF-16- Lokalisation in <i>C. elegans</i>	32
Abbildung 3.1:	Prinzip der RNAi	43
Abbildung 3.2:	GFP-Fluoreszenz von TJ356.....	46
Abbildung 3.3:	Anfärbung der A β -Aggregate mit NIAD-4.....	50
Abbildung 4.1:	Paralyseraten von CL2006 nach <i>nhr-8</i> bzw. <i>daf-36</i> RNAi.	59
Abbildung 4.2:	Paralyseraten von CL2006 nach simultaner RNAi von <i>nhr-8</i> bzw. <i>daf-36</i> und <i>daf-16</i>	60
Abbildung 4.3:	Nukleäre DAF-16::GFP-Lokalisation in TJ356 nach RNAi der Mitglieder des Steroid-Signalweges.	61
Abbildung 4.4:	Relative SOD-3::GFP-Expression in CF1553 nach <i>daf-16</i> RNAi.....	62
Abbildung 4.5:	Paralyserate von CL2006 nach <i>sod-3</i> RNAi.	63
Abbildung 4.6:	Relative SOD-3::GFP-Expression in CF1553 nach RNAi der Mitglieder des Steroidsignalweges.	64
Abbildung 4.7:	Relative SOD-3::GFP-Expression in CF1553 nach Doppel-RNAi von <i>daf-16</i> und jeweils einem der Mitglieder des Steroidsignalweges.....	66
Abbildung 4.8:	Einfluss einer erhöhten Cholesterolzufuhr auf die Paralyserate in CL2006 unter RNAi verschiedener Mitglieder des Steroid- Signalweges.	68
Abbildung 4.9:	Nukleäre DAF-16::GFP Lokalisation in TJ356 nach Hemmung des Steroid-Signalweges und erhöhter Cholesterolzufuhr.	69
Abbildung 4.10:	Relative DHE-Fluoreszenz in CL2006 nach <i>vit-6</i> RNAi und erhöhter DHE-Zufuhr.	70
Abbildung 4.11:	Paralyserate von CL2006 nach Doppel-RNAi von <i>nhr-8</i> und <i>vit-6</i> bei erhöhter Cholesterolzufuhr.....	71

Abbildung 4.12:	Paralyserate von CL2006 nach 48 h Inkubation mit 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M Cholecalciferol	72
Abbildung 4.13:	Paralyserate von CL2006 nach 48 h Inkubation mit 1 μ M Cholecalciferol in An- und Abwesenheit erhöhter Cholesterolkonzentrationen.....	72
Abbildung 4.14:	Paralyserate von CL2006 nach 48 h Inkubation mit 1 μ M Cholecalciferol unter Hemmung des Steroid-Signalweges.	73
Abbildung 4.15:	Relative DHE-Fluoreszenz in CL2006 nach 48 h Inkubation mit 1 μ M Cholecalciferol in An- und Abwesenheit einer <i>vit-6</i> RNAi.....	74
Abbildung 4.16:	Paralyserate von CL2006 nach 48 h Inkubation mit 1 μ M Cholecalciferol unter Hemmung des Transkriptionsfaktors DAF-16.....	75
Abbildung 4.17:	Nukleäre DAF-16::GFP Lokalisation in TJ356 nach 48 h Inkubation mit 1 μ M Cholecalciferol unter Hemmung des Steroid-Signalweges.....	76
Abbildung 4.18:	Relative NIAD-4 Fluoreszenz in CL2006 nach <i>daf-12</i> RNAi.....	77
Abbildung 4.19:	Lysosomendichte in CL2006 in Ab- bzw. Anwesenheit der <i>daf-16</i> RNAi.....	78
Abbildung 4.20:	Proteasomaktivität in CL2006 in Ab- bzw. Anwesenheit der <i>daf-16</i> RNAi.....	79
Abbildung 4.21:	Paralyserate von CL2006 nach <i>nhr-49</i> , <i>nhr-66</i> bzw. <i>nhr-80</i> RNAi.....	80
Abbildung 4.22:	Paralyserate von CL2006 nach der Doppel-RNAi von <i>nhr-49</i> und <i>daf-9</i> bzw. der Doppel-RNAi von <i>nhr-49</i> und <i>daf-12</i>	81
Abbildung 4.23:	Nukleäre DAF-16::GFP Lokalisation in TJ356 nach der Doppel-RNAi von <i>nhr-49</i> und <i>daf-9</i> bzw. der Doppel-RNAi von <i>nhr-49</i> und <i>daf-12</i>	82
Abbildung 4.24:	Nukleäre DAF-16::GFP Lokalisation in TJ356 nach <i>nhr-49</i> , <i>nhr-66</i> bzw. <i>nhr-80</i> RNAi und nach Doppel-RNAi von <i>nhr-49</i> und <i>nhr-66</i> bzw. <i>nhr-80</i>	83
Abbildung 4.25:	Relative SOD-3::GFP-Expression in CF1553 nach <i>nhr-66</i> bzw. <i>nhr-80</i> RNAi.	84
Abbildung 4.26:	Paralyserate von CL2006 nach <i>ech-1</i> RNAi.	85
Abbildung 4.27:	Relative <i>ech-1</i> Expression nach <i>nhr-80</i> RNAi.....	85

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1: Zyklus-Einstellungen für SW-PCR.....	54
Tabelle 3.2: Zyklus-Einstellungen für qRT-PCR.....	56
Tabelle 9.1: Verbrauchsmaterialien mit Angabe des Herstellers	134
Tabelle 9.2: Geräte unter Angabe des Herstellers	135
Tabelle 9.3: Chemikalien mit Angabe von Herstellern und Bestellnummern	137
Tabelle 9.4: Stammlösungen	139
Tabelle 9.5: Bleichlösung	140
Tabelle 9.6: DEPC-Wasser	140
Tabelle 9.7: Einfrierpuffer A.....	140
Tabelle 9.8: Einfrierpuffer B	141
Tabelle 9.9: Ethanol:Tween®20	141
Tabelle 9.10: Fixierungslösung	141
Tabelle 9.11: Lyse-Puffer I	141
Tabelle 9.12: Lyse-Puffer II	142
Tabelle 9.13: M9-Puffer	142
Tabelle 9.14: M9:Tween®-Puffer	142
Tabelle 9.15: NaCl-Pepton	143
Tabelle 9.16: PBS für Wurmfärbung	143
Tabelle 9.17: Permeabilisierungspuffer	143
Tabelle 9.18: Proteasomaktivitäts-Messpuffer.....	143
Tabelle 9.19: 10x TBS-Puffer	144
Tabelle 9.20: 50x TAE-Puffer.....	144
Tabelle 9.21: NGM-Agar	144
Tabelle 9.22: Flüssig-NGM.....	145
Tabelle 9.23: 2x YT-Agar	145
Tabelle 9.24: 2x YT-Medium.....	146
Tabelle 9.25: <i>C. elegans</i> Stämme.....	146
Tabelle 9.26: Bakterienstämme	146
Tabelle 9.27: RNAi-Klone	147
Tabelle 9.28: Kits	147
Tabelle 9.29: Oligonukleotide.....	148
Tabelle 9.30: Verwendete Software mit Angabe des Herstellers.....	148

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α 7-nAChR	α 7-Nikotin Acetylcholin Rezeptor
A β	β -Amyloid
ABC-Transporter	<i>ATP-binding cassette-transporter</i>
AD	Morbus Alzheimer Demenz
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase-family enzyme</i>
<i>adm-4</i>	<i>ADAM (disintegrin plus metalloprotease) family</i>
AF-1	Aktivierungsfunktion
AGE-1	<i>AGEing alteration</i>
AICD	<i>APP intracellular domain</i>
AKT-1	<i>AKT kinase family</i>
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
APH1	<i>anterior pharynx-defective 1</i>
<i>apl-1</i>	<i>amyloid precursor-like</i>
APOE	Apolipoprotein E
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
ATG	Autophagie-assoziiertes Protein
BACE1	<i>β-site APP cleaving enzyme 1</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BEC-1	<i>BEClin homolog</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	<i>cAMP-response element-binding protein</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie
CTF	C-terminales Fragment
C _T	<i>Cycle Threshold</i>
<i>daf</i>	<i>abnormal DAuer Formation</i>
DBD	DNA bindenden Domäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHE	Dehydroergosterol
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	doppelsträngige RNA

<i>EggPrep</i>	<i>egg preparation</i>
EOAD	<i>early onset AD</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-assisted degradation</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
ERR	<i>estrogen-related receptor</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FGF23	<i>fibroblast growth factor 23</i>
FOXO	<i>Forkhead-Class O</i>
gDNA	genomische DNA
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
HNF4	<i>hepatocyte nuclear factor 4</i>
<i>hop-1</i>	<i>homolog of presenilin</i>
HRE	<i>hormone response element</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IKK	<i>inhibitor of nuclear factor κB kinase</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JNK	<i>Jun-N-terminal kinase</i>
LAMP-2A	<i>lysosome-associated membrane protein type 2A</i>
LBD	Liganden bindende Domäne
LC3	<i>light chain 3</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LGG-1	<i>LC3, GABARAP and GATE-16 family</i>
LOAD	<i>late-onset AD</i>
LRP5	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein 5</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAP-LC3	<i>human microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
MARRS	<i>membrane associated rapid response steroid-binding</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MST1	<i>mammalian Ste20-like kinase 1</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>

NHR	nukleärer Hormonrezeptor
NIAD-4	{[5'- (p-hydroxyphenyl)- 2,20- bithienyl- 5- yl] - methylenidene}- propanedinitrile
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NTC	<i>no template control</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEN-2	<i>presenilin enhancer 2</i>
PI3	Phosphoinositid-3
PI3K	Phosphatidylinositol --Kinase
PKC	Proteinkinase C
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPRE	<i>PPAR response element</i>
qRT-PCR	Quantitative- Reverse Transkriptase- PCR
RAGE	Rezeptor für <i>advanced glycosylation endproducts</i>
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor-κB Ligand</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RME	<i>receptor-mediated endocytosis</i>
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
sAPPα	<i>soluble APPα</i>
SD	<i>standard deviation</i>
<i>sel-12</i>	<i>suppressor/enhancer of lin-12</i>
SGK	<i>serum and glucocorticoid-induced kinase</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SIRT1	<i>silent information regulator 1</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
<i>sod-3</i>	<i>SOD (superoxide dismutase)</i>
SORL1	<i>sortilin-related receptor 1</i>
Suc-LLVY-AMC	N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4- Methylcoumarin
<i>sup-17</i>	<i>suppressor</i>
SW-PCR	<i>Single Worm-PCR</i>

TBS	<i>tris-buffered saline</i>
UBA-1	<i>UBA (human ubiquitin) related</i>
<i>ubq-1</i>	UBiQuitin
ULK	<i>unc-51-like kinase 1</i>
<i>unc-54</i>	<i>uncoordinated</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UVB	Ultraviolett B
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	Vitamin D <i>responsive elements</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer (AD) ist eine Form der Demenz, die Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt wurde. In dieser Zeit lernt der Neuropathologe ALOIS ALZHEIMER die Patientin Auguste Deter kennen, die verschiedene Symptome, wie fortschreitende kognitive Beeinträchtigungen, Gedächtnisverlust, Sprachstörungen und eine psychosoziale Inkompetenz zeigte [1]. Nach ihrem Tod im Jahr 1906 untersuchte Alzheimer das Gehirn der Patientin, das sich äußerlich bereits durch eine Atrophie auszeichnete. Durch die Anfertigung von histologischen Schnitten konnte er durch die mikroskopische Untersuchung des Gewebes neben zahlreichen abgestorbenen Neuronen zwei wesentliche Veränderungen feststellen. Zum einen entdeckte er in abgestorbenen Hirnarealen verdickte neurofibrilläre Bündel. Zum anderen fanden sich über die gesamte Hirnrinde verteilt Plaque-artige Ablagerungen einer bis dahin unbekanntes Substanz [2]. Später wurde erkannt, dass sich die Plaques aus dem β -Amyloid ($A\beta$)-Peptid aufbauen [3–5], welches ursprünglich durch GLENNER [6] in den meningovaskulären Amyloid-Ablagerungen von Alzheimer Gehirnen identifiziert wurde. Für die Diagnostik der AD ist das Vorliegen von intraneuronalen neurofibrillären Bündeln und von extrazellulären $A\beta$ -Plaques im Gehirn entscheidend, weshalb die eindeutige Diagnose nur *post mortem* mittels einer Obduktion erfolgen kann [7]. Die AD äußert sich bei Betroffenen durch die fortschreitende Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen, die zu den AD typischen Verhaltensweisen und psychologischen Symptomen führen [8]. Neben Apathie und Depressionen gehören Unruhe, eine erhöhte Reizbarkeit, Wahnvorstellungen, Halluzinationen und ein abnormes Bewegungsverhalten zu den Charakteristika der AD [9, 10]. Je nach Krankheitsverlauf ist der Betroffene früher oder später nicht mehr dazu in der Lage, eigenständig zu leben und auf Hilfe angewiesen [8]. Nicht nur für den Betroffenen selbst, sondern auch für sein soziales Umfeld stellt die AD somit eine besondere Herausforderung dar [11].

Im Jahr 2019 waren weltweit etwa 50 Millionen Menschen an Demenz erkrankt. Es wird angenommen, dass diese Zahl im Jahr 2030 auf etwa 82 Millionen und im Jahr 2050 auf etwa 152 Millionen ansteigen wird [12]. Unter den Demenzformen gilt die AD mit etwa 65 % aller Fälle als die häufigste Form [13]. Weitere häufig auftretende Demenzformen sind die Vaskuläre Demenz, die Lewy-Körperchen-Demenz und die fronto-temporale Demenz (Pick-Krankheit) [14]. Bedingt durch die steigende Lebenserwartung der Menschen nimmt die Häufigkeit für neurodegenerative Erkrankungen insgesamt zu [15]. Das Altern gilt als der Hauptrisikofaktor für die Entstehung der AD [16]. In der Vergangenheit wurde postuliert, dass sich das individuelle

Erkrankungsrisiko ab dem 65. Lebensjahr verdoppelt [17]. Neueren Schätzungen zufolge ist jede neunte Person ab dem 65. Lebensjahr und jede dritte Person ab dem 85. Lebensjahr von AD bedroht [18]. Gleichzeitig ist festzustellen, dass die AD Erkrankung die Lebenserwartung insgesamt verkürzt [16].

Neben der AD-Form, die sich im Alter manifestiert und als *late-onset AD* (LOAD; ≥ 65 Jahre) bezeichnet wird, existiert die *early onset AD* (EOAD), die vor dem 65. Lebensjahr auftritt [14]. Die häufiger vorkommende LOAD wird auch als sporadische Form der AD angesehen, wohingegen die EOAD als familiäre Form gilt und auf genetisch vererbaren Faktoren beruht. Allerdings werden auch für die sporadische AD genetische Risikofaktoren beschrieben [14], die unter 1.1.3 genauer erläutert werden. Zusätzlich zum Altern und der Genetik werden verschiedene modifizierbare Faktoren mit der Pathogenese der AD assoziiert. Zum einen werden vasculäre Risikofaktoren, zu denen Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Rauchen und Übergewicht zählen, als prädisponierend für die Alzheimer Erkrankung diskutiert [19]. Umgekehrt wird verschiedenen Ernährungsgewohnheiten eine protektive Rolle zugesprochen. Diese umfassen die regelmäßige Aufnahme von verschiedenen mehrfach-ungesättigten Fettsäuren, Antioxidantien und Vitaminen [20]. Der Lebensstil und psychosoziale Faktoren werden auch als relevante Faktoren für die AD-Pathogenese postuliert. Beispielsweise werden Depressionen und eine soziale Isolation als AD-fördernd eingeordnet, wohingegen körperliche Bewegung und ein höherer Bildungsgrad das AD Risiko senken [19, 21, 22].

Zwar konnten schon einige beeinflussende Faktoren für die AD-Pathogenese herausgestellt werden, allerdings sind die genauen mechanistischen Ursachen noch unklar [23]. Daher ist eine Heilung bisher nicht möglich. Derzeit werden verschiedene Medikamente zur Verzögerung des Krankheitsverlaufs und zur Verbesserung der Symptomatik eingesetzt. Dazu zählen die Cholinesterase-Inhibitoren Donepezil, Rivastigmin und Galantamin, die dem bei AD vorherrschenden Acetylcholin-Mangel durch die Hemmung des Acetylcholinabbaus entgegenwirken und damit dessen Verfügbarkeit im synaptischen Spalt erhöhen. Des Weiteren wird das Medikament Memantin eingesetzt, das als N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor-Antagonist die Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität hemmt, welche für die AD-Erkrankung charakteristisch ist [24]. Im Rahmen von möglichen zukünftigen Behandlungsansätzen fokussiert sich die Forschung u.a. auf Möglichkeiten, die A β -Synthese zu hemmen und den Abbau von A β zu fördern, sowie die Aktivität von neuroprotektiven Faktoren im Gehirn zu unterstützen [25]. Zu diesem Zweck wird u.a. die Wirksamkeit von β -Sekretase-Inhibitoren [26] und von Modulatoren der γ -Sekretase untersucht (siehe 1.1.1) [27]. Der Abbau von A β wird durch verschiedene Systeme wie dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und dem Autophagie-Lysosom-System vermittelt.

Die A β -assoziierte Hemmung der UPS könnte möglicherweise durch einen gesteigerten lysosomalen Abbau kompensiert werden [28]. Ein neuroprotektiver Faktor ist der *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), der im Gehirn weit verbreitet ist und mit seiner neurotrophen Funktion essenziell für die Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität und der Synaptogenese im Hippocampus ist. Da während der AD-Pathogenese die BDNF-Synthese vermindert ist, stellt dessen Erhöhung auch einen therapeutischen Ansatz dar [29]. Weitere Therapieansätze befassen sich mit der Behandlung der mit übermäßiger neuronaler A β -Ansammlung assoziierten Konsequenzen, wie z.B. oxidativem Stress [30] und inflammatorischen Reaktionen [31].

1.1.1 Pathophysiologie

Die charakteristischen pathophysiologischen Merkmale der AD sind das Vorliegen von sogenannten extrazellulären A β -Plaques und intrazellulären neurofibrillären Bündeln, die zu neuronalen Schäden und letztendlich zum Absterben der Neuronen führen. Grundlegender Bestandteil der A β -Plaques bildet das β -Amyloid [32].

1.1.1.1 β -Amyloid (A β)

Das A β -Peptid ist ein Spaltprodukt des *Amyloid Precursor Proteins* (APP) [32]. APP ist ein Typ I integrales Membranprotein, das durch das auf Chromosom 21 lokalisierte und hoch-konservierte APP-Gen kodiert wird. Bedingt durch das alternative Spleißen ist APP in drei Hauptisoformen existent: APP695, APP751 und APP770. APP695 wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert. Die APP-Struktur untergliedert sich in eine große extrazelluläre N-terminale Domäne, eine hydrophobe Transmembran- und eine kurze cytoplasmatische C-terminale Domäne [33]. APP ist an einer Reihe von Prozessen im Gehirn beteiligt, welche die Funktion der Neuronen betreffen und neuroprotektiv wirken. Dazu zählen u.a. die neuronale Stammzellproliferation und -differenzierung, das Neuritenwachstum, die Zelladhäsion und die Synaptogenese sowie die Regulierung der synaptischen Plastizität [34]. Die verschiedenen Funktionen begründen sich z.T. auf den Spaltprodukten, die infolge der posttranslationalen APP-Prozessierung entstehen [35]. Wie in Abbildung 1.1 dargestellt, wird zwischen der nicht-amyloidogenen und der amyloidogenen Prozessierung differenziert, wobei infolge der zweiten Verarbeitung das als toxisch beschriebene A β entsteht [36].

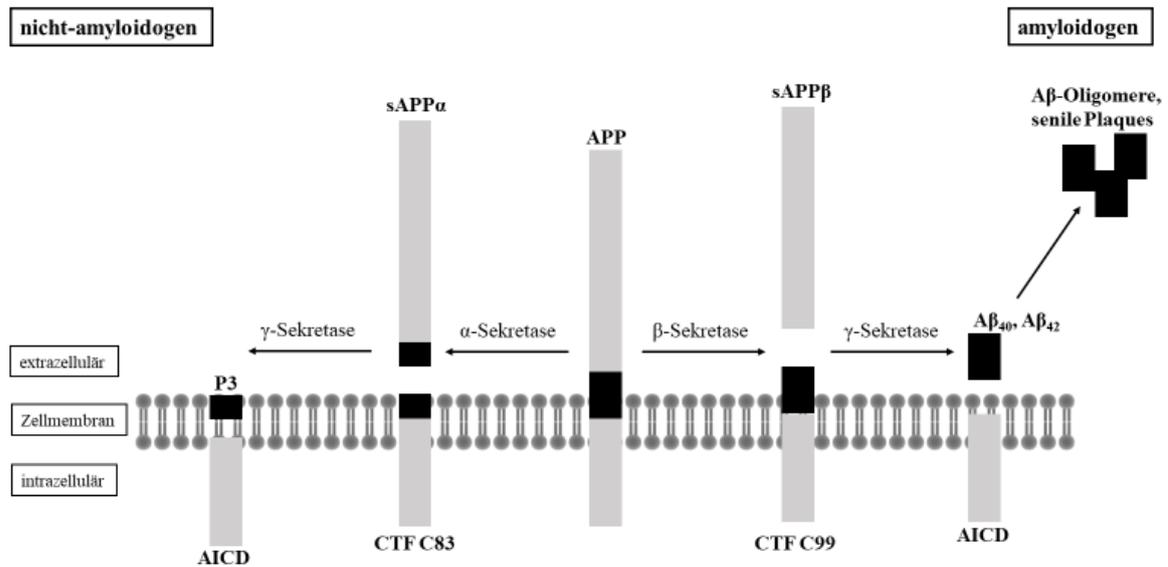


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der APP-Prozessierung.

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

An der Prozessierung sind die endoproteolytischen Enzyme α - und β -Sekretase bzw. der Enzymkomplex γ -Sekretase beteiligt. Die Aktivität der α -Sekretase wird durch die Enzyme ADAM9, ADAM10 und ADAM17 vermittelt, die zur ADAM-Familie (*a disintegrin and metalloproteinase-family enzyme*) gehören [37]. Als verantwortlich für die Aktivität der β -Sekretase wurde das β -site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) identifiziert, welches eine Aspartyl-Protease ist [38]. Die γ -Sekretase ist hingegen ein Enzymkomplex bestehend aus den vier Proteinkomponenten Presenilin, PEN-2 (*presenilin enhancer 2*), APH1 (*anterior pharynx-defective 1*) und Nicastrin. Presenilin, von dem es die zwei Homologe PS1 und PS2 gibt, bildet das katalytische Zentrum [39].

Während der vorwiegend ablaufenden nicht-amyloidogenen Prozessierung wird APP zuerst durch die α -Sekretase im Bereich der A β -Sequenz gespalten, wodurch extrazellulär ein lösliches APP-Bruchstück (*soluble APP α* ; sAPP α) freigesetzt wird und das membran-assoziierte C-terminale Fragment (CTF) C83 (aus 83 Aminosäuren bestehend) entsteht. Der nächste Schritt wird durch die γ -Sekretase vermittelt, welche die Spaltung des C83-Fragments in ein lösliches P3-Peptid und in die APP intracellular domain (AICD) vornimmt [32]. Das APP-Bruchstück sAPP α ist als neuronaler Wachstumsfaktor aktiv und wirkt beispielweise an der Synaptogenese mit, weshalb es als neuroprotektiv gilt [33].

Der amyloidogene Weg beginnt hingegen mit der Aktivität der β -Sekretase, die APP in das extrazelluläre sAPP β und das membran-assoziierte CTF C99 (aus 99 Aminosäuren bestehend)

umsetzt. Danach spaltet die γ -Sekretase das C99-Fragment in das intrazelluläre AICD und das extrazelluläre neurotoxische A β [40].

Neben der beschriebenen extrazellulären Ablagerung von A β konnte eine intrazelluläre Akkumulation des Peptids nachgewiesen werden [32, 41, 42]. Dafür werden verschiedene Gründe diskutiert. Es ist möglich, dass das sezernierte A β entweder mittels einer Rezeptor-vermittelten oder einer Rezeptor-unabhängigen Endocytose in die Zelle aufgenommen wird [43]. Rezeptoren, denen gegenüber A β eine erhöhte Bindungsaffinität aufweist, sind u.a. der Rezeptor für *advanced glycation end products* (RAGE), der NMDA-Rezeptor, der $\alpha 7$ -Nikotin Acetylcholin Rezeptor ($\alpha 7$ -nAChR) und der *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP)-Rezeptor. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von A β an RAGE, $\alpha 7$ -nAChR und LRP zu dessen Aufnahme in die Zelle führt, die durch entsprechende Kollokalisierungen von intrazellulärem A β mit den Rezeptoren nachgewiesen werden konnte [44, 45]. Weiterhin haben Untersuchungen ergeben, dass lösliches A β_{1-40} auch über die passive Diffusion in das Innere eines Neuronen gelangen kann [46]. Zudem ist APP nicht nur in der Plasmamembran der Zelle, sondern auch in Membranen von verschiedenen Zellorganellen wie z.B. dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), dem trans-Golgi-Netzwerk und dem endosomalen-lysosomalen System lokalisiert, wodurch bei vorhandener β - und γ -Sekretase-Aktivität A β intrazellulär gebildet werden kann [47]. Auch in der Membran von Mitochondrien ist APP vorhanden und wird dort prozessiert [48].

Das infolge der amyloidogenen Prozessierung entstandene hydrophobe A β -Peptid variiert in der Länge der Aminosäuresequenz, wovon sich die Aggregationsneigung und somit auch die Toxizität ableitet [49]. Das häufigste Monomer ist das aus 40 Aminosäuren bestehende A β_{1-40} . Unter physiologischen Bedingungen liegt A β_{1-40} beispielsweise zu A β_{1-42} in einem Verhältnis von 9:1 vor [50]. Bei AD Patienten konnte eine Verschiebung dieses Verhältnisses zu einer erhöhten Bildung von A β_{1-42} festgestellt werden, das aufgrund seiner höheren Aggregationsneigung als toxischer eingestuft wird [50, 51]. A β -Monomere können sich zu A β -Oligomeren zusammenschließen, die über die Bildung von unlöslichen Fibrillen zu Ablagerungen im Gehirn führen, die die für die AD charakteristischen senilen Plaques darstellen [32]. Die A β -Ablagerung als senile Plaques wurde lange Zeit als die Hauptursache für alle pathologischen Veränderungen während der AD-Pathogenese gesehen und als „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ beschrieben [52]. Allerdings haben Untersuchungen gezeigt, dass bereits die löslichen A β -Oligomere synaptotoxisch wirken [53, 54]. Durch die Interaktion der A β -Oligomere mit verschiedenen Rezeptoren werden Signalkaskaden ausgelöst, die u.a. zu einer erhöhten ROS-Entstehung [55], zur mitochondrialen Dysfunktion [56], zu einer gestörten Metallionen-

Homöostase [57] und letztendlich zur Apoptose [58] führen. Außerdem ist die neuronale Anhäufung von A β mit der Induktion von inflammatorischen Prozessen assoziiert, die letztendlich den Krankheitsverlauf der AD zusätzlich beschleunigen können [17, 31].

Für die Toxizität von A β ist dessen Überproduktion entscheidend, die aus einem Ungleichgewicht zwischen amyloidogener und nicht-amyloidogener APP-Prozessierung resultiert [59]. Grundlegend ist die Bildung von A β aber ein physiologischer Vorgang. A β beeinflusst u.a. die Bildung und Differenzierung von Neuronen [60] sowie die synaptische Plastizität [61].

1.1.1.2 Tau-Protein

Das zweite pathophysiologische Merkmal der AD ist die Entstehung von neurofibrillären Bündeln aufgrund einer Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins [17].

Das Tau-Protein ist ein vorwiegend neuronales Protein, das sich im Cytosol mit den Mikrotubuli assoziiert [62, 63]. Durch die Bindung des Tubulin-Proteins wird dessen Polymerisation gefördert und stabilisiert. Daher ist es am strukturellen Aufbau und an dynamischen Prozessen innerhalb des Neurons beteiligt [62]. Für das Tau-Protein wird in diesem Zusammenhang eine verstärkende Wirkung auf die mit dem Neuritenwachstum assoziierte Signaltransduktion postuliert [64].

Die Struktur des Tau-Proteins unterteilt sich in vier Regionen; einer N-terminalen Projektionsregion, einer Prolin-reichen Domäne, einer Mikrotubuli-bindenden Domäne und einer C-terminalen Region [65]. Durch alternatives Splicing um die N-terminale Region und der Mikrotubuli-bindenden Domäne entstehen sechs verschiedene Isoformen des Proteins [63]. Aufgrund des hohen Anteils an basischen Aminosäuren und der daraus resultierenden positiven Ladung ist das Tau-Protein sehr hydrophil und besitzt eine ungefaltete Anordnung der Aminosäuren, die das Protein weniger kompakt als andere cytosolische Proteine sein lässt [63, 66]. Das Tau-Protein unterliegt verschiedenen posttranslationalen Modifikationen, die es streng in seinen Eigenschaften und Funktionen regulieren [66]. Im Rahmen der AD-Pathogenese ist die Phosphorylierung des Tau-Proteins in den Fokus der Forschung gerückt. Die Phosphorylierung reguliert dessen Bindung von Mikrotubuli und ist mit der krankheitsbedingten Aggregation von Tau assoziiert [67]. Der Bereich innerhalb und um die Mikrotubuli-bindende Domäne herum, der insgesamt eine positive Ladung aufweist, wird durch die Phosphorylierung von Tau neutralisiert [68]. Dies führt zur Veränderung der Struktur der Mikrotubuli-bindenden Domäne, welche in einer Ablösung des Tau-Proteins von den Mikrotubuli resultiert [67]. Das abgelöste Tau akkumuliert daraufhin in den neuronalen Zellkörpern und den Neuriten, in denen es unlösliche Filamente bildet, die sich zu gepaarten helikalen Filamenten, den sogenannten neurofibrillären

Bündeln, zusammenlagern [69]. Die neurofibrillären Bündel werden als neurotoxisch beschrieben, da sie u.a. beeinträchtigend auf die mitochondriale Funktion und damit prooxidativ wirken [70]. Zudem führt der Funktionsverlust des Tau-Proteins zu einer Dysfunktion des Cytoskeletts, die letztendlich den Zelltod zur Folge haben [71]. Als auslösender Faktor für dessen Entstehung wird die Beeinflussung von Phosphatasen und Kinasen durch A β postuliert [72]. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von A β mit der Phosphorylierung des Tau-Proteins einhergeht [73–75].

1.1.2 Zelluläre Dysfunktion/Neurotoxizität

Die für AD charakteristischen kognitiven Dysfunktionen stehen im Zusammenhang mit dem erhöhten A β -Vorkommen im Gehirn, das sich auf der vermehrten amyloidogenen APP-Prozessierung und dem verminderten A β -Abbau begründet [76]. Zu Beginn der Forschung über AD galten die A β -Ablagerung in Form von senilen Plaques als Auslöser für die AD-Pathogenese [52]. Da in einer Reihe von Untersuchungen in AD Patienten dieser postulierte Zusammenhang nicht immer bestätigt werden konnte, rückte das A β -Oligomer in den Fokus [54, 77]. Für die AD-Pathogenese wird zudem den A β -assoziierten Vorgängen in den Mitochondrien eine zentrale Bedeutung für die Degeneration der Neuronen zugesprochen [78]. Ihre Relevanz konnte schon früh durch mitochondriale morphologische Veränderungen und eine verminderte Mitochondrienanzahl in den Neuronen von AD Patienten herausgestellt werden [79, 80]. Zudem konnte in den Gehirnen von Erkrankten ein verminderter Energiestoffwechsel und eine Beeinträchtigung der Atmungskette festgestellt werden, die einen weiteren Hinweis auf die mitochondriale Schädigung geben [81, 82]. So konnte gezeigt werden, dass durch A β die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase, der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Dehydrogenase in den Mitochondrien gehemmt wird [83]. Dementsprechend wird eine verminderte ATP-Produktion beschrieben, die auf eine gestörte oxidative Phosphorylierung zurückzuführen ist und die Hypothese der A β -Toxizität auf mitochondrialer Ebene unterstützt [84, 85]. Als eine wesentliche Folge der mitochondrialen A β Akkumulation gilt die Erzeugung von oxidativem Stress, der verschiedene Auswirkungen hat [86]. So führt die Lipidperoxidation der Membranlipide zur Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials, die zusätzlich durch die Integration des A β -Peptids in die Membran verstärkt wird [87]. Die verminderte Glukose-Versorgung der Neuronen ist ebenfalls auf die Lipidperoxidation zurückzuführen, die den Glukose-Transport über die Membran hemmt [88].

Weiterhin konnte eine erhöhte Menge der oxidierten Nukleinsäure 8-Hydroxydesoxyguanosin in Gehirnen von AD Patienten festgestellt werden, die auf oxidative Schäden der

mitochondrialen und nukleären DNA hinweist [89]. Ebenfalls sind oxidative Veränderungen von Enzymen und Strukturproteinen nachweisbar, die zu deren Funktionsverlust führen [90]. Dazu zählt auch die verminderte Aktivität von antioxidativen Enzymen, wie z.B. der Superoxid-Dismutase (SOD), der Katalase und der Glutathion-Peroxidase [91, 92].

Auf zellulärer Ebene wird die Induktion einer Calcium-Dyshomöostase als ein weiterer durch A β verursachter pathologischer Mechanismus beschrieben [93]. Durch die Interaktion von A β mit dem NMDA-Rezeptor ist der Ca²⁺-Ionen-Einstrom in die Zelle erhöht [94]. Als Folge der gestörten Membranpermeabilität verliert das Mitochondrium die Eigenschaft die vermehrt einströmenden Ca²⁺-Ionen abzuf puffern [78]. Zusätzlich wird die Ionen-Homöostase und damit der transmembrane Protonengradient durch die A β -bedingte Hemmung der Na⁺/K⁺- und der Ca²⁺-ATPase gestört [95, 96]. Dies und die A β -induzierte Beeinflussung proapoptotischer Gene führt zur Freisetzung von Cytochrom C in das Cytoplasma und bedingt damit die Aktivierung von Caspasen, die letztendlich die Apoptose der Zelle einleiten [97].

1.1.3 Genetische Faktoren

Im Rahmen der AD-Pathogenese werden verschiedene genetische Risikofaktoren beschrieben, die meist zur Entstehung einer EOAD führen, welche sich charakteristischerweise vor dem 65. Lebensjahr manifestiert [98]. In diesem Zusammenhang wird häufig das Krankheitsbild des Down-Syndroms angeführt, das auf einem dritten zusätzlichen Chromosom 21 beruht und daher auch als Trisomie 21 bezeichnet wird [99]. Da auf dem Chromosom 21 das APP-Gen kodiert ist, ist eine erhöhte APP-Expression beobachtbar, die früh zu einer vermehrten A β -Bildung führt und damit mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von AD verbunden ist [100, 101].

Weiterhin konnten genetische Studien im Rahmen der AD-Erkrankung 52 pathogene Mutationen im APP-Gen identifizieren, die mit einer vermehrten Ablagerung von A β assoziiert sind [102]. Unter anderem wurden Duplikationen der APP-Sequenz detektiert, welche die Effekte einer Trisomie 21 partiell imitieren. Außerdem werden verschiedene Arten von Punktmutationen beschrieben, welche die Amyloidogenese fördern. Dazu zählen u.a. *Missense*-Mutationen, die viermal häufiger als die Verdopplung der APP Sequenz in AD Patienten nachgewiesen werden konnten [103, 104]. APP-Mutationen im proteolytischen Schnittbereich der β - und der γ -Sekretase führen zu einer insgesamt erhöhten A β -Bildung oder zu einer toxischen Verschiebung des Verhältnisses von A β ₁₋₄₀ zu A β ₁₋₄₂, verbunden mit einer erhöhten Akkumulation des toxischeren A β ₁₋₄₂ [103].

Initial wurde im Zusammenhang mit der Entstehung der familiären AD die Mutation der Gene PSEN1 und PSEN2 entdeckt, welche die Präseniline 1 und 2 kodieren und das katalytische Zentrum des γ -Sekretase-Protease-Komplexes bilden [105–107]. Am häufigsten liegt einer EOAD eine autosomal-dominante Mutation des PSEN1-Gens zugrunde [108]. Eine Mutation des auf Chromosom 14 befindlichen PSEN1-Gens bedeutet, dass der Betroffene in jedem Fall an AD erkrankt und durch den schwerwiegenden Krankheitsverlauf schon sehr früh die charakteristische Symptomatik zeigen kann [109]. Dahingegen ist die Mutation des für Präsenilin 2 kodierenden PSEN2-Gens, das auf Chromosom 1 liegt, seltener als Grund für die Entstehung einer familiären AD verantwortlich zu machen. Außerdem ist das Erkrankungsalter für AD bei PSEN2-Mutationsträgern höher als bei PSEN1-Mutationsträgern [110].

Im Zusammenhang mit der Entstehung der sporadischen LOAD werden ebenfalls genetische Risikofaktoren beschrieben. Es konnte beobachtet werden, dass bei AD-Patienten vermehrt das Apolipoprotein E (APOE) 4-Allel vorliegt [111]. Apolipoproteine vermitteln als Bestandteile von Lipoproteinen den Lipidtransport zwischen den Zellen verschiedener Organe und innerhalb von spezifischen Geweben [112]. Als Ligand für spezifische Zellmembranrezeptoren wie z.B. dem integralen LDL (*low density lipoprotein*)-Rezeptor reguliert APOE über die Bindung die Entfernung von Lipoproteinen aus dem Blutplasma [112]. Das ZNS (Zentrales Nervensystem) ist nach den Hepatozyten ein Hauptsyntheseort für APOE, in dem die Synthese überwiegend durch die Astrozyten erfolgt [113]. APOE existiert in den drei Isoformen APOE2, APOE3 und APOE4, die im Zusammenhang mit der AD-Pathogenese unterschiedliche Risikopotentiale aufweisen [113]. Während APOE3 am häufigsten vorzufinden ist und damit als die normale Form gilt, unterscheiden sich APOE2 und APOE4 von dieser durch die Substitution einer einzelnen Aminosäure an Position 112 bzw. 158 [113]. Ein vorliegendes APOE2-Allel wird als protektiv gegenüber der Entstehung von AD postuliert [114]. Dagegen ist bereits durch ein heterozygot vorhandenes APOE4 das Risiko für AD erhöht [115]. Im ZNS ist das HDL (*high density lipoprotein*) das vorherrschende Lipoprotein, das mithilfe von APOE Cholesterin und A β transportieren kann [116]. Das Vorliegen des APOE4-Allels scheint sowohl mit einer erhöhten A β -Synthese als auch mit einem verminderten Abbau von A β assoziiert zu sein [117, 118]. In Gehirnen von AD-Patienten konnte gezeigt werden, dass APOE4 mit erhöhten A β ₁₋₄₀-Spiegeln [119] und einer verstärkten A β -Oligomerisation einhergeht [116]. Diese Beobachtungen werden im Zusammenhang mit dem LRP-Rezeptor diskutiert, der u.a. die Aufnahme von A β in Verbindung mit APOE in die neuronale Zelle vermittelt [120]. Im Vergleich zu APOE3 weist APOE4 eine höhere Bindungsaffinität gegenüber dem LRP-Rezeptor auf, wodurch gebundene A β -Peptide eher in die Neuronen aufgenommen werden [121]. Zudem ist APOE4 mit

einer Beeinträchtigung von neuronalen Reparaturmechanismen und der neuronalen Plastizität assoziiert, die das Fortschreiten von degenerativen Prozessen begünstigen [122].

Im Kontext des zerebralen Lipidstoffwechsels konnte einem weiteren APOE-Rezeptor, dem neuronalen SORL1 (*sortilin-related receptor 1*), ebenfalls eine Relevanz für die AD-Pathogenese zugesprochen werden. Für SORL1 wird eine protektive Funktion postuliert, da im Rahmen einer LOAD eine verminderte Produktion des Proteins festgestellt werden konnte [123]. Es wird angenommen, dass SORL1 eine zentrale regulierende Funktion für den Transport und die Prozessierung von APP hat. SORL1 bindet APP und verhindert dadurch die Prozessierung durch zellmembranständige Enzyme [124, 125].

1.2 Ausgewählte nutritive Faktoren mit Einfluss auf die Alzheimer-Pathogenese

Im Rahmen der Erforschung nutritiver Faktoren mit Einfluss auf die AD-Pathogenese wurde Cholesterol als Risiko-steigernd und dessen Strukturhomolog Vitamin D als Risiko-senkend diskutiert [126–128]. Die unterschiedlichen Einflüsse beider Ernährungsfaktoren werden im Folgenden erörtert.

1.2.1 Cholesterol

Aus einer Vielzahl von Studien geht eine Assoziation zwischen der Hypercholesterolämie und der AD-Pathogenese hervor. Erste Zusammenhänge konnten durch epidemiologische Studien aufgezeigt werden, die durch Tierstudien bestätigt werden konnten [126, 127, 129]. Die Bluthirnschranke des Menschen ist zwar nicht permeabel für Cholesterol, aber für dessen Metabolite. Der Austausch von Oxysterolen über die Bluthirnschranke wird als ein Erklärungsansatz für den beschriebenen Zusammenhang diskutiert [130].

Im Organismus ist Cholesterol eine wichtige strukturelle Komponente der Zellmembranen, welche die Membranpermeabilität und die Membranfluidität beeinflusst. Dabei wirkt es auch an der Bildung von Mikrodomänen wie den *lipid rafts* in der Membran mit [131]. *Lipid rafts* verändern durch die Einlagerung von verschiedenen Lipidstrukturen (Steroide, Sphingolipide) stellenweise die Struktur der Lipiddoppelschicht und damit auch Signaltransduktionsprozesse [132].

Cholesterol kann entweder über die Nahrung aufgenommen oder durch den Organismus selbst synthetisiert werden [133]. Die zum großen Teil in der Leber stattfindende Eigensynthese wird durch das vorliegende Cholesterolangebot reguliert. Über eine *Feedback*-Regulation hemmt Cholesterol die HMG-CoA (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A)-Reduktase, welche das Schlüsselenzym der Cholesterol-Biosynthese darstellt [134]. Das in die Leberzelle

aufgenommene Cholesterol und das synthetisierte Cholesterol wird über Lipoproteine zu den Geweben transportiert. Plasma-Lipoproteine sind wasserlösliche Makromoleküle, die sich aus Phospholipiden, Apolipoproteinen und verschiedenen Lipiden (Triglyceriden, Cholesterol, Cholesterolestern) zusammensetzen. Die Apolipoproteine regulieren die Verstoffwechslung der Lipoproteine über die Interaktion mit Membranrezeptoren [135].

Das Gehirn ist das Organ mit dem höchsten Cholesterolgehalt im menschlichen Organismus [136]. Cholesterol ist ein Bestandteil der Myelinscheiden und der Plasmamembranen der Neuronen und der Gliazellen [137]. Zudem ist es essenziell für die Myelinisierung während der Hirnentwicklung, die Modulation des Dendriten-Auswuchses und die Synaptogenese [137, 138]. Da der Cholesterolstoffwechsel des Gehirns durch die Bluthirnschranke vom restlichen Organismus getrennt ist, erfolgt im Gehirn größtenteils eine *de novo* Synthese durch die Gliazellen [139]. Dies sind vor allem die Astrozyten, die analog zu den Hepatozyten Cholesterol synthetisieren und es zusammen mit APOE über einen ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter aus der Zelle heraus transportieren. Das an APOE gebundene Cholesterol wird anschließend von Neuronen über LDL-Rezeptoren aufgenommen [130]. In den Neuronen wird u.a. das Oxysterol 24S-Hydroxycholesterol gebildet, für das eine regulatorische Funktion in Bezug auf die durch Gliazellen vermittelte APOE-Synthese postuliert wird [140]. Das 24S-Hydroxycholesterol kann die Bluthirnschranke passieren und ermöglicht die Entfernung von überschüssigem Cholesterol aus dem Gehirn [130]. Weiterhin besteht ebenfalls ein Cholesterolaustausch zwischen dem Blut und dem Gehirn über 27-Hydroxycholesterol. Über diesen Metaboliten könnte einer Tiermodellstudie zufolge, eine Hypercholesterolämie die Gehirnfunktion beeinflussen [141].

1.2.2 Vitamin D

Aus verschiedenen Untersuchungen geht hervor, dass erniedrigte Plasmakonzentrationen von Vitamin D₃ möglicherweise mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Demenz assoziiert sind [128, 142, 143]. Vitamin D₃ ist ein Steroidhormon, das sowohl über die Nahrung aufgenommen wird als auch durch den humanen Organismus selbst synthetisiert werden kann, weshalb es gemäß Definition kein Vitamin ist [144]. In der Abbildung 1.2 ist der humane Vitamin D-Stoffwechsel sowie die durch den aktiven Vitamin D₃-Metaboliten 1,25(OH)₂ Cholecalciferol vermittelte Regulation des Calcium- und Knochenmetabolismus dargestellt.

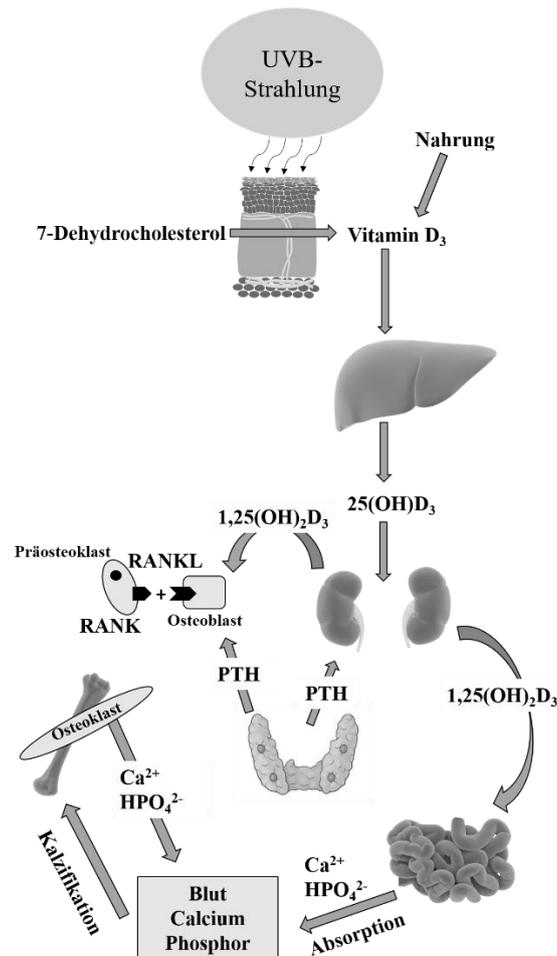


Abbildung 1.2: Stoffwechsel und Funktion von Vitamin D im humanen Organismus.

Das in der Haut vorliegende 7-Dehydrocholesterol wird durch die Einwirkung von UVB-Strahlung und durch die Körperwärme in Vitamin D₃ umgewandelt. Dieses und das durch die Nahrung aufgenommene Vitamin D₃ gelangt über den Blutkreislauf in die Leber, in der es zu 25(OH)D₃ hydroxyliert wird. Anschließend erfolgt in der Niere die weitere Hydroxylierung zum metabolisch aktiven 1,25(OH)₂D₃. Die renale 1,25(OH)₂D₃ Bildung wird u.a. durch die Phosphat-, Calcium- und Parathormon (PTH)-Spiegel im Blut beeinflusst. Zu den wichtigsten Geweben, auf die 1,25(OH)₂D₃ eine Wirkung hat, zählen die Knochen, die Nieren und das Intestinum. Im Intestinum und in der Niere wird durch 1,25(OH)₂D₃ die Aufnahme von Calcium und Phosphat gesteigert. Bei niedrigen Calciumkonzentrationen im Blut können durch PTH die Osteoblasten zur RANKL (*receptor activator of nuclear factor- κ B (ligand)*)-Sekretion veranlasst werden und durch RANKL werden anschließend die Osteoklasten aktiviert, die Calcium und Phosphat aus den Knochen freisetzen. Modifiziert nach Holick [144].

Im Rahmen der Eigensynthese findet der erste Schritt in der Haut statt, in dem durch die Einwirkung von Ultraviolett B (UVB)-Strahlung 7-Dehydrocholesterol zu Provitamin D₃ umgewandelt wird. Anschließend erfolgt mittels der Körperwärme die Umwandlung zu Vitamin D₃ (Cholecalciferol). In der Leber wird Vitamin D₃ mithilfe der 25-Hydroxylase zu 25-Hydroxy-Cholecalciferol (25(OH)D₃) hydroxyliert. Im letzten Schritt wird in der Niere durch die 1- α -Hydroxylase das metabolisch aktive 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol (1,25(OH)₂D₃) aus 25(OH)D₃ gebildet [145, 146]. Eine wichtige nutritive Vitamin D₃-Quelle sind v.a. Fettfische [146]. Der Vitamin D₃-Status der deutschen Bevölkerung wird als unzureichend eingestuft [147].

Vitamin D₃ erfüllt im menschlichen Organismus eine Reihe an Funktionen, die über zwei verschiedene Wirkmechanismen vermittelt werden. Der bekanntere Mechanismus ist die Interaktion von Vitamin D₃ mit dem nukleären Vitamin D-Rezeptor (VDR), woraus ein aktivierter Transkriptionsfaktor resultiert, der die Genexpression von Proteinen reguliert [144, 148]. Der zweite neu entdeckte Mechanismus beinhaltet die Bindung von Vitamin D₃ an den 1,25(OH)₂D₃- *membrane associated rapid response steroid-binding* (MARRS)-Rezeptor. Membran-assoziierte Rezeptoren vermitteln Vitamin D₃ assoziierte Effekte schneller als der nukleäre VDR. Dazu zählt u.a. die Aktivierung von Calcium-Kanälen und die Modulation von intrazellulären Proteinen der Signaltransduktion wie z.B. der Proteinkinase C (PKC), der *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase, den Phosphoinositid-3 (PI3)-Kinasen und der Adenylatcyclase [148, 149].

Vitamin D₃ ist essenziell für den Calcium- und Phosphatstoffwechsel. Eine konstante Calciumkonzentration im Blutplasma ist für die neuromuskuläre Funktion, die Signaltransduktion und verschiedene Stoffwechselprozesse erforderlich [146]. Für die Regulation werden als klassische Zielorgane das Intestinum, die Nieren und die Knochen beschrieben (Abbildung 1.2) [144]. Durch die Interaktion mit dem nukleären VDR werden im Dünndarm vermehrt Proteine exprimiert, welche die Calcium-Absorption aus der Nahrung steigern. Gleichzeitig erfolgt eine gesteigerte passive Absorption von Phosphat. Zusammen mit dem Parathormon steuert Vitamin D₃ die Calcium-Reabsorption in der Niere. Wenn die Absorption insgesamt nicht ausreichend ist, wird in den Osteoblasten die Expression des *receptor activator of nuclear factor-κB* Liganden (RANKL) durch das Parathormon induziert. RANKL induziert eine verstärkte Reifung der Osteoklasten, wodurch Vitamin D₃ zu einer gesteigerten Calcium- und Phosphat-Mobilisation aus dem Knochen führt [144, 150].

Neben den klassischen Zielorganen werden weitere Organe beschrieben, die sich bedingt durch das Vorhandensein eines VDRs als ein möglicher Wirkort für Vitamin D₃ herausgestellt haben. Über den VDR in der Nebenschilddrüse führt Vitamin D₃ beispielsweise zu einer Senkung der Expression des Parathormon-Gens, wobei die Parathormon-Sekretion primär durch die Calcium-Spiegel im Blutserum reguliert wird [151]. Weiterhin hat Vitamin D₃ einen Einfluss auf die Differenzierung und Funktion der Zellen des Immunsystems. Der VDR wird u.a. von Makrophagen, CD4⁺ T-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert. Dahingegen wird MARRS in allen Immunzellen exprimiert. Vitamin D₃ induziert eine gesteigerte Expression von antiinflammatorischen Cytokinen und eine Reduzierung der Bildung von pro-inflammatorischen Cytokinen [152, 153]. Durch die antiinflammatorische Wirkung wird Vitamin D₃ auch als protektiv gegenüber der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen eingestuft [153].

Zudem weist Vitamin D₃ anti-proliferative und proapoptotische Eigenschaften auf, die zusammen mit der stimulatorischen Wirkung auf Differenzierungsprozesse die Entstehung von Krebs hemmen [154]. Außerdem wird für Vitamin D₃ eine regulierende Wirkung auf die Insulinsekretion postuliert, die sich auf den nachgewiesenen VDR in pankreatischen β -Zellen zurückführen lässt. In diesem Zusammenhang wird beschrieben, dass eine geringe Vitamin D₃-Zufuhr mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung des Metabolischen Syndroms und der Typ 2 Diabetes einhergeht [155].

Im Hinblick auf die AD-Forschung wird Vitamin D₃ als neuroprotektiv diskutiert. Dies ergibt sich zum einen aus dem beobachteten Zusammenhang zwischen erniedrigten Vitamin D₃ Plasmakonzentrationen und erhöhtem Erkrankungsrisiko [156, 157]. Zum anderen konnte als ein Hinweis auf die cerebrale Aktivität Vitamin D₃ in der zerebrospinalen Flüssigkeit und der VDR sowie die 1- α -Hydroxylase auch im Gehirn nachgewiesen werden [158, 159]. In einer Tiermodellstudie konnte gezeigt werden, dass Vitamin D₃ antioxidativ gegenüber Zink-induzierten oxidativen Schädigungen im ZNS wirkt [160]. In einer weiteren *in vivo* Studie bewirkte Vitamin D₃ eine Hemmung der Bildung der induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (*inducible nitric oxide synthase*; iNOS), deren Aktivität mit Erkrankungen des ZNS assoziiert wird [161]. Darüber hinaus steigert Vitamin D₃ die Synthese von neurotrophen Faktoren wie z.B. den Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*; NGF), die während der AD im Gehirn fehlreguliert und ungleichmäßig verteilt werden [162, 163]. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass Vitamin D₃ die durch Makrophagen vermittelte Phagozytose von A β verbessert und damit dessen Abbau fördert [164].

1.3 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind regulatorische Proteine, die sich an spezifische Bereiche der DNA binden und dadurch die Bindung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase an den Kernpromotor beeinflussen [165].

Nukleäre Hormonrezeptoren sind zunächst cytosolisch vorliegende Transkriptionsfaktoren, die durch die Bindung von Liganden, wie z.B. Hormonen, aktiviert werden und dann in den Kern translozieren. Im Gehirn regulieren nukleäre Hormonrezeptoren eine Vielzahl von Prozessen, zu denen u.a. der Lipid-Stoffwechsel, die antiinflammatorische Antwort und die synaptische Funktion gehören. Aus diesem Grund wird in der Modulation der Aktivität von nukleären Hormonrezeptoren eine Möglichkeit zur Therapie der AD gesehen [166].

Die Transkriptionsfaktoren der FOXO-Familie sind an der Regulation zahlreicher Prozesse beteiligt, die mit der Langlebigkeit des humanen Organismus assoziiert sind und im Rahmen von

Alterungsprozessen eine Rolle spielen. Daher sind sie auch in Bezug auf die Entstehung der AD von Interesse [167].

1.3.1 Die nukleären Hormonrezeptoren VDR und PPAR

Nukleäre Hormonrezeptoren (NHR) sind durch Liganden induzierbare Transkriptionsfaktoren. Als Liganden fungieren kleine lipophile Moleküle wie Steroid- und Schilddrüsenhormone, Retinoide und Vitamin D [168]. Diese Liganden sind essenziell für das Wachstum, den Stoffwechsel und die Entwicklung des Organismus [169]. Insgesamt werden für den Menschen 48 Mitglieder der NHR-Superfamilie beschrieben, die aufgrund der evolutionären Entstehung in sechs Unterfamilien klassifiziert werden kann [170, 171].

Eine weitere Einteilung kann bedingt durch die DNA-Bindungscharakteristika in drei Gruppen vorgenommen werden. Die erste Gruppe bindet als Homodimer an die DNA und beinhaltet Steroidhormonrezeptoren, wie z.B. Glukokortikoid- und Östrogenrezeptoren. In der zweiten Gruppe sind Rezeptoren zusammengefasst, die mit Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) wie dem VDR oder dem *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) Heterodimere bilden. Die Rezeptoren der dritten Gruppe sind hingegen als Monomere aktiv, wie beispielsweise der *estrogen-related receptor* (ERR) [172].

Die grundlegende Struktur eines nukleären Hormonrezeptors setzt sich aus einer variierenden N-terminalen Domäne, einer hoch-konservierten zentralen DNA-bindenden Domäne (DBD) und einer funktionell komplexen C-terminalen Liganden bindenden Domäne (LBD) zusammen [173]. Die N-terminale Domäne wird auch als A/B-Domäne bezeichnet und enthält eine Liganden-unabhängige Aktivierungsfunktion (AF-1). Als modulierende Domäne des nukleären Hormonrezeptors weist sie sowohl in der Größe als auch in der Sequenz die höchste Variabilität auf und vermittelt die Promotor-spezifische und Zell-spezifische Aktivität des nukleären Hormonrezeptors. Außerdem ist sie durch die vorhandene AF-1 das Ziel für posttranslationale Modifikationen, wodurch die transkriptionelle Aktivität des nukleären Hormonrezeptors beeinflusst werden kann [169]. Über die DBD wird dem nukleären Hormonrezeptor ermöglicht, spezifische Zielsequenzen in der DNA zu erkennen und die Transkription zu beeinflussen. Die Kernstruktur der DBD besteht aus zwei Zinkfingern. Die α -Helix (P-Box) im ersten Zinkfinger vermittelt die sequenzspezifischen Interaktionen mit der DNA. Über die α -Helix (D-Box) des zweiten Zinkfingers kann sich der nukleäre Hormonrezeptor hetero- oder homodimerisieren. Weiterhin verfügt die DBD über eine variable C-terminale Verlängerung, die entweder die DNA-Bindung stabilisiert oder an den Protein-Protein Kontakten des DBD-Dimers beteiligt ist [174]. Als multi-funktionale Domäne ist die LBD neben der Bindung des Liganden für die

Vermittlung der Hetero- und Homodimerisierung des nukleären Hormonrezeptors, der Interaktion mit Hitzeschockproteinen und der Liganden-abhängigen transkriptionellen Aktivität zuständig. Die LBD ist aus 11 bis 13 konservierten α -helikalen Regionen aufgebaut, die als dreischichtiges antiparalleles Sandwich gefaltet sind. In der unteren Hälfte verborgen verfügt die LBD über eine hydrophobe Höhle, die der Bindung von Liganden dient und deren Größe vom Typ des nukleären Hormonrezeptors abhängig ist. Zusätzlich verfügt die LBD über eine AF-2, die durch die Interaktion mit Liganden ihre Konformation ändert und damit auch eine Neuordnung der α -Helices induziert, wodurch in der LBD Bindungsstellen für Co-Aktivatoren entstehen [169, 174].

Um die Transkription eines Gens zu beeinflussen, ist die Bindung des nukleären Hormonrezeptor-Komplexes an das *hormone response element* (HRE) in der DNA notwendig. Das HRE ist ein spezifisches DNA-Motiv, das entweder nah am Kernpromotor oder im Bereich des *enhancers* lokalisiert ist. Es setzt sich aus zwei *half-sites* zusammen, die jeweils hexamere Nukleotidsequenzen darstellen und die Bindung von Dimeren ermöglichen [169, 175]. Die Spezifität für die zu bindenden Dimere ergibt sich aus der variierenden Anzahl von Nukleotiden zwischen den beiden *half-sites* und durch die Sequenz der *half-sites*, die entweder palindromisch, invertiert palindromisch oder als *direct repeats* strukturiert sein kann [176].

Der VDR und der PPAR sind jeweils im Nukleus lokalisierte nukleäre Hormonrezeptoren, die sich infolge der Liganden-induzierten Aktivierung mit dem RXR heterodimerisieren [172].

Vitamin D-Rezeptor

Der VDR bindet als Liganden das Steroidhormon $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, wodurch eine Bindung des Komplexes mit dem RXR induziert wird. Dieser Komplex aus aktivem Vitamin D_3 und VDR-RXR-Heterodimer ist dazu in der Lage, die Vitamin D *responsive elements* (VDRE) in der DNA-Sequenz der Vitamin D regulierten Gene zu erkennen. Primär wird in diesem Zusammenhang die Expression von Genen reguliert, die der Aufrechterhaltung der Knochen- und Mineralstoffhomöostase dienen [177]. Dazu zählt z.B. die Induktion des intestinalen Calciumkanals TRPV6, der die Resorption von Calcium fördert [178]. Weiterhin stimuliert der Komplex die Expression der Proteine RANKL, Osteopontin und *low-density lipoprotein receptor-related protein 5* (LRP5), die an der Mineralisation des Knochens beteiligt sind [179]. Durch die vermehrte Expression von *fibroblast growth factor 23* (FGF23) nimmt der Komplex Einfluss auf die renale Phosphatreabsorption [180]. Weitere Zielgene sind mit der Karzinogenese, der Funktion des Immunsystems und dem allgemeinen Stoffwechsel assoziiert [177].

Rezeptoren der PPAR-Familie

Die PPAR-NHR-Familie umfasst die Mitglieder PPAR α , PPAR γ und PPAR β/δ , die jeweils in aktivierter Form mit dem RXR heteromerisieren, um sich an das PPAR *response element* (PPRE) der DNA binden zu können. Die PPARs unterscheiden sich untereinander durch ihre Liganden und Expressionsorte [170].

PPAR α wird hauptsächlich in der Leber exprimiert und reguliert verschiedene Gene, die für Proteine des Lipidstoffwechsels kodieren. Dazu zählen u.a. Transportproteine für Fettsäuren, Enzyme der β -Oxidation und Enzyme der Ketogenese. Als Liganden für PPAR α agieren verschiedene Fettsäuren. Durch die Veränderung von deren zellulärer Konzentration wird die Aktivität von PPAR α gesteuert, der als Sensor fungiert und eine Anpassung des Lipidstoffwechsels an die vorliegende Situation ermöglicht [181]. Dementsprechend wird PPAR α als Zielprotein der Fenofibrate genutzt, die zur Therapie von Hypertriglyceridämien und Hypercholesterolemien eingesetzt werden [182].

Auch PPAR γ ist mit dem Lipidstoffwechsel assoziiert und spielt für die Adipogenese und die Glukosehomöostase eine Rolle [183]. Die Expression findet primär im Fettgewebe statt, in dem PPAR γ als Masterregulator der Adipogenese und Fettspeicherung aktiv ist [184]. Insgesamt werden für PPAR γ vier Isoformen beschrieben, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden [185]. Als Liganden werden einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren sowie Eicosanoide postuliert [186]. Als nachgewiesener Ligand gelten die antidiabetischen Thiazolidindione (Glitazone) [187].

PPAR β/δ wird ubiquitär exprimiert und durch die Interaktion mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren sowie deren Metaboliten aktiviert [188]. PPAR β/δ ist an vielen Prozessen als Transkriptionsfaktor beteiligt, die im Rahmen der Prävention und Behandlung des Metabolischen Syndroms im Fokus stehen [189]. Die Aktivität vom PPAR β/δ wird mit erhöhten HDL-Spiegeln, einer verbesserten Insulinsensitivität und einer antiinflammatorischen Wirkung assoziiert [190].

Durch die Interaktion mit Agonisten wie Fibraten, Statinen und nichtsteroidalen Antirheumatika vermitteln PPARs neben antiinflammatorischen und metabolischen Effekten auch eine Wirkung auf den A β -Stoffwechsel. In diesem Kontext wird u.a. eine Hemmung der amyloiden APP-Prozessierung, eine Steigerung der nicht-amyloiden APP-Prozessierung sowie ein verstärkter Abbau von A β -Ablagerungen beschrieben [191–194].

1.3.2 Der FOXO Transkriptionsfaktor

Forkhead-Class O (FOXO)-Proteine sind hoch-konservierte Transkriptionsfaktoren, die aufgrund von zellulärem Stress aktiviert werden und daraufhin Proteine regulieren, welche die Stressantwort vermitteln. Die regulierten Proteine sind an der zellulären Energieproduktion, der Resistenz gegenüber oxidativem Stress, der Zellviabilität und der Proliferation beteiligt [195]. In diesem Zusammenhang wird die Aktivität von FOXO mit der Tumor-Suppression, der Regulation des Energiestoffwechsels und der Verzögerung von Alterungsprozessen assoziiert [167, 196].

Homologe FOXO-Gene werden in *Drosophila melanogaster* mit dFOXO und in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) mit *daf-16* beschrieben, die in genetischen Studien zur Untersuchung von molekularen Wirkmechanismen herangezogen wurden [197, 198]. In Säugetieren konnten vier Mitglieder der FOXO-Subfamilie identifiziert werden: FOXO1, FOXO3, FOXO4 und FOXO6. Deren Expression kann in den meisten Geweben nachgewiesen werden, wobei die Menge variiert. In der Leber und im Fettgewebe findet eine verstärkte Expression von FOXO1 statt [199, 200]. FOXO3 wird am stärksten im Herzgewebe und den Neuronen exprimiert und FOXO4 hauptsächlich im Muskelgewebe [201]. Im Gehirn ist eine hohe Expressionsrate von FOXO6 vorzufinden [202].

Alle FOXO-Transkriptionsfaktoren verfügen über eine hoch-konservierte als *forkhead box* bezeichnete DNA-Bindungsdomäne, die etwa 110 Aminosäuren umfasst und ähnlich zum Helix-Loop-Helix-Motiv gefaltet sind [203]. In der Nähe der *forkhead box* befinden sich zudem konservierte Sequenzen, die für die translozierende Bewegung zwischen dem Cytoplasma und dem Nukleus notwendig sind [204].

Die Aktivität von FOXO wird auf transkriptioneller, posttranskriptioneller und auf posttranslationaler Ebene reguliert [205]. Durch Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und Ubiquitinierung kann im Rahmen der posttranslationalen Modifikation entweder eine Hemmung oder eine Aktivierung von FOXO erfolgen, die über die Veränderung der Lokalisation, der Stabilität, der DNA-Bindung oder der Protein-Protein-Interaktionen vermittelt wird [206]. Posttranslationale Modifikationen ereignen sich im Zusammenhang mit diversen Signalwegen, die infolge von externen Stimuli reguliert werden. Hierzu zählen vor allem die durch Insulin, verschiedene Wachstumsfaktoren, oxidativen Stress und Nahrungsinhaltsstoffe aktivierten Signalwege [206].

In genetischen Studien mit *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass die FOXO-Proteine das Hauptziel des Insulin/Insulin-like growth factor (IGF)- Signalweges sind, der regulierend auf die Entwicklung, den Stoffwechsel und Langlebigkeit wirkt [207, 208]. Der IGF-Signalweg

wird durch die Bindung von Insulin oder Wachstumsfaktoren an den membrangebundenen Rezeptor mit einer intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne eingeleitet, wodurch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) rekrutiert und aktiviert wird [209]. PI3K aktiviert daraufhin verschiedene Serin/Threonin-Kinasen wie z.B. die AKT-Kinase und die *serum and glucocorticoid-induced kinase* (SGK). Durch diese Kinasen wird eine dreifache Phosphorylierung von FOXO erreicht, welche die Bindung des Chaperon-Proteins 14-3-3 ermöglicht, das FOXO aus dem Nukleus exportiert und damit dessen transkriptionelle Aktivität hemmt [210–212]. Die Insulineffekte auf den Glukosestoffwechsel werden somit zum Teil durch die Hemmung der transkriptionellen Aktivität von FOXO vermittelt. FOXO fördert in diesem Zusammenhang die Glukoneogenese durch die Induktion der Transkription der Glukose-6-Phosphatase und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und hemmt die Genexpression von Proteinen für die Verstoffwechslung von Glukose [213].

Aufgrund von oxidativem Stress erfolgt ebenfalls eine Phosphorylierung von FOXO. Unter diesen Bedingungen werden neben AKT verschiedene Kinasen der MAPK-Familie wie der *extracellular-signal regulated kinase* (ERK), p38-MAPK und *Jun-N-terminal kinase* (JNK) sowie die *mammalian Ste20-like kinase 1* (MST1) aktiv und vermitteln eine veränderte subzelluläre Lokalisation und Aktivität von FOXO [214]. Im Gegensatz zu AKT führen die durch MST1 und JNK vermittelte Phosphorylierung von FOXO4 zu dessen Aktivierung durch eine vermehrte nukleäre Lokalisation [206]. Die so regulierten Gene kodieren für antioxidativ wirksame Proteine wie z.B. die Superoxid-Dismutase oder vermitteln eine proapoptotische und antikanzerogene Wirkung zum Schutz des Organismus [195].

Infolge von oxidativem Stress wird außerdem die Acetylierung von FOXO durch die gegensätzliche Aktivität von Acetylasen und Deacetylasen reguliert. Die Histon-Acetyltransferasen *cAMP-response element-binding protein* (CBP) und p300 acetylieren sowohl FOXO, wodurch dessen Aktivität gehemmt wird, als auch die Histone, wodurch die DNA für Transkriptionsfaktoren zugänglich wird. Daher kann sich die Acetylierung von FOXO hemmend und auch fördernd auf dessen Transkriptionsaktivität auswirken, wobei vermehrt eine hemmende Wirkung beobachtet werden kann [204, 215]. Im Zusammenhang mit der Deacetylierung von FOXO ist die NAD⁺-abhängige Histon-Deacetylase *silent information regulator 1* (SIRT1) aktiv, die ein Mitglied der Sirtuin-Familie darstellt. Infolge von oxidativem Stress bildet das nukleär lokalisierte SIRT1 einen Komplex mit FOXO und katalysiert dessen Deacetylierung. Dies hat die Induktion der Transkription von Stressresistenz-Genen zur Folge [216].

1.4 Die Proteindegradation als Bestandteil der Proteostase

Die Homöostase der Proteine wird durch den Begriff der Proteostase beschrieben. Die Proteostase umfasst regulatorische Mechanismen in der Zelle, die das Gleichgewicht von funktionalen Proteinen aufrechterhalten soll. Die Elemente der Proteostase sind die Chaperon-vermittelte Proteinfaltung, die *Unfolded Protein Response* - vermittelte Stressantwort im ER und im Mitochondrium und die Proteindegradation, die durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und die Autophagie vermittelt wird [217]. Im Folgenden werden der UPS- und der Autophagie vermittelte Proteinabbau näher erläutert, da während neurodegenerativer Erkrankungen, wie der AD, eine Beeinträchtigung der Degradationsmechanismen durch Alterungsprozesse und die zunehmende Ansammlung von fehlgefalteten Proteinen beschrieben wird [218].

1.4.1 Ubiquitin-Proteasom-System

Das UPS ist im Rahmen der zellulären Proteinqualitätskontrolle aktiv und stellt einen hochkonservierten Abbaumechanismus für fehlgefaltete Proteine dar [219]. Unter physiologischen Bedingungen werden cytosolische Proteine, wie z.B. kurzlebige regulatorische Proteine, hauptsächlich durch das Proteasom abgebaut [220, 221]. Außerdem werden fehlgefaltete sowie aggregierte Proteine durch diesen Mechanismus degradiert [219]. ER-Stress, der auf fehlgefaltete Proteine dort zurückzuführen ist, resultiert in einer Aktivierung des ER-geförderten Abbaus (ERAD, *ER-assisted degradation*) der Proteine. ERAD beinhaltet den Rücktransport von fehlgefalteten Proteinen in das Cytosol, in dem die Ubiquitinierung und der Proteasom-vermittelte Abbau stattfindet [222]. Der in Abbildung 1.3 dargestellte UPS-vermittelte Proteinabbau untergliedert sich in zwei verschiedene aufeinanderfolgende Schritte. Im ersten Schritt erfolgt die kovalente Bindung von mehreren Ubiquitin-Molekülen an das abzubauenende Zielprotein. Daraufhin wird im zweiten Schritt das markierte Protein durch das 26S-Proteasom abgebaut [223].

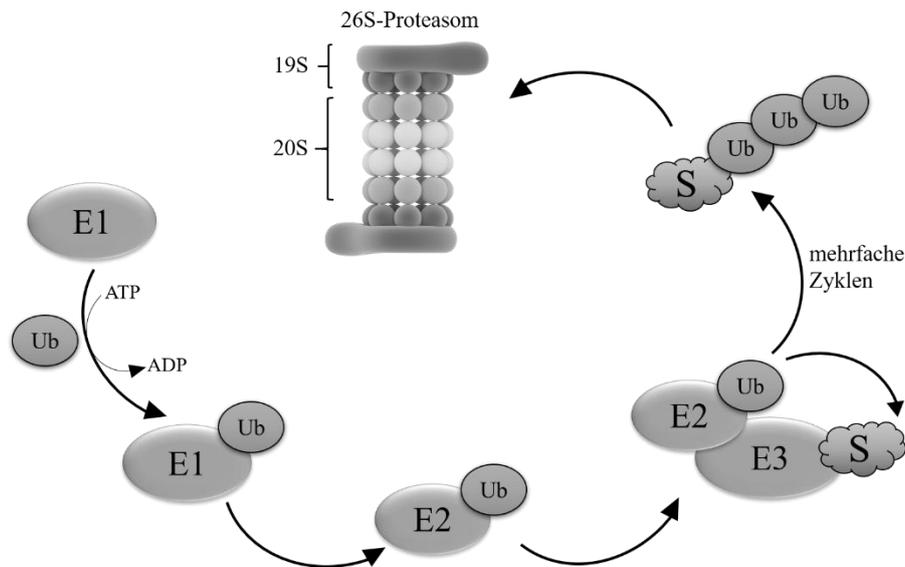


Abbildung 1.3: Der UPS-vermittelte Proteinabbau.

Der in zwei Schritten untergliederte proteasomale Abbau von fehlgefalteten Proteinen beginnt mit der Ubiquitinierung des abzubauenen Substrats (S) durch einen mehrstufigen Prozess, der durch drei verschiedene Enzyme (E) katalysiert wird. Das polyubiquitinierte Protein wird anschließend im zweiten Schritt mittels des 26S-Proteasoms abgebaut. Modifiziert nach Üstün und Börnke [224].

Das Ubiquitin-Protein setzt sich aus 76 Aminosäuren zusammen und gehört zu einer strukturell konservierten Proteinfamilie. Durch die kovalente Bindung an andere zelluläre Proteine verändert Ubiquitin deren Stabilität, Lokalisation und Aktivität [225]. Die Ubiquitin-Konjugation an die fehlgefalteten Proteine geschieht innerhalb eines dreistufigen Prozesses. Zunächst erfolgt die Aktivierung von Ubiquitin durch das Enzym E1, dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym, das sich unter ATP-Verbrauch mit einer energiereichen Thioesterbindung an dessen C-terminalen Glycinrest bindet. Dadurch ist die Übertragung an die E2-Enzyme möglich, welche die Ubiquitin-Konjugations-Proteine darstellen und das aktivierte Ubiquitin an die Ubiquitin-Protein-Ligase E3 weitergeben. E3 vermittelt die kovalente Verbindung zwischen dem C-terminalen Lysinrest des Ubiquitins und der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrests des abzubauenen Substrats. Da die Markierung des abzubauenen Substrats eine Polyubiquitinierung erfordert, kann E3 das aktivierte Ubiquitin auch auf einen Lysinrest des angehängten Ubiquitins übertragen. Die Enzyme der E3-Familie vermitteln insgesamt die Spezifität der Reaktion, da die verschiedenen Formen nur bestimmte Proteine erkennen [223, 225].

Daraufhin können die polyubiquitinierten Proteine vom 26S Proteasom erkannt und durch dieses abgebaut werden. Das 26S Proteasom ist ein hoch-konservierter Proteasekomplex in Eukaryoten, der im Cytosol in freier Form oder am ER gebunden und im Nukleus vorkommt. Dieser Komplex besteht aus einer 20S proteolytischen Untereinheit, die an den Enden von jeweils einer 19S regulatorischen Untereinheit umschlossen wird [220]. Die zentral positionierte 20S

Untereinheit weist eine zylindrische Struktur auf, in der sich die proteolytisch aktiven Seiten befinden [226]. Der Zylinder baut sich aus vier übereinanderliegenden Ringen auf, von denen die beiden äußeren Ringe α -Untereinheiten und die beiden inneren β -Untereinheiten darstellen. Jeder der beiden α - und β -Ringe setzt sich aus sieben unterschiedlichen Untereinheiten zusammen [221]. Drei der sieben β -Untereinheiten beinhalten nach innen ausgerichtete aktive Seiten mit verschiedenen enzymatischen Eigenschaften für die Peptidspaltung. Dazu gehören β 1, β 2 und β 5, die entweder Caspase-, Trypsin- oder Chymotrypsin-ähnliche proteolytische Spaltungen vornehmen [226].

Die an den Enden von 20S positionierten 19S Untereinheiten fungieren als Deckel des Komplexes, welche die markierten fehlgefalteten Proteine erkennen und für den proteasomalen Abbau entsprechend modifizieren. Nach der Abspaltung der Ubiquitinketten erfolgt unter ATP-Verbrauch die Entfaltung und Denaturierung der Proteine. Zu diesem Zweck verfügt die 19S Untereinheit über sechs verschiedene ATPasen [220, 226]. Anschließend transportiert die 19S Untereinheit die Proteine in die proteolytische 20S Untereinheit, in der der Abbau zu 3 bis 22 Aminosäuren umfassende Peptide erfolgt [220]. Die abgespaltenen Ubiquitinketten werden im Cytosol für weitere Reaktionen wiederaufbereitet [226].

Während der AD-Pathogenese legt die abnormale Anhäufung von polyubiquitinierten Proteinen eine Fehlfunktion des UPS nah. Es wurde nachgewiesen, dass das A β -Protein den proteasomalen Abbau hemmt [226]. Die direkte Interaktion des Proteasoms mit dem aggregierten Protein ist ein Grund für die Beeinträchtigung des Proteasoms. Weiterhin führt die verminderte ATP-Produktion bzw. der oxidative Stress, der auf der vermehrten A β -Bildung begründet ist, zu einer Verminderung der proteasomalen Aktivität [227].

1.4.2 Autophagie

Die Autophagie ist ein evolutionär konservierter Prozess, der eine entscheidende Rolle in der zellulären Protein-Qualitätskontrolle spielt [228]. Der Begriff „Autophagie“ leitet sich von dem altgriechischen Wort „autóphagos“ ab und bedeutet „sich selbst verzehrend“ [229]. Auf zellulärer Ebene beschreibt dies einen lysosomal vermittelten Abbauweg, der den intrazellulären Umsatz von Proteinen, Organellen und Pathogenen steuert [228]. Als ein physiologischer Prozess läuft die Autophagie permanent ab und hat eine Reinigungsfunktion in der Zelle, die in der Elimination von potenziell toxischen geschädigten Komponenten besteht [230]. Zudem wird die Autophagie als Antwort auf zellulären Stress aktiviert, um die biosynthetische Kapazität und die ATP-Spiegel in der Zelle aufrechtzuerhalten. Relevanter Stress entsteht infolge von einem Nährstoff-, Wachstumsfaktoren- und Energiedefizit, ER-Stress, oxidativem Stress und

mitochondrialen Schäden [231]. Weiterhin hat die Autophagie eine entscheidende Rolle in der Eliminierung von Pathogenen, die in die Zelle eindringen [232].

In der Abbildung 1.4 sind die drei Arten der Autophagie dargestellt: die Makroautophagie, die Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA). Die Unterschiede bestehen in der Art der lysosomalen Aufnahme des abzubauenen Substrats, der Substratwahl sowie der Regulation der Aktivierung [233]. Durch die Aufnahme in das Lysosom erfolgt ein Abbau der Substrate durch die im sauren Milieu aktiven Hydrolasen in ihre Ausgangsstoffe wie Aminosäuren und Fettsäuren [228].

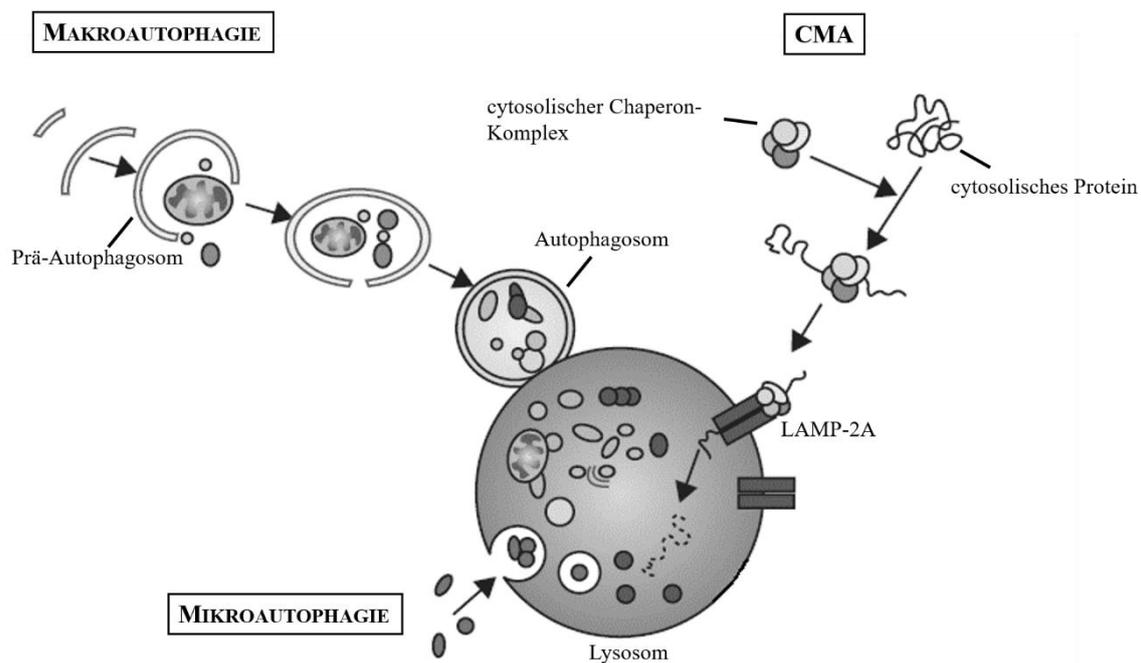


Abbildung 1.4: Die drei Arten des Autophagie-vermittelten Proteinabbaus.

Die drei Arten des Autophagie-vermittelten Proteinabbaus sind die Mikroautophagie, die Makroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA). Alle drei Arten resultieren in einer lysosomalen Aufnahme der abzubauenen Substanzen, wodurch der Abbau in die Ausgangsstoffe bewirkt wird. Modifiziert nach Martinez-Vicente und Cuervo [233].

Die Makroautophagie ist die am intensivsten erforschte Art, weshalb diese auch im Allgemeinen als Autophagie bezeichnet wird [228]. Die Induktion erfolgt infolge von Stress. Als ein zentraler Inhibitor für die Autophagie wird die Serin/Threonin Proteinkinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) beschrieben, die während einer ausreichenden Nährstoffversorgung aktiv ist. Unter Stressbedingungen wie dem Kaloriendefizit ist mTOR hingegen inaktiv und ermöglicht daher die Aktivierung der stromabwärts lokalisierten ULK (*unc-51-like kinase 1*), die an der Phagophorbildung beteiligt ist [232]. Die Bildung des Phagophors ist der initiale Schritt der Erzeugung eines Autophagosoms [231]. Dazu rekrutiert das Autophagie-assoziierte Protein (ATG) Beclin-1 die Klasse 3 PI3-Kinase VPS34, um Phosphatidylinositol-3-Phosphat

zu generieren. Durch die Aktivität des mit den zwei Ubiquitin-ähnlichen Molekülen Atg12 und die LC3-Ligase (*light chain 3*) assoziierten Konjugations-Systemen erfolgt die Elongation des Phagophors bis hin zur Schließung der Membranen. Infolge dieses Prozesses entsteht ein Autophagosom, das während seiner Bildung abzubauen Substrate umschließt. Aus der anschließenden Fusion mit einem Lysosom zu einem Autolysosom resultiert der Abbau der umschlossenen Substrate durch die enthaltenen Proteasen, Lipasen, Nukleasen und Glykosidasen. Die produzierten Aminosäuren, Lipide, Nukleoside und Kohlenhydrate stehen dann im Cytoplasma für verschiedene Synthese- und Stoffwechselwege zur Verfügung [230, 231].

Wenn das Kaloriendefizit über einen längeren Zeitraum besteht, wird zusätzlich die CMA aktiviert. Die CMA weist eine hohe Selektivität gegenüber cytosolischen Proteinen auf und ist damit ein Lieferant für Aminosäuren [233]. Die cytosolischen Chaperone erkennen spezielle Erkennungssequenzen in Proteinen, wodurch eine Bindung entsteht und ein Transport zu den Lysosomen ermöglicht wird. Die Aufnahme in das Lysosom wird über den spezifischen Rezeptor *lysosome-associated membrane protein type 2A* (LAMP-2A) in der lysosomalen Membran vermittelt [234].

Im Gegensatz zu Makroautophagie und der CMA weist die Mikroautophagie eine konstante basale Aktivität unter physiologischen Bedingungen auf. Sie dient dem selektiven Abbau von Organellen, die nicht mehr benötigt werden und ist daher am permanenten Umbau zellulärer Bestandteile beteiligt [233]. Mittels der Einstülpung der lysosomalen Membran in das Innere des Lysosoms werden abzubauen Substrate mit Teilen des Cytosols eingeschlossen und damit zur Zersetzung aufgenommen [235].

Während der AD-Pathogenese ist zu Beginn des Krankheitsverlaufs ein Anstieg der autophagosomalen Aktivität zu beobachten, die durch eine vermehrte Bildung von Lysosomen charakterisiert ist. Die zunehmend entstehenden A β -Proteinaggregate werden spezifisch mittels der Makroautophagie abgebaut, bevor sich Ablagerungen bilden können. Mit fortschreitenden Krankheitsverlauf sinkt die Effizienz der Autophagie, wodurch toxische Produkte akkumulieren und sich in der Zelle ablagern [233, 236].

1.5 Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) wurde in den 1960er Jahren von Sydney Brenner als biologischer Modellorganismus für genetische Studien entdeckt [237] und hat sich heute als ein wichtiges Forschungsmodell für die Genetik, Zellbiologie, Neurowissenschaften und Alterung etabliert [238]. *C. elegans* ist ein Fadenwurm, der als Metazoa der Klasse der *Secernentea* und der Familie der *Rhabditidae* zuzuordnen ist [239]. Der etwa 1 mm lange, im

Erdreich freilebende Nematode ist weltweit in hauptsächlich feucht gemäßigten Gebieten verbreitet [240]. Grundlegend ernährt sich *C. elegans* von Bakterien, die sich in verrottenden Pflanzenmaterial wie Früchten befinden [241]. Unter Laborbedingungen wird das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) als Nahrungsquelle eingesetzt [238].

Die Eignung von *C. elegans* als Modellorganismus ist auf einer Vielzahl von Eigenschaften des Nematoden begründet. Als ein selbstfertilisierender Hermaphrodit, der aus 959 somatischen Zellen besteht, erzeugt *C. elegans* eine homozygote Nachkommenschaft, in der eingebrachte Mutationen aufrechterhalten werden. Genetische Veränderungen können durch die Kreuzung mit Männchen, die mit einer Häufigkeit von 0,1-0,2 % in einer Population vorkommen, vorgenommen werden. Die kleineren, dünneren Männchen bauen sich aus 1031 somatischen Zellen auf und besitzen einen fächerförmigen Schwanz [242]. Die vorliegende Eutelie und der einfache, aber dennoch differenzierte Aufbau in unterschiedliche Gewebe, wie Muskeln, Nerven und Intestinalzellen, ermöglichen die Untersuchung von biologischen Prozessen in einem Organismus [238, 243]. Durch die transparente Kutikula, die über alle Entwicklungsstufen vorhanden ist, können zudem Vorgänge, wie z.B. die Mitose und die Apoptose, im lebenden Nematoden in Echtzeit beobachtet werden. Zusätzlich ist es möglich, durch das Einbringen von fluoreszierenden Reportergenen oder die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen Zellen im Organismus zu markieren und so zu lokalisieren [242].

Die Kultivierung von *C. elegans* ist sehr einfach und kostengünstig. Diese kann entweder auf NGM-OP50-Agarplatten oder in einem Flüssigmedium stattfinden [244]. Der Nematode weist eine kurze Generationszeit und eine hohe Nachkommenschaft auf, weshalb ein hoher Versuchsdurchsatz realisierbar ist [242]. Eine weitere Besonderheit ist die Lagerfähigkeit der Nematoden bei -80°C [244].

Das Genom von *C. elegans* wurde 1998 vollständig sequenziert, wodurch homologe Sequenzen für eine Vielzahl von menschlichen Genen, die mit der Entstehung verschiedener Erkrankungen assoziiert werden, detektiert werden konnten [242, 245]. Hinsichtlich der Erforschung der Genfunktion und deren Bedeutung für biologische Prozesse gibt es, neben der Möglichkeit, Gene im Organismus zu verändern, die Möglichkeit der posttranskriptionellen Hemmung der Genexpression mittels der RNA-Interferenz (RNAi) [246].

1.5.1 Anatomie und Physiologie

Als ein Vertreter der Fadenwürmer hat *C. elegans* eine unsegmentierte zylindrische Körperform, die sich zu den Enden hin verjüngt (Abbildung 1.5). Grundlegend ist der Nematode anatomisch aus einer inneren und einer äußeren Röhre aufgebaut, die durch den

pseudocoelomischen Raum getrennt werden. Die äußere Röhre bildet zusammen mit der Kutikula, der Hypodermis, dem exkretorischen System, den Neuronen und den Muskeln die Körperwand. Die innere Röhre umfasst den Pharynx, das Intestinum und, bei einem adulten Tier, die Gonaden. Die Gewebe unterliegen einem inneren hydrostatischen Druck, der durch ein osmoregulatorisches System reguliert wird [238].

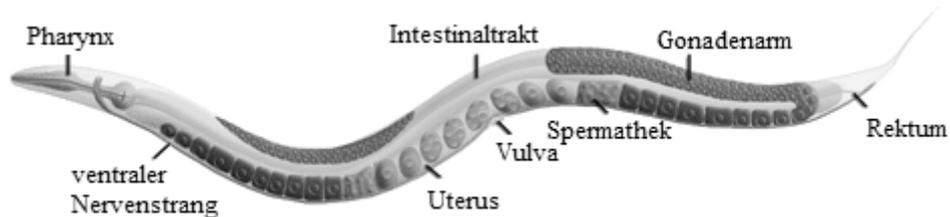


Abbildung 1.5: Anatomie des adulten *C. elegans*-Hermaphroditen.

Längsschnitt eines adulten *C. elegans* Hermaphroditen. Modifiziert nach Altun & Hall, WormAtlas [238].

Die Körperoberfläche des Nematoden besteht aus einer kollagenhaltigen Kutikula, die von dem darunterliegenden Epithelium gebildet wird. Die Öffnungen für die exkretorische Pore, die Vulva, den Anus und den Pharynx werden durch interfasziale Zellen ausgekleidet. Die Kutikula ist robust und flexibel zugleich, um den Nematoden vor äußeren Umwelteinflüssen zu schützen, die Körperform aufrechtzuerhalten und als ein äußerliches Skelett die Motilität zu ermöglichen [247]. Auf der Kutikula befinden sich Sensillen, welche die Sinnesorgane darstellen und als Mechano- und Chemorezeptoren fungieren [248].

Der adulte *C. elegans* Hermaphrodit besitzt 302 Neuronen, von denen 282 zum großen somatischen Nervensystem und 20 zum kleinen pharyngealen Nervensystem zählen. Die beiden Nervensysteme unterscheiden sich in ihrer räumlichen Struktur. Die Neuronen des somatischen Nervensystems befinden sich zwischen der Hypodermis und den Körperwandmuskeln und sind durch die gemeinsame Anordnung mit der Hypodermis in einer Basallamina von den Muskeln isoliert. Innerhalb des pharyngealen Nervensystems sind die Neuronen hingegen nicht isoliert und liegen auf den Zielmuskeln auf [248]. Grundsätzlich sind die Neuronen als Ganglien im Kopf- und Schwanzbereich organisiert, wobei die Mehrzahl der Neuronen im Kopfbereich um den Pharynx lokalisiert sind. Entlang des Nematodenkörpers sind die Neuronen angrenzend an die ventrale Hypodermis in einer zusammenhängenden Reihe angeordnet. Zudem befinden sich an den Seiten zwei kleinere Ganglien, sowie unregelmäßig verteilte Neuronen. Die Reizweiterleitung findet entweder über den dorsalen oder den ventralen

Nervenstrang statt und mündet in den im Kopf befindlichen Nervenring, der den zentralen Nervenknoten des Nematoden darstellt [238].

Die Innervation der Muskelzellen erfolgt durch 113 Motoneuronen, die sowohl die Kriech- und Schwimmbewegungen des Nematoden als auch die Motilität des Verdauungstraktes und des reproduktiven Systems kontrollieren [248]. Entlang der gesamten Körperlänge erstreckt sich die als somatisches Muskelsystem bezeichnete quergestreifte Körperwandmuskulatur, die sich in zwei dorsale und zwei ventrale Quadranten aufteilt [238]. Die charakteristische wellenförmige Bewegung des Nematoden wird durch die Neuronen des ventralen Nervenstrangs reguliert, welche die abwechselnde Kontraktion der dorsalen und ventralen longitudinalen Muskelreihen bestimmen [248]. Kleinere, nicht gestreifte Muskelpartien befinden sich im Bereich des Pharynx, um die Vulva, das Intestinum und das Rektum [238].

Die Nahrungsaufnahme erfolgt bei *C. elegans* über den Pharynx, eine röhrenartige muskuläre Pumpe, die in zwei Bulbi aufgeteilt ist [249]. Der Pharynx stellt aufgrund des eigenen Nervensystems, der eigenen Muskeln und dem eigenen Epithel ein fast autonomes Organ dar. Zudem besitzt der Pharynx eine eigene Basallamina, durch die er von der äußeren Röhre und dem Pseudocoelom separiert ist [238]. Im terminalen Bulbus befindet sich der *grinder*, eine spezialisierte Kutikula, die durch drei paarig angeordnete Muskelzellen geformt wird. Daher besitzt der *grinder* drei Kontaktflächen, die bei Muskelkontraktion rotieren. Die daraus resultierende Verzahnung führt zum Aufschluss der Nahrung und reguliert zusammen mit der pharyngealen Klappe die durchgehende Weiterführung der Nahrung in das Intestinum [249]. Das Lumen des Pharynx geht unmittelbar in das des Intestins über. Das Intestinum besteht aus 20 epithelialen Zellen, die eine Röhre um das zentrale Lumen formen und Verdauungsenzyme in jenes sezernieren. Die apikalen Oberflächen der intestinalen Zellen beherbergen zahlreiche Mikrovilli, die einen Bürstensaum bilden [238]. In *C. elegans* ist das Intestinum ein großes Organ mit zahlreichen Aufgaben. Neben der Verdauung und der Nährstoffaufnahme ist das Intestinum für die Bildung und Speicherung von Makromolekülen wie Fetten, die Einleitung der Immunantwort infolge von Pathogenkontakt und die Versorgung der Keimzellen verantwortlich [250]. Die intestinalen Zellen sind sehr groß und beinhalten einen großen Zellkern, eine erhöhte Dichte an Mitochondrien und Ribosomen, ein ausgedehntes raues ER und eine umfangreiche Sammlung an membrangebundenen Vesikeln und Vakuolen. Zudem scheint das Intestinum ein großes Speicherorgan zu sein, da in den Zellen eine erhöhte Anzahl an verschiedenen Speichergranula enthalten sind, die ihre Größe, Form und Anzahl während der Entwicklung anpassen können

[250]. Die metabolische und Verdauungsaktivität des Intestinums hat insgesamt eine zentrale Bedeutung für das Wachstum und die Entwicklung des Nematoden [250]. Die Ausscheidung des Darminhalts erfolgt über eine rektale Klappe, welche den Darm mit dem Rektum und dem Anus verbindet. Die vier an der Defäkation beteiligten enteralen Muskeln sind um das Rektum und das posteriore Intestinum herum lokalisiert [238].

Das Reproduktionssystem von *C. elegans* besteht aus den somatischen Gonaden, der Keimbahn und dem Eilegeapparat. Die beiden symmetrischen, U-förmigen Gonadenarme sind über die Spermathek mit dem zentralen Uterus verbunden [238]. Innerhalb der distalen Gonadenarme, welche die Ovarien des Nematoden sind, liegt die Keimbahn, die eine Ansammlung von Keimbahnzellkernen um einen zentralen zytoplasmatischen Kern darstellt [238]. Die Keimbahn des Hermaphroditen produziert sowohl männliche (Spermien) als auch weibliche Gameten (Oocyten). Während die Oocyten über die gesamte adulte Lebenszeit gebildet werden, findet die Bildung der Spermien nur im L4-Stadium statt, um im jungen Erwachsenenalter des Nematoden die Oocyten zu befruchten [251]. Entlang der Keimbahn wachsen und reifen die Oocyten bis diese mit den Spermien aus der Spermathek befruchtet werden. Die daraus resultierenden diploiden Zygoten werden im Uterus aufbewahrt und über die Vulva in der Umgebung abgelegt [238].

Ähnlich wie bei anderen Nematoden umfasst der Lebenszyklus von *C. elegans* insgesamt sechs Entwicklungsstadien; das Embryonalstadium, die vier Larvenstadien und das adulte Stadium. Am Ende von jedem Larvenstadium vollzieht der Nematode eine Häutung, bei der die alte Kutikula abgestoßen und eine entwicklungspezifische Kutikula gebildet wird. Während dieser Zeit wird die pharyngeale Pumpaktivität eingestellt und der Nematode verfällt in eine kurze Trägheit [238]. In Abbildung 1.6 ist der Lebenszyklus veranschaulicht.

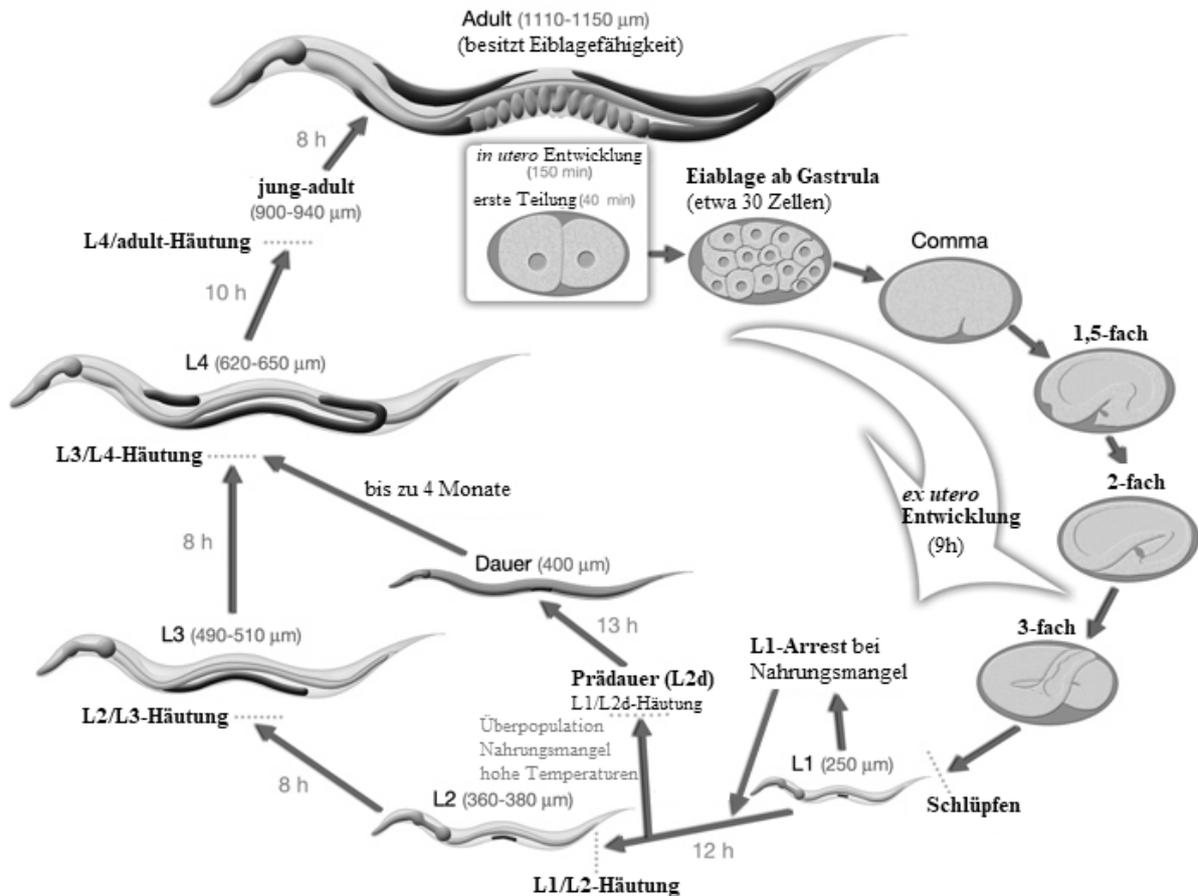


Abbildung 1.6: Lebenszyklus des *C. elegans* Hermaphroditen bei 22°C.

Zu Beginn des Zyklus erfolgte die Befruchtung. Die Stundenangabe an den Pfeilen gibt die Verweildauer des Nematoden in der jeweiligen Entwicklungsstufe an. Die erste Zellteilung erfolgt nach 40 min, die Eiablage 150 min nach der Befruchtung und in der Gastrula-Phase. Die Größe des Nematoden im jeweiligen Stadium ist in Klammern hinter dem Entwicklungsstadium in μm angegeben. Modifiziert nach Altun & Hall, WormAtlas [238].

Die Embryogenese beginnt nach der Befruchtung *in utero* und untergliedert sich in zwei Phasen: die Proliferationsphase und die Phase der Organogenese bzw. der Morphogenese. Die Proliferationsphase, die sich über die ersten 330-350 min erstreckt, beschreibt die Zellteilungen von einer Zelle bis hin zu etwa 550 undifferenzierten Zellen. Der erste Teil dieser Phase, die etwa 150 min andauert und intrauterin stattfindet, umfasst den Zeitraum von der Entstehung der Zygote bis hin zum 30 Zellen-Stadium. Im anschließenden zweiten Teil der Phase, die durch viele Zellteilungen und der Gastrulation bis zum Beginn der Organogenese gekennzeichnet ist, erfolgt die Ablage des Eies im 30 Zellen-Stadium. Am Ende der Proliferationsphase ist der Embryo sphäroidisch aus Zellen aufgebaut, welche die drei Keimblätter bilden: das Ektoderm, das Mesoderm und das Entoderm. Aus dem Ektoderm entsteht die Hypodermis und die Neuronen, das Mesoderm bildet die Grundlage für die Entstehung von den Muskeln und dem Pharynx und aus dem Entoderm wird die Keimbahn und das Intestinum gebildet. In der Phase der Organogenese finden die terminalen Zelldifferenzierungen statt und der Embryo verlängert sich um

das Dreifache, wodurch er die Form eines vollständig entwickelten Tieres mit differenzierten Organen und Geweben annimmt. Im späten 1,5-fach Stadium kann sich der Nematode innerhalb des Eies in einer koordinierten Weise bewegen und zeigt damit die fortgeschrittene Entwicklung des Bewegungsapparates. Etwa 760 min nach der ersten Zellteilung zeigt der Embryo pharyngeale Pumpaktivität und schlüpft letztendlich nach 800 min. Am Ende der Embryogenese ist der grundlegende Körperbau des Nematoden festgelegt und verändert sich nicht während der postembryonalen Entwicklung [238].

Nach dem Schlüpfen wird die postembryonale Entwicklung durch die Verfügbarkeit von Nahrung beeinflusst. Wenn Nahrung vorhanden ist, setzt sich die weitere Entwicklung drei Stunden nach dem Schlüpfen fort. Im Fall von fehlender Nahrung verbleiben die geschlüpften Larven im L1-Stadium, in welchem die Larven etwa 6-10 Tage ohne Nahrung überlebensfähig sind. Um das adulte Stadium zu erreichen, durchläuft der Nematode insgesamt vier Larvenstadien, deren Übergänge durch Häutungen gekennzeichnet sind. Infolge von ungünstigen Umweltbedingungen, wie z.B. einer zu hohen Populationsdichte, einem Nahrungsmangel oder einer zu hohen Temperatur, kann der Nematode am Ende des L2-Stadiums statt in das L3-Stadium in ein sogenanntes Dauer-Stadium übergehen. Der Nematode altert in diesem Stadium nicht, so dass die darauffolgende Lebensdauer im adulten Stadium nicht beeinflusst wird. Zudem hat die Dauer-Larve ihre Nahrungsaufnahme eingestellt und weist ein deutlich vermindertes Bewegungsverhalten auf. Das Dauer-Stadium wird durch verbesserte Entwicklungsbedingungen, wie z.B. bei Nahrungsverfügbarkeit, beendet. Es erfolgt nach einer Häutung der direkte Übergang in das L4-Stadium [238].

Bei einer Temperatur von 22°C bis 25°C ist nach etwa 45 bis 50 Stunden nach dem Schlüpfen der jung-adulte Hermaphrodit vollständig entwickelt und beendet seinen dreitägigen Reproduktionszyklus. Der Hermaphrodit legt seine ersten Eier ab, wobei in den darauffolgenden vier Tagen noch weitere Oocyten gebildet werden. Anschließend lebt der Nematode noch weitere 10 bis 15 Tage. Ein selbstfertilisierender Nematode kann etwa 300 Nachkommen erzeugen, bedingt durch die begrenzte Menge an Spermien. Durch die Paarung mit einem Männchen kann die Nachkommenschaft auf etwa 1200 bis 1400 erhöht werden [238].

1.5.2 Das Alzheimermodell CL2006

Aufgrund einer Vielzahl von Gründen ist *C. elegans* als Modellorganismus für neurodegenerative Erkrankungen wie AD geeignet. Neben seiner schnellen Alterung besitzt *C. elegans* Homologien zu AD-relevanten Genen [252]. Die Hauptkomponente der senilen Plaques, das A β -Peptid, ist ein Spaltprodukt des APP, dessen Homolog in *C. elegans* durch *apl-1* (*amyloid*

precursor-like) kodiert wird. APL-1 gehört zu der Klasse APP-verwandter Gene, die allerdings nicht die Sequenz für A β enthalten [253]. *C. elegans* ist daher dazu geeignet, die nicht toxische, physiologische Funktion von APP zu untersuchen, die noch nicht hinreichend geklärt ist. Im Nematoden wird *apl-1* in den meisten Geweben exprimiert und ist an einer Reihe von lebenswichtigen Prozessen wie z.B. der Morphogenese und der Häutung beteiligt [254]. Des Weiteren besitzt *C. elegans* zwei α -Sekretase Proteine, die durch *sup-17* (*suppressor*) und *adm-4* (*ADAM (disintegrin plus metalloprotease) family*) kodiert werden [255]. Auch der γ -Sekretase-Komplex ist mit seinen Komponenten in *C. elegans* vertreten. Beispielsweise werden die Homologe der beiden Präseniline im Nematoden durch die Gene *sel-12* (*suppressor/enhancer of lin-12*) und *hop-1* (*homolog of presenilin*) kodiert [256]. Dahingegen gibt es in *C. elegans* kein Homolog für die β -Sekretase, die essenziell für die Bildung von A β ist [257]. Aus diesem Grund erfolgte im Rahmen der Alzheimerforschung die Herstellung einer Reihe von *C. elegans* Mutanten, die Mutationen in den AD-relevanten Genen aufweisen [256]. Da diese aber nicht das für AD kennzeichnende A β bilden und somit keine Rückschlüsse auf dessen Bedeutung für die AD-Pathogenese erlauben, wurden verschiedene transgene *C. elegans* Stämme hergestellt, die humanes A β exprimieren. Dem in dieser Arbeit verwendeten transgenen *C. elegans* Stamm CL2006 (*dvIs2 [pCL12(unc-54/human Abeta peptide 1-42 minigene) + pRF4]*) wurde das humane A β_{1-42} Minigen unter der Kontrolle des muskelspezifischen Promotors *unc-54* (*uncoordinated*) in das Genom integriert [258]. Untersuchungen haben ergeben, dass im adulten Stadium nicht A β_{1-42} sondern das gekürzte A β_{3-42} exprimiert wird [259]. Im Vergleich zu A β_{1-42} aggregiert das Fibrillen formende A β_{3-42} schneller und fördert zudem dessen Aggregation stärker [259]. Die progressive Ablagerung von A β führt zu vielfältigen Schäden an den Muskelzellen [258], die neben den Organellen und auch die neuromuskuläre Signalübertragung betreffen [260]. Daher ist für diesen Nematodenstamm die fortschreitende Paralyse kennzeichnend [258]. Paralyisierte Nematoden zeigen infolge eines Berührungszweizes statt einer vollständigen Bewegung nur die Bewegung des Kopfes und sind somit nicht mehr dazu in der Lage, sich zielgerichtet fortzubewegen [261].

1.5.3 Der Insulin/IGF-Signalweg in *C. elegans*

Im humanen Organismus reguliert der Insulin/IGF-Signalweg die Genexpression und die Aktivität von verschiedenen Stoffwechsellzymen als Antwort auf die Interaktion mit Insulin oder Wachstumsfaktoren [262]. In *C. elegans* ist der verwandte Signalweg ebenfalls mit der Regulation des Stoffwechsels sowie der Entwicklung und der Langlebigkeit assoziiert [263]. Genetisch betrachtet ist das durch *daf-2* kodierte Protein homolog zum humanen Insulin/IGF-

Rezeptor [264]. Als einziger Insulin/IGF-Rezeptor in *C. elegans* bindet DAF-2 einen Insulin-ähnlichen Liganden und induziert damit eine Phosphorylierungskaskade (Abbildung 1.7) [265]. Aus der Ligandenbindung an DAF-2 resultiert zunächst die Aktivierung des stromabwärts lokalisierten AGE-1 (*AGEing alteration*), das ein Homolog zu den katalytischen Untereinheiten der humanen PI3K darstellt [266]. AGE-1 vermittelt daraufhin die Phosphorylierung von verschiedenen Kinasen wie z.B. AKT-1 (*AKT kinase family*), die dadurch aktiviert werden [267]. Letztendlich phosphoryliert AKT-1 den Transkriptionsfaktor DAF-16, der das humane FOXO Homolog und das regulatorische Hauptziel des Insulin/IGF-Signalweges in *C. elegans* darstellt (Abbildung 1.7) [208]. Die daraus resultierende Hemmung führt zum Verbleib des Transkriptionsfaktors im Cytoplasma. Ein gehemmter Insulin/IGF-Signalweg ist hingegen mit der Dephosphorylierung von DAF-16 assoziiert, die zu dessen Translokation in den Zellkern führt und die Transkription von Genen der Stressresistenz und der Langlebigkeit veranlasst [268]. Weiterhin wird DAF-16 als ein Schlüsselregulator für die Dauer-Diapause, die Fettspeicherung, die Fertilität und den Stoffwechsel beschrieben [198, 269].

Des Weiteren wird postuliert, dass die Aktivität von DAF-16 von der Aktivität des Steroid-Signalweges mitbestimmt wird. Demnach vermittelt der ligandengebundene DAF-12 Hormonrezeptor eine Hemmung der DAF-16 Aktivität (Abbildung 1.7) [270, 271].

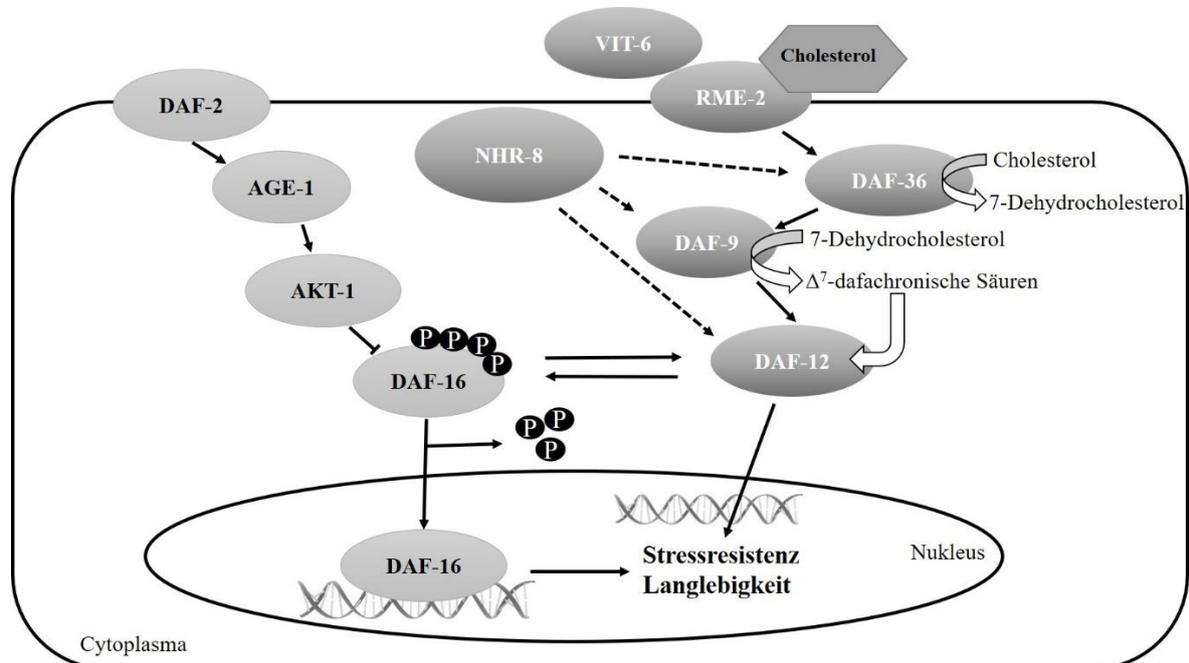


Abbildung 1.7: Die Aktivität des Steroid-Signalwegs hat Einfluss auf die DAF-16-Lokalisation in *C. elegans*. Der linke Pfad repräsentiert den Insulin/IGF-Signalweg, dessen Wirkung durch die Aktivität von DAF-2 vermittelt wird. Die Aktivierung von DAF-2 resultiert letztlich in der Phosphorylierung von DAF-16 und der Retention des Transkriptionsfaktors im Cytosol. Der rechte Pfad stellt den Steroid-Signalweg dar, der die Synthese von Liganden für den nukleären Hormonrezeptor DAF-12 vermittelt. Das aufgenommene Cholesterol wird zunächst durch DAF-36 zu 7-Dehydrocholesterol und anschließend durch DAF-9 weiter zu dafachronischen Säuren oxidiert, die als Liganden an DAF-12 binden. Die Liganden-gebundene Form stellt die aktive Form von DAF-12 dar, die in den Zellkern transloziert, um Gene der Stressresistenz und der Langlebigkeit zu transkribieren. Gleichzeitig hemmt

diese Form die Aktivität von DAF-16, wohingegen das Liganden-freie DAF-12 im Cytoplasma verbleibt und zur Dephosphorylierung von DAF-16 beiträgt. Das dephosphorylierte DAF-16 geht in den Zellkern über und kann dort die Expression von Stressresistenz-Genen induzieren.

1.5.4 Nukleäre Hormonrezeptoren des Steroid-Signalweges in *C. elegans*

Als strukturelles Element von Zellmembranen und als Grundlage für die Synthese von Steroidhormonen ist Cholesterol essenziell für die Entwicklung und die Lebensfähigkeit von *C. elegans*. Im Unterschied zu Säugetieren besitzt *C. elegans* nicht die Fähigkeit, Cholesterol selbst zu synthetisieren und ist daher als ein Cholesterol-auxotropher Organismus auf eine alimentäre Versorgung mit Cholesterol angewiesen [272]. In *C. elegans* wird Cholesterol innerhalb des Steroid-Signalweges zu Liganden für den nukleären Hormonrezeptor DAF-12 verstoffwechselt, der die reproduktive Entwicklung, den Übergang in das Dauerstadium und die Lebensspanne reguliert [273]. Der Cholesterol-Transport findet in *C. elegans* über Vitellogenine statt. Als ein Bestandteil von Eidotterproteinen werden Vitellogenine in allen eierlegenden Tieren gebildet und dienen der Versorgung der wachsenden Embryonen [274]. Die im Intestinum synthetisierten Vitellogenine werden in *C. elegans* durch insgesamt sechs Gene kodiert [275, 276]. Aus evolutionärer Sicht weisen Vitellogenine und das humane ApoB-100 strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten auf [277]. Für die Aufnahme der Vitellogenine in die Zelle erfolgt eine Verbindung mit dem RME-2 (*receptor-mediated endocytosis*) Rezeptor, der zur LDL-Rezeptorfamilie zählt [278]. In der Zelle wird das freigesetzte Cholesterol im ersten Schritt des Steroid-Signalweges zunächst durch die Rieske-ähnliche Oxygenase DAF-36 zu 7-Dehydrocholesterol oxidiert [279]. Anschließend erfolgt die Oxidation von 7-Dehydrocholesterol an C-26 durch das Cytochrom P450 abhängige Enzym DAF-9. DAF-9 ist ein funktionelles Ortholog des humanen CYP27, einer Sterol-27-Hydroxylase, die an der Gallensäuresynthese beteiligt ist. Die durch DAF-9 generierten Oxidationsprodukte sind Δ^4 - und Δ^7 -dafachronische Säuren, welche die Liganden für DAF-12 bilden [273]. DAF-12 ist ein nukleärer Hormonrezeptor, der eng mit dem Vitamin D-Rezeptor verwandt ist [280]. Infolge der Bindung von dafachronischen Säuren tritt DAF-12 in den Nukleus über, in welchem er als Transkriptionsfaktor aktiv wird. Dadurch erfolgt die Regulation von Genen der Stressresistenz oder der Entwicklung, zu denen die der Dauer-Diapause, der reproduktiven Entwicklung und der Langlebigkeit des adulten Tieres zählen [273, 281, 282].

Als regulierend für die Funktion des Steroid-Signalweges und der Cholesterol-Homöostase hat sich der nukleäre Hormonrezeptor NHR-8 erwiesen. NHR-8 ist das Homolog des humanen LXR-Rezeptors, der in der Aufrechterhaltung der Cholesterol- und Gallensäure-Homöostase sowie im Fettsäurestoffwechsel eine Rolle spielt. In *C. elegans* beeinflusst NHR-8 u.a. die

Expression von *daf-36* und damit auch die Bildung der dafachronischen Säuren und die Aktivität von DAF-12 [283].

1.5.5 Die nukleäre Hormonrezeptorfamilie der PPARs in *C. elegans*

Wie bereits in 1.5.4 beschrieben sind DAF-12 und NHR-8 zwei Vertreter der nukleären Hormonrezeptor-Familie, die mit dem Cholesterol-Metabolismus und der Ausprägung der Lebensspanne assoziiert sind [283, 284]. Im Genom von *C. elegans* konnten insgesamt 284 nukleäre Hormonrezeptoren identifiziert werden, von denen etwa 20 auf genetischer Ebene analysiert sind, die Homologien in anderen Organismen vorweisen. In *C. elegans* ist die Aktivität der nukleären Hormonrezeptoren u.a. mit der Regulation der Entwicklung, der Diapause und der Lebensspanne sowie der Beeinflussung des Fett- und des Fremdstoffwechsels assoziiert [284].

Die meisten nukleären Hormonrezeptoren in *C. elegans* gehören der HNF4 (*hepatocyte nuclear factor 4*)-Rezeptorfamilie an [285]. NHR-49 ist ein HNF-4 ähnlicher Rezeptor, dessen regulatorische Aktivität der von Vertretern der PPAR-Rezeptorfamilie ähnelt [286]. Als Antwort auf die Versorgung mit Nährstoffen wird durch NHR-49 die Expression von Genen des Fettstoffwechsels reguliert, die sich wiederum als einflussnehmend auf die Ausprägung der Lebensspanne erwiesen haben [286, 287]. In NHR-49-Mutanten wurde u.a. die Hemmung der Fettsäuren- β -Oxidation und der Fettsäuren-Desaturierung festgestellt [286]. Weiterhin wird für NHR-49 eine Beteiligung an der oxidativen Stressresistenz in *C. elegans* beschrieben [288]. Zudem konnten als Bindungspartner für NHR-49 die nukleären Hormonrezeptoren NHR-66 und NHR-80 identifiziert werden, durch deren Bindung die Expression von NHR-49-Zielgenen modifiziert werden kann. Die Interaktion zwischen NHR-49 und NHR-66 resultiert in einer Hemmung des Sphingolipidstoffwechsels in *C. elegans*, wohingegen die Bindung von NHR-80 an NHR-49 zur Aktivierung von Genen führt, die mit der Fettsäuren-Desaturierung assoziiert sind [289].

1.5.6 UPS- und Autophagie-vermittelter Proteinabbau in *C. elegans*

Die Aktivität der UPS-vermittelten Proteindegradation kann auch in *C. elegans* nachvollzogen werden, da es sich um einen evolutionär konservierten Abbaumechanismus handelt [290]. Im Genom von *C. elegans* wurden die zwei Homologe, *ubq-1* (UBiQuitin) und *ubq-2*, für Ubiquitin detektiert [291]. Die dominante Spleißform von *ubq-1* kodiert ein 838 Aminosäuren umfassendes Peptid, das 11 Tandem-Ubiquitin-Sequenzen enthält und posttranslational durch Ubiquitinhydrolasen in verschiedene Ubiquitin Peptide gespalten wird [292, 293]. Das durch *ubq-2*

kodierte Protein ist ein ribosomales Fusionsprotein, das nach der Spaltung ein funktionelles Ubiquitin freisetzt [294, 295]. Die durch die RNAi vermittelte verminderte Expression von *ubq-1* und *ubq-2* führen jeweils zu einem Zellarrest während der meiotischen Teilungen, die zu einem Absterben von Larven führen [296, 297]. Für den ersten Schritt des proteasomalen Proteinabbaus, der die Ubiquitinierung des abzubauenen Substrats umfasst, wurden in *C. elegans* ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym, 20 vermeintliche Ubiquitin-konjugierende Enzyme und hunderte potentielle Ubiquitin-Ligasen als notwendige Enzyme identifiziert [298]. Wenn die Aktivität des einzigen Ubiquitin-aktivierenden Enzyms UBA-1 (*UBA (human ubiquitin) related*) durch eine RNAi gehemmt wird, ist ein embryonaler Entwicklungsstopp die Folge, der sich auf der Hemmung des proteasomalen Abbaus begründet [298].

Das 26S Proteasom, das den Abbau Ubiquitin-markierter Substrate vermittelt, setzt sich aus einer zentralen proteolytisch-aktiven 20S Untereinheit und zwei regulatorischen 19S Untereinheiten zusammen (Kapitel 1.4.1). In *C. elegans* liegen 14 konservierte Untereinheiten vor, die dem 20S Kernkomplex zuzuordnen sind. Die 19S Untereinheit ist mit 18 konservierten Proteinen vertreten [299]. Die RNAi vermittelte Hemmung der Proteasom-Komponenten während der Larvenentwicklung wirkt sich letal aus, wohingegen in adulten Tieren die Entwicklung der Nachkommenschaft beeinträchtigt ist [296, 300]. Die zusätzliche Aktivierung des 26S Proteasoms resultiert hingegen in einer Erweiterung der Lebensspanne und vermittelt eine gesteigerte Resistenz gegenüber oxidativem Stress [301].

Da es sich bei der Autophagie um einen evolutionär konservierten Abbauweg für zelluläre Komponenten handelt, wird angenommen, dass die Autophagie in *C. elegans* in ähnlicher Weise bei höheren Organismen stattfindet. Dementsprechend wurden in *C. elegans* Orthologe zu Autophagie-relevanten Genen des Menschen nachgewiesen [302]. Die Autophagie findet in den meisten Geweben in *C. elegans* statt [303]. Sie wird mit dem Überleben der Nematoden unter Nahrungsmangel, der Entwicklung des Dauer-Stadiums sowie der Verlängerung der Lebensspanne assoziiert [302]. Weiterhin vermittelt die Autophagie eine Resistenz gegenüber unterschiedlichen Stresskonditionen, wie z.B. oxidativem Stress, und ist an der reproduktiven Entwicklung sowie am Zellwachstum und dem Zelltod beteiligt [304]. Im Rahmen der Alzheimer-Forschung konnte in *C. elegans* eine protektive Funktion der Autophagie durch die Beseitigung toxischer Proteinaggregate postuliert werden [302].

Die Makroautophagie in *C. elegans* beginnt, wie die im Menschen, mit der Bildung des Autophagosoms. Das zu diesem Zweck aktive BEC-1 (*BEclin homolog 1*), welches das humane Ortholog des für die Makroautophagie essenziellen Beclin1 darstellt, interagiert mit dem PI3K-

homologen Protein LET-512 für die initiale Bildung des Autophagosoms [305]. Für die Reifung und Fertigstellung des Autophagosoms befinden sich die ATG-Homologe LGG-1 (*LC3, GABARAP and GATE-16 family*) und LGG-2 in der autophagosomalen Membran, die ortholog zum humanen MAP-LC3 (*human microtubule-associated protein 1 light chain 3*) sind [306]. Anschließend verschmilzt das Autophagosom mit einem Lysosom zum Autolysosom, in dem der Abbau der cytoplasmatischen Materials stattfindet [302].

Für die CMA existiert eine funktionelle Beschreibung in *C. elegans* [307]. Insgesamt werden zwei Strukturhomologe für den humanen Transmembranrezeptor LAMP-2A beschrieben, der für die Aufnahme des abzubauenen Substrats in das Lysosom erforderlich ist [308].

2 ZIELSETZUNG

Als häufigste Demenzform ist die Alzheimer-Demenz eine neurodegenerative Erkrankung, die sich mit zunehmendem Erkrankungsfortschritt durch kognitive Einschränkungen auszeichnet. Diese liegen auf der Ablagerung von sogenannten senilen Plaques und der Bildung von neurofibrillären Bündeln im Gehirn begründet. Die Entstehung der senilen Plaques beruht auf der übermäßigen Bildung von β -Amyloid ($A\beta$), das sich zu Aggregaten zusammenlagert, intra- und extrazellulär akkumuliert und so eine neurotoxische Wirkung ausübt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das transgene *C. elegans* Alzheimer-Modell CL2006 verwendet, das sich durch die muskuläre Expression von humanem $A\beta_{1-42}$ auszeichnet und dadurch mit fortschreitendem Alter einen spezifischen Paralyse-Phänotyp entwickelt, der eine Aussage über die $A\beta$ -Toxizität im Nematoden ermöglicht. Das Ziel bestand darin, die Relevanz ausgewählter nukleärer Hormonrezeptoren hinsichtlich der $A\beta$ -Toxizität herauszustellen und mögliche molekulare Wirkmechanismen zu ermitteln.

Der Cholesterol metabolisierende Steroid-Signalweg reguliert in *C. elegans* die Aktivität des nukleären Hormonrezeptors DAF-12, der sich bereits in vorangegangenen Studien als verstärkend gegenüber der Ausbildung des Paralyse-Phänotyps erwiesen hat. Für den nukleären Hormonrezeptor NHR-8 wird eine regulative Wirkung auf den Steroid-Signalweg beschrieben, weshalb dessen Relevanz in CL2006 mittels der RNA-Interferenz (RNAi) induzierten reduzierten Expression überprüft wurde. Als ein möglicher Wirkmechanismus wurde anschließend die Interaktion mit dem DAF-16 Transkriptionsfaktor untersucht, dessen Aktivität durch den Insulin/IGF1-Signalweg reguliert wird und die zudem abhängig vom DAF-12 Aktivitätsstatus sein könnte. Der Einfluss der Mitglieder des Steroid-Signalweges auf die nukleäre DAF-16-Lokalisation wurde durch RNAi der Mitglieder des Steroid-Signalweges in einem transgenen *C. elegans* Stamm bestimmt, der ein DAF-16::GFP-Fusionsprotein exprimiert. Ferner wurde die transkriptionelle Aktivität von DAF-16 in einem *C. elegans* Stamm ermittelt, der GFP unter der Kontrolle des *sod-3* Promotors exprimiert, da das *sod-3* Gen ein Zielgen von DAF-16 darstellt. Schließlich wurde die Interaktion zwischen DAF-12 und DAF-16 auch hinsichtlich ihrer Wirkung auf die proteasomale und lysosomale Proteindegradation in CL2006 untersucht.

Da DAF-12 und NHR-8 als Homologe für den humanen Vitamin D-Rezeptor beschrieben werden und für Vitamin D eine neuroprotektive Funktion postuliert wird, wurde im nächsten Schritt

die Wirkung von Cholecalciferol (Vitamin D₃) auf die A β -Toxizität in Abhängigkeit von der Aktivität des Steroid-Signalweges überprüft.

Weiterhin wird im Zusammenhang mit der AD-Pathogenese die Aktivität der PPAR-Rezeptor-Familie als protektiv beschrieben, weshalb die Effekte des PPAR α -Homologs NHR-49 und seiner Bindungspartner NHR-66 und NHR-80 auf die Paralyse in CL2006 untersucht wurden. Auch bezüglich der Paralyse-verändernden Effekte von NHR-49 wurde die Abhängigkeit bzw. die Interaktion mit DAF-16 betrachtet.

3 METHODEN

Die in dieser Arbeit verwendeten *C. elegans*- und Bakterienstämme sowie RNAi-Klone sind im Kapitel 9 aufgelistet. Außerdem sind im Anhang die verwendeten Materialien, Chemikalien und Geräte unter Angabe des Herstellers und der Artikelnummer sowie die Zusammensetzung sämtlicher selbst hergestellter Lösungen und Puffer aufgelistet.

3.1 Kultivierung von *C. elegans*

Zur permanenten Aufrechterhaltung einer Nematodenpopulation erfolgte die Kultivierung von *C. elegans* auf NGM-Agarplatten, die mit einem *E. coli* OP50-Rasen bewachsen waren. Die Lagerung der bewachsenen Platten fand bei 20°C im Thermostatschrank statt.

Um ein Aushungern der Nematoden zu verhindern, war das regelmäßige sogenannte „Umsetzen“ notwendig, welches stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurde. Mithilfe eines abgeflamnten Skalpell wurde dabei ein Stück Agar von einer gut bewachsenen Platte ausgeschnitten, das sich als geeignet herausstellte, wenn sich die Nematoden auf diesem Stück gesammelt hatten und vom Rest der Platte der OP50-Rasen weitestgehend abgefressen war. Das ausgeschnittene Stück wurde anschließend kopfüber auf einer neuen NGM-OP50-Agarplatte platziert. In Abhängigkeit von der Menge der umgesetzten Nematoden und deren Entwicklungsverhalten musste dieser Vorgang regelmäßig wiederholt werden.

Für die langfristige Kultivierung und Lagerung von *C. elegans* ist es möglich, diesen bei -80°C einzufrieren. Dafür wurden mit angehungerten L1- und L2-Larven besetzte Platten benötigt. Mit dem Einfrierpuffer A (Tabelle 9.7) wurden die Larven zunächst von den Platten heruntergewaschen. Anschließend wurde zu dieser Suspension die gleiche Menge Einfrierpuffer B (Tabelle 9.8), der 30 % Glycerin enthielt, hinzugegeben. Infolge dieser Präparation konnten die Larven bei -80°C eingefroren werden, wobei dies in einem mit Isopropanol gefülltem Einfrierbehältnis geschah, um ein gleichmäßiges Absinken der Temperatur zu gewährleisten.

3.1.1 Herstellung von NGM-Agar-Platten

Die NGM-Agarplatten wurden gemäß dem in 9.5 beschriebenen Rezept hergestellt. Nachdem die Bestandteile in H₂O bidest. gelöst wurden, erfolgte die Autoklavierung bei 121°C für 15 min. Anschließend wurde der flüssige Agar im Wasserbad auf 55°C abgekühlt und gemäß den Angaben in Tabelle 9.21 fertiggestellt. Unter sterilen Bedingungen wurde der flüssige Agar zu je 9 ml in 92 mm Petrischalen gegossen. Nach dem Aushärten wurde unter sterilen Bedingungen die konzentrierte OP50-Tagkultur zu je 600 µl auf den NGM-Agar ausplattiert.

3.1.2 Kultivierung von *E. coli* OP50 Bakterien

Im Rahmen dieser Arbeit dienten die *E. coli* OP50 Bakterien als Nahrungsquelle während der Kultivierung. Diese Bakterien wurden vom *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC, University of Minnesota, St. Paul, USA) bezogen. Sie sind Uracil-auxotroph, weshalb durch das Weglassen von Uracil ihr Wachstum auf einem Medium limitiert werden kann [242].

Die Kultivierung von *E. coli* OP50 fand stets unter sterilen Bedingungen statt. Aus einer Glycerin- oder einer Übernachtskultur wurden mithilfe einer abgeflammtten Impföse Bakterien entnommen, die mittels des Drei-Ausstrich-Prinzips auf einer YT-Agarplatte (Tabelle 9.23) vereinzelt wurden. Nach einer über Nacht andauernden Inkubation bei 37°C konnte eine einzelne gewachsene Kolonie mit einem Zahnstocher gepickt werden und damit 3 ml YT-Medium beimpft werden, um eine Übernachtskultur herzustellen. Nach der über Nacht andauernden Inkubation bei 37°C und 300 rpm auf dem Schüttelinkubator konnte diese Kultur für die Herstellung einer Tagkultur verwendet werden. In einem Erlenmeyerkolben wurden hierfür 200 ml YT-Medium mit 500 µl Übernachtskultur beimpft und für sechs Stunden bei 37°C und 300 rpm auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Um die Kultur aufzukonzentrieren, wurde die Suspension auf vier Zentrifugenröhrchen à 50 ml aufgeteilt und für 5 min bei 5100 x g in der Tischzentrifuge (Tabelle 9.2) abzentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Bakterienpellets in je 5 ml frischem YT-Medium resuspendiert und anschließend in einem Zentrifugenröhrchen zusammengeführt. Die aufkonzentrierte Tagkultur war bei 4°C etwa eine Woche haltbar. Für die langfristige Lagerung erfolgte die Herstellung von Bakterien-Glycerolkulturen. Zu diesem Zweck wurden 800 µl Übernachtskultur mit 200 µl Glycerin versetzt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

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

Für die Versuchsdurchführung war eine in ihrem Entwicklungsstadium respektive Alter homogene Gruppe an Nematoden notwendig, weshalb eine Alterssynchronisation der Nematoden mittels des sogenannten standardisierten *EggPreps* (*egg preparation*) stattfand. Für einen *Egg-Prep* waren ausreichend mit Nematoden bewachsene NGM-OP50-Agarplatten notwendig, deren Anzahl je nach Nematodenstamm zwischen vier und sechs Platten lag. Die Durchführung erfolgte stets unter sterilen Bedingungen.

Zu Beginn wurden die Nematoden mit sterilem M9-Puffer (Tabelle 9.13) von den Agarplatten heruntergespült und mithilfe einer Glaspasteurpipette in ein Zentrifugenröhrchen à 15 ml überführt. Um die adulten Nematoden von Larven, Eiern und Bakterien zu trennen, erfolgte das Waschen der Nematoden mit M9-Puffer. Danach wurde der Überstand auf 3,5 ml abgesaugt

und 1,5 ml der zuvor frisch angesetzten Bleichlösung (Tabelle 9.5) hinzugegeben. Die Bleichlösung erfüllt den Zweck, die Kutikula der Nematoden aufzubrechen, um so die enthaltenden Eier zu gewinnen. Dazu musste die Lösung für etwa vier bis sechs Minuten kräftig geschüttelt werden, bis keine adulten Nematoden mehr in der Suspension erkennbar waren. Anschließend erfolgte die sofortige Verdünnung der Suspension mit M9-Puffer durch das Auffüllen auf die 15 ml Marke, um die Eier nicht zu beschädigen. Nachfolgend war das dreimalige Waschen der Eiersuspension notwendig, um die Bleichlösung komplett zu entfernen. Dazu wurde der Zentrifugenröhrcheninhalt bei 2800 x g für 2 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand bis auf das Pellet abgesaugt und das Röhrchen erneut auf 15 ml mit M9-Puffer aufgefüllt. Nach dem dritten Mal Waschen wurde das Zentrifugenröhrchen auf 10 ml mit M9-Puffer aufgefüllt. Die Eiersuspension wurde zudem mit 10 µl Cholesterol (Tabelle 9.4) versetzt, um die Entwicklung der Larven zu unterstützen. Für das Schlüpfen der Larven wurde das Zentrifugenröhrchen über Nacht im Überkopfschüttler bei 25 rpm im Thermostatschrank bei 20°C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde die entstandene L1-Larvensuspension für den Versuchsansatz so eingestellt, dass sich in 10 µl Suspension ca. 10 Larven befanden. Zuvor war ein zweimaliges Abzentrifugieren bei 1200 x g für 2 min in der Tischzentrifuge notwendig, um Verunreinigungen aus der Larvensuspension zu entfernen. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand auf 2 ml abgesaugt und die Einstellung der Larvenkonzentration durch die, am Stereomikroskop kontrollierte Zugabe von M9-Puffer vorgenommen.

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

Die Aufzucht der synchronisierten L1-Larven erfolgte in einem Flüssigmedium, das mit Bakterien versetztes NGM beinhaltet. In den Versuchen wurden stets *E. coli* HT115 Bakterien als Nahrung für *C. elegans* eingesetzt. Für den Versuchsansatz war es daher erforderlich, die Bakterien in Form von Übernacht- und Tagkultur zu kultivieren. Dies geschah gemäß der Beschreibung in 3.1.5.

Um die HT115 Bakterien in NGM lösen zu können, musste zunächst das Medium entfernt werden, in dem die Kultivierung stattfand. Dafür wurde 1 ml der Tagkultur in ein 2 ml Reagiergefäß pipettiert und in der Mikroliterzentrifuge für 2 min bei 5100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend entfernt und das entstandene Pellet in 500 µl zuvor frisch hergestelltem NGM resuspendiert. Die Einstellung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) erfolgte am Photometer auf den Wert 1 ($\pm 0,1$) durch die schrittweise Hinzugabe von NGM.

Die Versuche wurden je nach Weiterbehandlung in 96- oder 24-Well-Mikrotiterplatten angesetzt. Für den Ansatz in einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden die äußersten

Plattenvertiefungen grundsätzlich mit 100 µl destilliertem Wasser bestückt, um als Verdunstungsschutz zu wirken. In die übrigen innenliegenden Plattenvertiefungen wurden jeweils 10 µl der zuvor eingestellten Larvensuspension und 44 µl der NGM-Bakterien-Suspension pipettiert. In einer 96-Well-Mikrotiterplatte konnten bis zu 6 Behandlungsgruppen à 10 Plattenvertiefungen aufgezogen werden. Versuche, die in 24-Well-Platten angesetzt wurden, benötigten pro Behandlungsgruppe drei dieser Platten. Pro Plattenvertiefung wurden 100 µl der Larvensuspension und 460 µl der NGM-Bakterien-Suspension pipettiert.

Nach der vollständigen Bestückung einer Platte wurde diese mit einem befeuchteten Papiertuch bedeckt und in einer Pappschachtel gelagert. Für die Aufzucht der Nematoden erfolgte die Lagerung dieser Schachtel auf einem Schüttler bei 125 rpm im Thermostatschrank bei 20°C.

3.1.5 RNA-Interferenz in *C. elegans*

Die RNA-Interferenz, die auch als *gene silencing* bezeichnet wird, beschreibt eine Form der posttranskriptionellen Modifikation der Genexpression. Sie dient dem Schutz des Genoms eines Organismus vor schädlichen Umwelteinflüssen wie z.B. Parasiten in Form von Viren, die zu einer abweichenden oder unerwünschten Genexpression führen können und der Regulation der Genexpression [309, 310]. In *C. elegans* wurde entdeckt, dass es durch den Einsatz von doppelsträngiger RNA (dsRNA) und deren simpler Verfütterung möglich ist, effizient und sequenzspezifisch Gene via RNAi abzuschalten [246].

Im ersten Schritt wird die eingebrachte dsRNA durch den sogenannten *DICER*, eine dsRNA-spezifische Endonuklease, in kurze etwa 21-23 Nukleotide umfassende Fragmente (*short interfering RNA*; siRNA) geschnitten. Diese werden durch den *RNA-induced silencing complex* (RISC) gebunden, der die doppelsträngigen siRNA Fragmente in Einzelstränge auftrennt. In Verbindung mit einer der beiden einzelsträngigen siRNAs ist der RISC dazu in der Lage, komplementäre einzelsträngige *messenger RNA* (mRNA) zu binden und anschließend mittels der enthaltenen Nuklease abzubauen. Auf diese Weise wird die Menge der zu translatierenden mRNA deutlich reduziert (*knock-down*) [310].

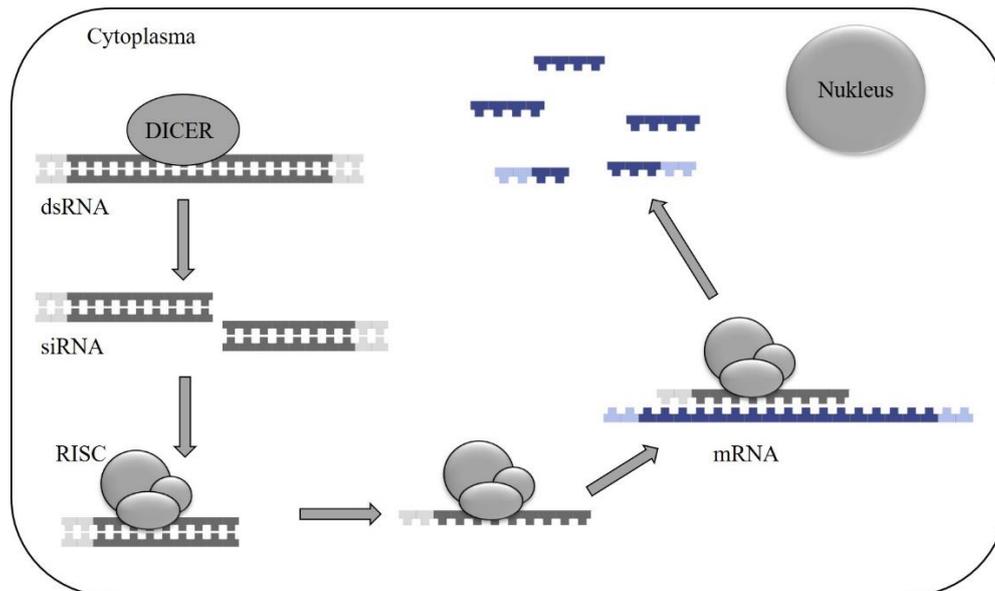


Abbildung 3.1: Prinzip der RNAi

Die spezifische Endonuklease (DICER) schneidet die doppelsträngige RNA (dsRNA) in kurze Fragmente (*short interfering RNA*; siRNA). Die siRNA wird durch Bindung an den RNA-induced silencing complex (RISC) in Einzelstränge aufgetrennt. Mithilfe des zur mRNA komplementären Einzelstranges bindet der RISC an die mRNA, wodurch diese abgebaut wird. Modifiziert nach Grishok [311].

Durch Injektion, Durchtränkung oder Verfütterung kann die dsRNA in *C. elegans* eingebracht werden [311]. In dieser Arbeit wurde die RNAi in *C. elegans* durch die Verfütterung von *E. coli* HT115(DE3)-Bakterien vermittelt, die für die effiziente Synthese von dsRNA modifiziert wurden. Der *E. coli* HT115-Klon ist RNaseIII-defizient, da das entsprechende Gen entfernt wurde, um den RNase vermittelten Abbau der dsRNA zu hemmen. Für die Synthese des dsRNA wurde das Gen für eine T7-Polymerase in das Genom von HT115 integriert, dessen Expression durch einen Laktose- und Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)-induzierbaren Promotor reguliert wird. Zudem enthält das Bakterium ein Plasmid, welches ein L4440-Vektor ist und einen mit zwei konvergenten T7-Promotoren flankierten Bereich enthält, in den ein Fragment eines *C. elegans* Gens kloniert wurde [312]. Durch die Kultivierung der Bakterien in einem mit IPTG versetzten Medium wurde die Expression der T7-Polymerase induziert, welche die durch die T7-Promotoren flankierte Sequenz im Plasmid schrieb und somit zur Bildung der dsRNA führte. Da ein Strang dsRNA komplementär zur mRNA des von dem integrierten *C. elegans* Gens war, führte die Aufnahme in *C. elegans* folglich zum Abbau der mRNA und Reduktion der Menge des kodierten Proteins [311, 313]. Zur Selektion besitzt der *E. coli* HT115-Klon eine Tetracyclin-Resistenz, um ein selektives Wachstum der Bakterien zu ermöglichen, und eine in dem Plasmid enthaltene Ampicillin-Resistenz, die ein selektives Wachstum Plasmid-enthalten-der Bakterien veranlasst [312].

Für die Kultivierung der *E. coli* HT115-Bakterien, die stets unter sterilen Bedingungen stattfand, waren zunächst vereinzelt Kolonien notwendig, die durch einen Verdünnungsausstrich aus einer Glycerin- oder Übernachtskultur auf einer mit Ampicillin und Tetracyclin versetzten YT-Agar-Platte erhalten wurden. Nach der über Nacht andauernden Inkubation bei 37°C konnte von dieser Platte eine einzige Bakterienkolonie mit einem Zahnstocher aufgenommen werden und diente der Beimpfung des sogenannten Mastermixes, der sich aus 3 ml YT-Medium, versetzt mit 3 µl Ampicillin, zusammensetzte. Nach der Inkubation, die über Nacht auf dem Schüttelinkubator bei 37°C und 300 rpm erfolgte, konnte mit der Übernachtskultur eine Tagkultur hergestellt werden. Hierfür wurden dem Mastermix, der aus 4 ml YT-Medium, 4 µl Ampicillin und 4 µl IPTG bestand, 400 µl der Übernachtskultur zugesetzt. Nach einer vierstündigen Inkubation auf dem Schüttelinkubator bei 300 rpm und 37°C war die Kultur gebrauchsfertig. Für die Langzeitlagerung der HT115-Bakterien wurden 800 µl der Übernachtskultur mit 200 µl Glycerin versetzt und nach gründlichem Mixen bei -80°C eingefroren.

In RNAi-Versuchen wurde als Kontrolle stets eine sogenannte Negativkontrolle mitgeführt, die jene RNAi-Bakterien meint, die im Plasmid kein *C. elegans* Fragment enthielten. Des Weiteren wurde bei sogenannten Doppel-RNAi-Versuchen jede der beiden RNAi mit Negativkontrolle verdünnt, um die Menge der applizierten dsRNA hinsichtlich der Einzel- und Doppel-RNAi zu nivellieren.

3.1.6 Inkubation von *C. elegans* mit Effektoren

Die Inkubation der Nematoden mit Effektoren fand ab dem jung-adulten Stadium statt, das sich durch die erste Eiablage auszeichnete. Die Inkubationsdauer betrug 48 h und erfolgte im Thermostatschrank bei 20°C auf dem Schüttler bei 150 rpm.

Für die Behandlung mit Cholecalciferol (Tabelle 9.4) wurde eine Stammlösung angesetzt, die bei -20°C lichtgeschützt gelagert wurde und als Grundlage für die Herstellung der Arbeitslösungen diente. Auch die in unterschiedlichen Konzentrationen angesetzten Arbeitslösungen wurden vorbereitet, bei -20°C eingefroren und vor jedem Auftragen aufgetaut. Es erfolgte in regelmäßigen Abständen ein frischer Ansatz dieser Lösungen. Die Arbeitslösungen waren grundsätzlich zehnfach höher konzentriert als die gewünschte Endkonzentration in der Plattenvertiefung. Als Kontrolle wurde in den Versuchen das Lösungsmittel des Effektors mitgeführt. Bei den Lösungsmitteln für die Effektoren galt es stets zu beachten, dass der Ethanolanteil der 10-fach konzentrierteren Lösung bei höchstens 10 % lag, um negative Auswirkungen auf die Nematoden zu vermeiden.

Um die Nematoden mit einer höheren Cholesterolkonzentration zu inkubieren, erfolgte von Anfang an die Aufzucht der L1-Larven in einem NGM-Medium, das 15 µg/ml anstatt 5 µg/ml Cholesterol enthielt.

Nach 48-stündiger Inkubation der jung-adulten Nematoden erfolgte deren gruppenweise Überführung in Zentrifugationsröhrchen à 15 ml, die bis zur 10 ml Marke mit M9:Tween®-Puffer befüllt waren. Durch das zweimalige Waschen mit M9:Tween®-Puffer erfolgte die Entfernung von Bakterien, des NGMs und der Larven.

3.2 Messung der Paralyserate

Die Paralyserate von CL2006 gilt als ein Maß für die A β -Toxizität. Aufgrund des im Genom integrierten A β -Minigens, das unter dem muskelspezifischen Promotor *unc-54* exprimiert wird, akkumuliert das A β mit fortschreitendem Alter in den Muskelzellen des Nematoden. Als Resultat zeigt sich der zunehmende muskuläre Funktionsverlust als Paralyse des Nematoden, wobei dieser nur noch den Kopf oder den Schwanz bewegen kann [258, 261].

Nach der 48 h andauernden Inkubation mit Effektoren wurden für die Messung der Paralyse die Nematoden, die sich noch in den Plattenvertiefungen der 96-Well-Mikrotiterplatte befanden, für 1,5 h bei 35°C inkubiert, um deren Alterungsprozess und die Proteinaggregation zu beschleunigen. Infolge der Hitzeexposition ergibt sich in der mit den RNAi-Kontroll-Bakterien behandelten Gruppe eine Paralyserate von 50 %.

Nach der Hitzeexposition für 1,5 h bei 35°C wurden die Nematoden gruppenweise in 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, in denen jeweils 10 ml M9:Tween®-Puffer vorgelegt waren. Nach dem zweimaligen Waschen mit M9:Tween®-Puffer wurde der Überstand auf 1 ml abgesaugt. Die Zentrifugationsröhrchen wurden anschließend in Alufolie eingewickelt, um die Behandlungsgruppen zu verblinden. Dies diente dem Zweck der objektiven Beurteilung des Bewegungsmusters der Nematoden. Für die Untersuchung des Bewegungsverhaltens der Nematoden wurden jene einer Gruppe mithilfe des Stereomikroskops unter Kaltlicht auf einer NGM-Agar-Platte vereinzelt, die zuvor in ein 25 Felder umfassendes Raster eingeteilt wurde. Pro Feld wurde 1 µl der Suspension mit einem adulten Nematoden platziert. Da die Platte geöffnet blieb, trockneten die Nematoden kurz an und wurden anschließend mit einer abgeflamten, abgekühlten Platinöse angetippt, um die daraus resultierende Bewegungsreaktion beurteilen zu können. Wenn sich der Nematode nicht mehr zielgerichtet fortbewegen konnte, wurde dieser als paralytisch eingestuft. Anschließend wurde die Paralyserate in % der Kontrolle angegeben.

3.3 Fluoreszenzmikroskopische Messungen

3.3.1 Analyse der DAF-16::GFP Translokation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der transgene *C. elegans* Stamm TJ356 (*zIs356 [daf-16p::daf-16a/b::GFP + rol-6(su1006)]*) verwendet, um die Aktivität des Insulin/IGF-1 vermittelten Signalwegs zu überprüfen. In diesem Stamm ist das *daf-16::gfp*-Reportergen in das Genom integriert. Das GFP wurde ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert und besteht aus 238 Aminosäuren. Es absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge zwischen 395 und 470 nm und emittiert grünes Licht bei einer Wellenlänge zwischen 509 und 540 nm [314]. In TJ356 erfolgt unter der Kontrolle des *daf-16* (*abnormal dauer formation*)-Promotors die Expression eines Fusionsproteins aus dem DAF-16- und dem GFP-Protein [268]. In Abbildung 3.2 ist exemplarisch die cytosolische (A) und nukleäre (B) Lokalisation von DAF-16::GFP gezeigt.

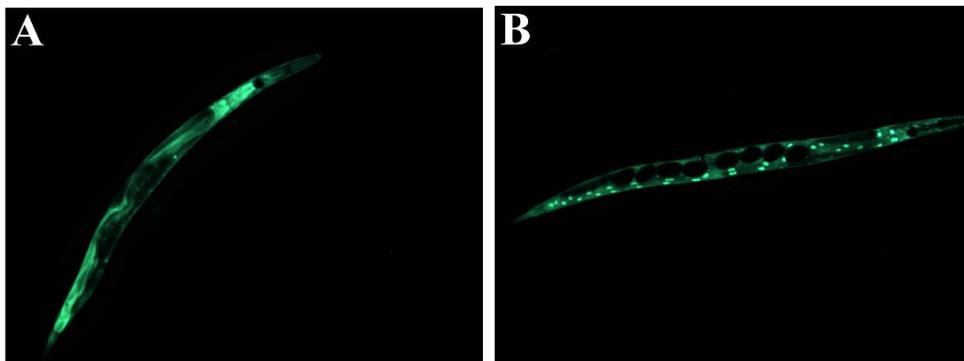


Abbildung 3.2: GFP-Fluoreszenz von TJ356

(A) Cytosolische Verteilung von DAF-16::GFP; (B) Nukleäre Verteilung DAF-16::GFP.

Wie schon für die Bestimmung der Paralyserate beschrieben (3.2) wurden die TJ356 Nematoden zuerst für 60 min bei 35°C im Inkubator inkubiert und anschließend für 60 min bei 20°C im Thermostatschrank auf dem Schüttler bei 150 rpm verwahrt. Je Behandlungsgruppe wurde zunächst ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml M9:Tween®-Puffer befüllt, in das die Nematoden für den Waschvorgang überführt wurden. Nach dem zweimaligen Waschen wurde der Überstand vorsichtig auf 100 µl abgesaugt und 200 µl Levamisol (Tabelle 9.4) hinzugefügt. Das Levamisol diente der Betäubung der Nematoden, um die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zu ermöglichen. Danach wurden die Zentrifugenröhrchen als Lichtschutz in Alufolie eingewickelt.

Für die Bestimmung der zellulären DAF-16::GFP Lokalisation wurden Aufnahmen mithilfe des Fluoreszenzmikroskops AMG EVOS fl Color (Tabelle 9.2) erstellt. Dafür wurden 35 µl der Nematoden-Lösung auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Für die Aufnahmen wurde der GFP-Kanal eingestellt, der eine Anregungswellenlänge von

470 nm und eine Emissionswellenlänge von 525 nm beinhaltete. Die Aufnahmen erfolgten bei hundertfacher Vergrößerung. Pro Behandlungsgruppe wurden mindestens 20 verschiedene Nematoden aufgenommen.

In der mit RNAi-Kontroll-Bakterien behandelten Gruppe lag in ca. 50 % der untersuchten TJ356 Nematoden eine nukleäre DAF-16-Lokalisation vor.

3.3.2 Expressionsanalyse mittels des *sod-3p::gfp* Transgens

Der transgene *C. elegans* Stamm CF1553 (*muIs84 [(pAD76) sod-3p::GFP + rol-6(su1006)]*), der ein GFP-Gen gekoppelt an dem *sod-3* (*SOD (superoxide dismutase)*)-Promotor aufweist, wurde verwendet, um die transkriptionelle Aktivität von DAF-16 zu überprüfen. Die durch *sod-3* kodierte Superoxid-Dismutase ist ein Zielgen von DAF-16, weshalb die SOD-3-Expression Rückschlüsse auf die DAF-16-Aktivität erlaubt. Durch das an den Promotor gekoppelte *gfp*-Reportergen korreliert die messbare GFP-Fluoreszenz mit der SOD-3-Expression [315].

Die CF1553 Nematoden wurden vor dem Waschen für 1,5 h bei 35°C inkubiert. Das Waschen, die Betäubung der Nematoden und die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop wurden wie unter 3.3.1 beschrieben durchgeführt.

Die anschließende Auswertung der Aufnahmen gliederte sich in zwei Schritte. Zunächst erfolgte die graphische Auswertung mit der Software ImageJ (Tabelle 9.30). Dazu wurden die Aufnahmen in 8-bit Graustufenbilder aufgetrennt, um im grünen Farbkanal die Quantifizierung der Pixel vornehmen zu können. Da sich pro Aufnahme nur ein adulter Nematode befinden sollte, wurden Eier, Larven und andere störende Objekte wegretuschiert. Als nächstes wurde ein unterer Grenzwert festgelegt, um bei möglichst niedrigem Hintergrundrauschen den ganzen Nematoden durch die Anzahl der Pixel einzuschließen. Mit dieser Angabe wurde mittels ImageJ die integrierte Dichte der ausgewählten Pixel ermittelt, die als ein Maß für die Fluoreszenzintensität gilt. Mithilfe der ermittelten kumulierten Grauwerte der ausgewählten Pixel konnte die Gesamtfluoreszenz im zweiten Schritt statistisch ausgewertet werden.

3.3.3 Quantifizierung der Lysosomen mittels LysoTracker® Red

Für die Bestimmung der Aktivität der Autophagie wurde der Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker® Red verwendet, der in sauren Vesikeln, wie z.B. in Lysosomen, akkumuliert. LysoTracker® Red ist ein mit einer schwachen Base verknüpftes Fluorophor, das im sauren Milieu protoniert wird und dadurch die Eigenschaft verliert, Membranen zu passieren [316].

Für die Anfärbung der Lysosomen im Nematoden erfolgte die 48-stündige Inkubation mit LysoTracker® Red (2 µM in M9:Tween®20) analog zur Inkubation mit den Effektoren (3.1.6).

Anschließend wurden die Nematoden in mehreren Schritten gewaschen. Für die Entfernung des Farbstoffs, der Bakterien und der Larven wurden die Nematoden aus den Plattenvertiefungen gruppenweise in Zentrifugenröhrchen à 15 ml überführt, die jeweils mit 10 ml M9:Tween®20 befüllt waren. Nach dem zweimaligen Waschen mit M9:Tween®20 wurde der Überstand auf 200 µl abgesaugt und die Nematodensuspension wurde gruppenweise auf NGM-OP50-Agarplatten pipettiert. Die Nematoden verblieben für 1 h auf der NGM-OP50-Agarplatte, um den Darm zu entleeren, da andernfalls der verbleibende Fluoreszenzfarbstoff im Intestinum des Nematoden zu fehlerhaften Messergebnissen geführt hätte. Danach wurden die Nematoden mit M9-Puffer von den Agarplatten heruntergespült und gruppenweise in Zentrifugenröhrchen à 15 ml überführt. Nach dem Waschen wurde der Überstand auf 100 µl abgesaugt, damit eine Betäubung der Nematoden durch die Zugabe von 200 µl Levamisol möglich war. Mithilfe des Fluoreszenzmikroskops AMG EVOS fl Color (Tabelle 9.2) erfolgten die Aufnahmen im RFP-Kanal, welcher eine Anregungswellenlänge von 530 nm und eine Emissionswellenlänge von 593 nm beinhaltet. Die Aufnahmen und die quantitative Auswertung erfolgten analog zu dem in 3.3.2 beschriebenen Prozedere, wobei für die Auswertung der rote Farbkanal ausgewählt wurde.

3.3.4 Quantifizierung der Cholesterolaufnahme mittels Dehydroergosterol

Für die fluoreszenzoptische Messung der Cholesterolaufnahme in *C. elegans* wurde das natürlich vorkommende fluoreszierende Cholesterolanalogon Dehydroergosterol (DHE) eingesetzt. Durch die sehr ähnlichen biologischen Eigenschaften ist DHE als ein Cholesterolsubstituent geeignet, was auch dadurch verdeutlicht wird, dass es als allein verfügbare Sterolquelle in der Nahrung keine negativen Auswirkungen auf die Entwicklung des cholesterolauxotrophen Nematoden hat [317]. Der Vorgehensweise zugrundeliegend ist die Methode von Wüstner *et al.* [318]. Statt des Cholesterols wurde dem NGM DHE [100 µM] zugesetzt, d.h. eine Behandlung der Nematoden mit DHE fand ab dem L1-Stadium statt. Die Untersuchung der Nematoden erfolgte wiederum 48 h nach dem Erreichen des jung-adulten Stadiums. Das Waschen und die Betäubung der Nematoden erfolgten gemäß den Angaben in 3.3.2. Die Aufnahmen und deren Auswertung wurden ebenfalls nach der Beschreibung in 3.3.2 erstellt, wobei als Fluoreszenzkanal der DAPI-Kanal gewählt wurde, der eine Anregungswellenlänge von 360 nm und eine Emissionswellenlänge von 447 nm beinhaltet.

3.3.5 Bestimmung der A β -Aggregation mittels NIAD-4

Das *C. elegans* Alzheimermodell exprimiert A β in den Körperwandmuskelzellen, das mittels des rotfluoreszierenden Farbstoffs NIAD-4 ($\{[5^-(p\text{-hydroxyphenyl})-2,20\text{-bithienyl-5-yl}]\text{-methylidene}\}$ -propanedinitrile) angefärbt wurde. NIAD-4 bindet spezifisch Amyloid-Fibrillen und ermöglicht deren Nachweis über den Anstieg der Fluoreszenz [319, 320]. Für die Anfärbung der A β -Ablagerungen war zunächst eine Vorbehandlung der Nematoden notwendig, die sich in die Fixierung und die Permeabilisierung untergliederte. Innerhalb eines Versuchsansatzes wurde für jede Behandlungsgruppe eine 24-Well-Platte vorbereitet. 48 h nach dem Erreichen des jung-adulten Stadiums wurden die CL2006 Nematoden zunächst für 1,5 h bei 35°C inkubiert. Danach wurden die Nematoden gruppenweise in Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal mit M9-Puffer gewaschen. Zu dem Nematodenpellet wurden anschließend 1 ml der Fixierungslösung (Tabelle 9.10) hinzu pipettiert. Nach der 24 h andauernden Inkubation bei 4°C im Kühlschrank wurde der Überstand weitestgehend abgesaugt und unter dem Abzug 500 μ l des Permeabilisierungspuffers (Tabelle 9.17) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 24 h auf dem Schüttelinkubator bei 37°C und 300 rpm. Danach fand die Entfernung des Überstandes sowie das zweimalige Waschen mit PBS (Tabelle 9.16) unter dem Abzug statt. Aufgrund der veränderten Struktur der Nematoden war eine Zentrifugation zwischen den Waschschrritten nicht möglich, weshalb sich die Nematoden von selbst absetzen mussten. Nach dem der Überstand weitestgehend abgesaugt wurde, erfolgte die lichtgeschützte Inkubation der Nematoden mit NIAD-4 [10 μ M] (Tabelle 9.4) für etwa 10 min, bis sich die Nematoden größtenteils abgesetzt hatten. Der Überstand wurde entfernt und die Nematoden durch das dreimalige Waschen mit Ethanol (50 %) entfärbt. Danach wurden zu den entfärbten Nematoden 100 μ l PBS hinzupipettiert. Am Fluoreszenzmikroskop wurde der rote Fluoreszenzkanal sowie das 20x Objektiv für die Aufnahmen ausgewählt, die vom Nematodenkopf erstellt wurden. Pro Gruppe wurden ca. 30 Nematoden fotografiert. Für die Auswertung der Bilder wurden diese zuerst mit Adobe Photoshop (Tabelle 9.30) bearbeitet, um den zu messenden Kopfbereich, der sich bis zum terminalen Bulbus des Pharynx erstreckt, und den Farbtonbereich der A β -Ablagerungen auszuwählen, die sich als hellere Flächen darstellten (Abbildung 3.3). Mithilfe von ImageJ erfolgte die graphische Auswertung, die in 3.3.2 beschrieben ist, woraufhin die statistische Auswertung ausgeführt wurde.

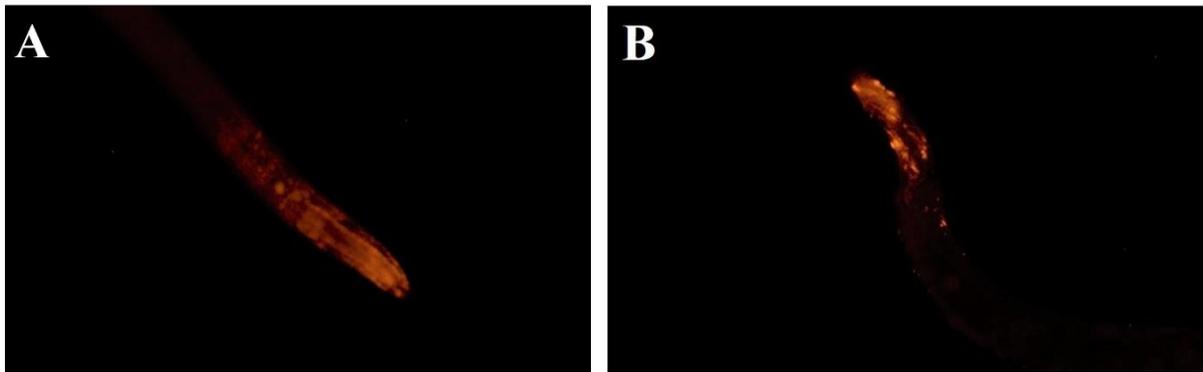


Abbildung 3.3: Anfärbung der A β -Aggregate mit NIAD-4
Darstellung der NIAD-4 Färbung im Wildtyp (A) und in CL2006 (B).

3.4 Proteinextraktion mittels des Precellys Homogenisators

Um biochemische Analysen mit entsprechenden Mengen an Protein aus *C. elegans* durchführen zu können, ist eine große Menge an Nematoden notwendig. Zu diesem Zweck erfolgten die Versuchsansätze in 24-Well-Platten, wobei davon drei für eine Behandlungsgruppe benötigt wurden, um etwa 8.000 Nematoden zu erhalten. 48 h nach dem Erreichen des jung-adulten Stadiums wurden die CL2006 Nematoden zuerst einer Hitzeschockbehandlung (1,5 h, 35°C) unterzogen, nach welcher die Nematoden aus den Plattenvertiefungen gruppenweise in Zentrifugenröhrchen überführt wurden. Anschließend wurden die Nematoden zweimal mit M9-Puffer gewaschen. Danach wurde der Überstand weitestgehend abgesaugt und das Nematodenpellet in ein 2 ml Schraubdeckelgefäß (*Micro Packaging Vials*TM, Tabelle 9.1) überführt, zu dem ca. 300 μ l Lyse-Puffer I (Tabelle 9.11) hinzupipettiert wurden. Danach war eine mindestens 24 h andauernde Lagerung bei -80°C erforderlich. Für die Proteinextraktion wurden die Nematoden zunächst auf Eis aufgetaut und pro Gefäß 52 Keramikkügelchen (Tabelle 9.1) hinzugegeben. Anschließend fand die Extraktion im Precellys-Homogenisator (Tabelle 9.2) statt, welche für 2x 20 s bei 6500 rpm mit 30 s Pause erfolgte. Danach wurde das Homogenat in der Tischzentrifuge bei 4°C für 20 min bei 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand, der die extrahierten Proteine enthielt, wurde in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Dieser konnte entweder direkt auf Eis weiterverwendet oder bei -20°C gelagert werden.

3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Mittels der Bio-Rad Protein Prüfung erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration. Der kolorimetrischen Bestimmung zugrundeliegend ist die Methode von Bradford, welche die Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung beinhaltet.

Durch die Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm. Die Intensität der Extinktion bei 595 nm korreliert mit der Proteinkonzentration [321]. Die für die Bestimmung notwendige Standardreihe wurde durch Lösungen von bovinem Serumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml in Lyse-Puffer I erstellt. Von den Standards wurden jeweils 25 µl mit 975 µl bidestilliertem Wasser vermischt und mit 250 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer exakten Inkubationszeit von 15 min wurde mittels des Photometers (Tabelle 9.2) die Absorption von jedem Standard bei 595 nm bestimmt und anschließend automatisch eine Standardkurve generiert.

Die Messung der Proteinproben erfolgte in verdünnter Form, in dem zunächst 10 µl der Probe mit 90 µl Lysis-Puffer I vermischt wurden. Anschließend erfolgte analog zu den Standards die Vermischung mit Wasser und der Bradford-Reagenz. Nach 15 min wurde die Konzentration der Probe anhand der Standardreihe ermittelt.

3.6 Messung der Proteasomaktivität

Die fluorometrische Messung der Proteasomaktivität in *C. elegans* erfolgte spezifisch über die Bestimmung der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasomaktivität, die durch eine Untereinheit des 20S Proteasoms vermittelt wird. Zu diesem Zweck wurde das fluorogene Substrat N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin (Suc-LLVY-AMC) (Tabelle 9.4) eingesetzt, von dem proteolytisch das Fluorogen 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) abgespalten wird. Daraus resultiert ein Fluoreszenzsignal, dessen Anstieg zunächst mit der gesamten enzymatischen Proteasenaktivität gleichzusetzen ist. Für die Spezifizierung der enzymatischen Aktivität wurde der Proteasen-Inhibitor MG-132 [322] (Tabelle 9.4) genutzt, der die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität spezifisch hemmt. Die Differenz aus dem Fluoreszenzsignal mit und ohne Inhibitor gibt die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität an.

Für die Messung wurde eine schwarze 96-Well *half area* Mikrotiterplatte (Tabelle 9.1) verwendet. In jede Plattenvertiefung, die für eine Probe benötigt wurde, wurden zunächst die 1,5 fache Menge des späteren Ansatzvolumens (75 µl) einer 3 %-igen BSA-Lösung in *tris-buffered saline* (TBS) (Tabelle 9.19) pipettiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C, woraufhin die BSA-Lösung vollständig entfernt wurde. Dies diente der Vermeidung von Interaktionen zwischen der Mikrotiterplatte und der Protein-Probe.

Anschließend wurde in die zuvor mit BSA-Lösung präparierten Plattenvertiefungen 35 µl des Proteasomaktivitätspuffers vorgelegt, zu dem 15 µl der jeweiligen auf Eis gelegten Protein-Probe hinzugefügt wurden. Dies erfolgte für jede Protein-Probe in 6-facher Ausführung, da

jeweils drei Plattenvertiefungen zusätzlich mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 [10 μ M] und drei Plattenvertiefungen mit DMSO (Dimethylsulfoxid) als Kontrolle versetzt wurden. Nach einer im Dunkeln erfolgten 15-minütigen Inkubation bei 20°C im Thermostatschrank auf dem Schüttler bei 150 rpm, wurde zu jedem Proben-Puffer-Gemisch 0,5 μ l der Stammlösung des spezifischen Substrats Suc-LLVY-AMC hinzugefügt. Mittels des Mikrotiterplatten Fluorometers Fluoroskan (Tabelle 9.2) erfolgte die kinetische Fluoreszenzmessung bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm. Die Gesamtzeit der Messung betrug 3 h, in der in einem Abstand von 10 min die Fluoreszenz gemessen wurde.

Mithilfe von GraphPad Prism 5 (Tabelle 9.30) wurde mittels linearer Regression der Fluoreszenzanstieg pro Zeiteinheit bestimmt. Durch die Bildung der Differenz der Steigungen, die jeweils in Ab- und Anwesenheit des Inhibitors bestimmt wurden, konnte der Fluoreszenzanstieg ermittelt werden, der die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität wiedergibt. Diese wurde als spezifische Aktivität pro mg Protein normalisiert.

3.7 PCR-Verfahren

3.7.1 Single Worm-PCR

Die sogenannte *Single Worm-PCR* (SW-PCR) beschreibt die Vervielfältigung des genetischen Materials eines einzelnen Nematoden und wurde genutzt, um für die Quantitative-Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) generierte Primer hinsichtlich ihrer Funktionalität zu überprüfen. Um die DNA und die mRNA eines einzelnen Nematoden zu erhalten, musste zuerst die Lyse des Nematoden erfolgen. Da die Primer für eine qRT-PCR benötigt wurden, war die cDNA-Synthese aus der mRNA ein notwendiger Zwischenschritt. Das entstandene PCR-Produkt wurde mittels DNA-Gelelektrophorese nachgewiesen.

3.7.1.1 Wurmlyse

Um einen Nematoden zu lysieren, wurde der Lyse-Puffer II (Tabelle 9.12) benötigt. Dieser wurde zuerst in ein Glasschälchen pipettiert. Am Stereomikroskop wurde mithilfe eines Platindrahtes ein einzelner Nematode von einer schwach bewachsenen NGM-OP50-Agarplatte aufgenommen und in den Lyse-Puffer gegeben. Anschließend wurde dieser Nematode in einem Volumen von 2 μ l mit einer Pipette aufgenommen und in ein PCR-Reaktionsgefäß (Tabelle 9.1) überführt. Die Wurmlyse fand im Thermocycler Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Tabelle 9.2) in 2 Schritten statt. Zuerst erfolgte die Lyse für 1 h bei 60°C, woraufhin durch die 15-minütige Inkubation bei 90°C der Lyse-Vorgang beendet wurde. Das Wurmlysat konnte entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren werden.

3.7.1.2 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA (*complementary DNA*) erfolgte mithilfe des Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits (Tabelle 9.28). Für die Herstellung des Mastermixes wurden die enthaltenen Komponenten in den folgenden Mengen in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

- 1 μl 10x dsDNase Puffer
- 1 μl dsDNase
- 1 μl Random-Hexamer Puffer [100 pmol]
- 1 μl dNTP Mix [10 mM]
- 4 μl 5x RT-Puffer
- 1 μl Enzyme Mix (Reverse Transkriptase, RNase Inhibitor)
- 11 μl Nuklease-freies Wasser

In einem neuen PCR-Reaktionsgefäß wurde 1 μl des Wurmlysats, welches die mRNA enthielt, mit 1 μl des Mastermixes vermischt. Anschließend erfolgte im Thermocycler Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Tabelle 9.2) erst eine 10-minütige Inkubation bei 25°C, dann eine 30-minütige Inkubation bei 55°C und abschließend eine 5-minütige Inkubation bei 85°C. Zu dem Produkt wurden anschließend 23 μl bidestilliertes Wasser hinzugefügt. Das Produkt konnte bei -80°C gelagert werden.

3.7.1.3 *Single Worm-Polymerase Kettenreaktion*

Für die SW-PCR wurde das KAPA2G Fast Hot Start PCR Kit (Tabelle 9.28) verwendet. Als erstes wurde der Mastermix bestehend aus der KAPA2G Fast Hot Start DNA-Polymerase, Puffer, dNTPs, den spezifischen Primern und Wasser hergestellt. Anschließend wurde der Mastermix in die PCR-Reaktionsgefäße pipettiert, in die zuvor 2 μl des cDNA Produkts (3.7.1.2) gegeben wurde.

Ein Reaktionsansatz umfasste 25 μl und setzte sich wie folgt zusammen:

- 2 μl gDNA aus der Wurmlyse
- 5 μl KAPA2G Puffer [5x]
- 0,1 μl KAPA2G Fast Hot Start Polymerase [5 U/ μl]
- 0,5 μl KAPA2G dNTP Mix [40 mM]
- 1,25 μl forward Primer [10 μM]
- 1,25 μl reverse Primer [10 μM]
- 14,9 μl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H₂O

Mithilfe des Thermocycler Veriti® 96 Well Thermal Cyclers (Tabelle 9.2) wurde die PCR durchgeführt. Die Einstellungen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Die Annealing-Temperaturen waren abhängig vom jeweiligen Primer-Paar.

Tabelle 3.1: Zyklus-Einstellungen für SW-PCR

Phase	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	1 min	1
Denaturierung	95°C	15 s	50
Annealing	zw. 50-60°C	15 s	
Elongation	72°C	1 s	

Das PCR-Produkt war bei -20°C lagerfähig.

3.7.1.4 DNA-Gelelektrophorese

Das für die DNA-Gelelektrophorese benötigte Gel bestand aus 2 % Agarose in TAE-Puffer (Tabelle 9.20). Für die Visualisierung der DNA wurde diese mit 6x DNA-Beladungspuffer (Tabelle 9.3) vor der Beladung des Gels in einem Verhältnis von 1:6 vermischt, wobei das Gel vor dem Erstarren zusätzlich mit 1x SYBR® Safe (Tabelle 9.3) versetzt wurde. Als Größenmarker wurde der Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Tabelle 9.3) aufgetragen. Die DNA-Auftrennung fand für 2 h bei 80 V statt. Mittels des VisiBlue™ Transilluminators (Tabelle 9.2) wurde die DNA veranschaulicht. Eine Aufnahme des Gels wurde mithilfe der Kamera Moticam 2500 erstellt.

3.7.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Die Quantitative Echtzeit-PCR ist eine Methode zur Analyse der Genexpression und ermöglicht die Quantifizierung der synthetisierten DNA in Echtzeit. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine qRT-PCR durchgeführt, die sich durch den zusätzlichen Einsatz einer Reversen Transkriptase auszeichnet, welche die Synthese von cDNA aus mRNA vermittelt (3.7.1.2). Um die amplifizierte DNA quantifizieren zu können, wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I verwendet. Durch die Bindung dieses Farbstoffs an eine doppelsträngige DNA entsteht ein Fluoreszenzsignal, das proportional zur DNA-Menge ist. Die Quantifizierung der Gen-spezifischen mRNA wurde relativ zum Referenzgen 18S vorgenommen.

Für die qRT-PCR war zunächst die Isolierung der RNA notwendig. Anschließend wurde die Expression von *ech-1* in *C. elegans* mittels der qRT-PCR quantifiziert.

3.7.2.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA aus *C. elegans* wurde das Roti®-Prep RNA MINI Kit (Tabelle 9.28) genutzt. Um genügend RNA zu erhalten, wurden etwa 8.000 Nematoden benötigt, die in drei 24-Well-Platten aufgezogen wurden. Nach der Hitzeschockbehandlung (1,5 h bei 35°C) wurden die Nematoden aus den Plattenvertiefungen gruppenweise in die Zentrifugenröhrchen überführt. Nach dem Waschen der Nematoden (vgl. 3.4) wurde der Überstand weitestgehend abgesaugt und das Nematodenpellet in ein 2 ml Schraubdeckelgefäß (*Micro Packaging Vials*™, Tabelle 9.1) überführt. Anschließend wurde das Pellet mit 450 µl des im Kit enthaltenen Lysis-Puffers LSR versetzt und für mindestens 24 h bei -80°C eingefroren. Danach wurden die Nematoden auf Raumtemperatur (RT) aufgetaut und pro Gefäß wurden 52 Keramikkügelchen hinzugefügt. Der erste Schritt für die RNA-Isolierung erfolgte im Precellys-Homogenisator bei 5400 rpm für 2x 20 s mit einer Pause von 10 s. Um das Lysat mit der enthaltenen RNA von den Feststoffen abtrennen zu können, erfolgte eine Zentrifugation bei 5100 x g für 2 min in der Mikroliter-Zentrifuge. Um die RNA aus dem Lysat zu isolieren, wurde gemäß der Gebrauchsanleitung des verwendeten Roti®-Prep RNA MINI Kits vorgegangen, das im Wesentlichen durch die Verwendung verschiedener Aufreinigungssäulen gekennzeichnet war.

Die eluierte RNA wurde anschließend auf Eis gelagert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die Quantifizierung der spezifischen mRNAs erfolgte die Einstellung der Konzentration für die 18S mRNA mit DEPC-Wasser auf 0,01 ng/µl und für die *ech-1* mRNA auf 10 ng/µl.

3.7.2.2 qRT-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde das Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit (Tabelle 9.28) für die Durchführung einer qRT-PCR verwendet. Da es sich um ein *1-Step* Kit handelte, wurde die reverse Transkription und die PCR in einem Schritt ausgeführt. Der Ansatz erfolgte in einem Volumen von 10 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

- 5 µl SYBR Green I Mastermix
- 0,4 µl Reverse Transkriptase [200 U/µl]
- 0,75 µl *Forward* Primer [1 µM]
- 1,25 µl *Reverse* Primer [1 µM]
- 1,6 µl Nuklease-freies Wasser
- 1 µl Template RNA

Zunächst erfolgte die Herstellung des Mastermixes, der aus dem SYBR Green I Mastermix, der Reversen Transkriptase, den *Forward*- und *Reverse*-Primern sowie dem Nuklease-freien Wasser bestand. Der Mastermix wurde anschließend in die qPCR-Reaktionsgefäße (Rotor Gene Tubes für Rotor Gene-Q Real-time PCR Cycler) vorgelegt. Jede Probe wurde 4-fach mit dem mit 18S Primern versetzten Mastermix und 4-fach mit dem mit *ech-1* Primern versetzten Mastermix angesetzt. Zur Kontrolle von DNA-Verunreinigungen wurde stets von jedem Mastermix eine *no template control* (NTC) mitgeführt, in der dem Mastermix statt der Template-RNA 1 μ l Nuklease-freies Wasser hinzugefügt wurde. Im Anschluss an die Komplettierung des Ansatzes durch Hinzufügen der Template RNA wurden die Reaktionsgefäße verschlossen und in den Rotor Gene-Q Real-time PCR Cycler (Tabelle 9.2) einsortiert, um die qRT-PCR unter den im Folgenden aufgeführten Konditionen zu starten.

Tabelle 3.2: Zyklus-Einstellungen für qRT-PCR

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

Die durch die Rotor-Gene Q Series Software (Tabelle 9.30) gemessenen Fluoreszenzsignale wurden automatisch als Kurven dargestellt, anhand derer die Software die einzelnen *Cycle Threshold* (C_T)-Werte ermittelte. Als C_T -Wert wird der Zyklus beschrieben, in dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal einen als Basis-Fluoreszenz definierten Grenzwert exponentiell überschreitet. Da von jeder Probe eine 4-fach Bestimmung angefertigt wurde, erfolgte im ersten Schritt für jeden C_T -Wert die Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung. Um die Genexpression relativ quantifizieren zu können, wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewendet [323]. Zunächst wurde für jede untersuchte Probe der C_T -Wert des Referenzgens vom C_T -Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert (ΔC_T). Nach dem die C_T -Werte auf diese Weise normiert wurden, wurde der ΔC_T -Wert der Kontrolle von dem ΔC_T -Wert der experimentell

behandelten Probe subtrahiert ($\Delta\Delta C_T$). Anschließend wurde die Ratio der $\Delta\Delta C_T$ -Werte (*fold change*) rechnerisch ermittelt, um die relativen Expressionsunterschiede darstellen zu können.

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

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Behandlung} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio (fold change)} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

3.8 Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse beruhen auf mindestens 2 unabhängigen Experimenten, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (Fluoreszenz von SOD-3::GFP, DHE, NIAD-4 und Lysotracker®Red), der Proteasomaktivitäts-Messung und der qRT-PCR werden durch ein jeweils repräsentatives Ergebnis dargestellt. Die Ergebnisse der Paralyse-Messungen und der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der DAF-16::GFP-Translokation zeigen eine Zusammenfassung von mindestens vier unabhängigen Experimenten. Es wurden folgende Signifikanzniveaus festgelegt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Alle Ergebnisse wurden auf die Kontrolle (100 %) normalisiert und als Balkendiagramme mit Mittelwert \pm Standardabweichung (SD; engl. *standard deviation*) dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppenanzahl entweder der unpaarige t-Test oder die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zusammen mit dem Bonferroni Anschlussstest angewendet.

4 ERGEBNISSE

Um die pathologischen Vorgänge während der AD ergründen zu können, finden in der Forschung zahlreiche Modellorganismen eine Anwendung. Im Zentrum des Forschungsinteresses stehen dabei die senilen Plaques, die einen wichtigen Marker für die AD-Erkrankung darstellen und auf einem gestörten APP-Stoffwechsel beruhen. Der transgene *C. elegans* Stamm CL2006 exprimiert das humane A β ₁₋₄₂ in seinen Körperwandmuskelzellen, wodurch die als Alzheimer-Phänotyp bezeichnete charakteristische Paralyse des Nematoden entsteht. REGITZ und WENZEL konnten zeigen, dass CL2006 eine vermehrte Proteinaggregation aufweist, die durch die Cholesterolreduktion im Medium vermindert werden konnte [324]. Cholesterol wird in *C. elegans* mittels des Steroid-Signalweges zu dafachronischen Säuren verstoffwechselt, die als Liganden für den nukleären Hormonrezeptor DAF-12 dienen, dessen Aktivierung sich als Paralyse-steigernd erwiesen hat [273, 324].

4.1 Interaktionen zwischen dem Steroid-Signalweg und Insulin/IGF-Signalweg beeinflussen die A β -induzierte Paralyse in CL2006

4.1.1 Die Aktivierung des nukleären Hormonrezeptors DAF-12 des Steroid-Signalweges steigert die Paralyse in CL2006

Cholesterol ist für *C. elegans* ein Metabolit, der über die Nahrung aufgenommen werden muss und der als Ausgangsstoff für die Synthese von dafachronischen Säuren dient. Der Steroid-Signalweg vermittelt diese Verstoffwechslung, um Liganden für den nukleären Hormonrezeptor DAF-12 zu synthetisieren. DAF-12 agiert nach Bindung der Liganden als Transkriptionsfaktor und beeinflusst die Expression zahlreicher Gene.

Zum Steroid-Signalweg gehören verschiedene Mitglieder, deren Relevanz für die Ausprägung des Alzheimer-Phänotyps schon zum Teil durch REGITZ und WENZEL untersucht wurden [324]. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivität der Cytochrom P450-abhängigen Hydroxylase DAF-9, welche die Oxidation von 7-Dehydrocholesterol zu dafachronischen Säuren vornimmt, und des nukleären Hormonrezeptors DAF-12 eine steigernde Wirkung auf die Paralyse besitzen. Mittels der RNAi vermittelten Hemmung der Genexpression von *daf-36*, das für eine Rieske-ähnliche Oxygenase kodiert und innerhalb des Steroid-Signalweges stromaufwärts von DAF-9 und DAF-12 Cholesterol zu 7-Dehydrocholesterol oxidiert, sollte dessen Bedeutung für die Ausprägung der Paralyse überprüft werden. Es zeigt sich, dass die RNAi von *daf-36* eine Senkung der Paralyserate zur Folge hatte (Abbildung 4.1 B). Zusätzlich wurde die Rolle von

NHR-8 für die A β -Toxizität in CL2006 überprüft, da dieser nukleäre Hormonrezeptor als regulierend für die Funktion des Steroid-Signalweges und der Cholesteroll-Homöostase beschrieben wird [283]. Die RNAi vermittelte Hemmung der *nhr-8*-Expression resultierte ebenfalls in einer signifikanten Reduktion der Paralyserate (Abbildung 4.1 A). Beide Ergebnisse unterstützen die These, dass ein aktivierter Steroid-Signalweg die Ausprägung des Alzheimer-Phänotyps in CL2006 steigert.

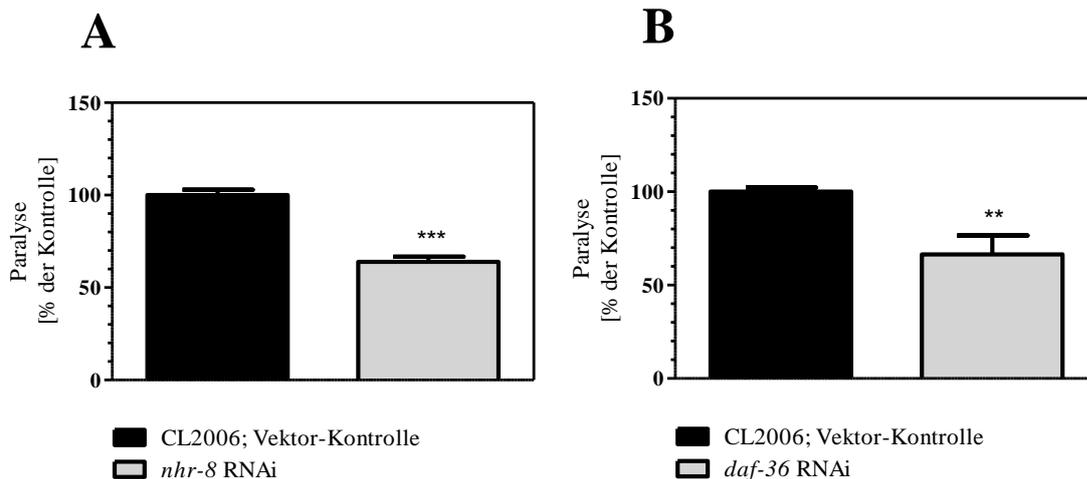


Abbildung 4.1: Paralyseraten von CL2006 nach *nhr-8* bzw. *daf-36* RNAi.

Die Paralyseraten von CL2006 wurden nach *nhr-8* (A) bzw. *daf-36* RNAi (B) sowie nach einem 1,5-stündigen Hitzeschock bei 35°C in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden ermittelt. **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. Kontrolle

4.1.2 Der Einfluss von DAF-12 auf die Paralyse in CL2006 wird durch dessen Interaktion mit DAF-16 des Insulin/IGF-Signalweges vermittelt

Der DAF-16 Transkriptionsfaktor ist neben DAF-12 ein weiterer Faktor, der einen regulierenden Einfluss auf die Langlebigkeit von *C. elegans* hat. Für die transkriptionelle Aktivität der beiden Faktoren wird eine Abhängigkeit diskutiert, die durch eine Hemmung von DAF-16 durch das Liganden-gebundene DAF-12 charakterisiert ist [271]. Demnach ist DAF-16 stromabwärts des Steroid-Signalweges positioniert. REGITZ und WENZEL haben bereits in diesem Zusammenhang beschrieben, dass während einer Doppel-RNAi von *daf-16* und *daf-12* der Paralyse-steigernde Effekt der *daf-16* RNAi dominant über den Paralyse-senkenden Effekt der *daf-12* RNAi ist [324]. Der DAF-16 Transkriptionsfaktor reguliert in *C. elegans* die Expression von Stressresistenzgenen, deren Fehlen offenbar die A β -Toxizität steigert.

Durch Doppel-RNAi von *nhr-8* bzw. *daf-36* sollte ermittelt werden, ob die stromaufwärts gelegenen Mitglieder des Steroid-Signalweges ebenfalls durch eine Hemmung von DAF-16 Paralyse-steigernd wirken. Entsprechend der Beschreibung im Methodenteil (3.1.5), wurde im

Vergleich zur alleinigen RNAi (Abbildung 4.1) nur die Hälfte an *nhr-8* bzw. *daf-36* RNAi-Bakterien eingesetzt. Dennoch fand sich auch unter dieser Konstellation eine signifikante Reduktion der Paralyse durch die *nhr-8* (Abbildung 4.2 A) bzw. *daf-36* RNAi (Abbildung 4.2 B). Die RNAi von *daf-16* wirkt auch in verdünnter Form Paralyse-steigernd und erweist sich sowohl hinsichtlich der Effekte der *nhr-8* RNAi als auch der *daf-36* RNAi wiederum als dominant (Abbildung 4.2). Damit konnte gezeigt werden, dass sowohl NHR-8 als auch DAF-36 als Mitglieder des Steroid-Signalweges die DAF-16 Aktivität hemmen und dadurch die Paralyse in CL2006 steigern.

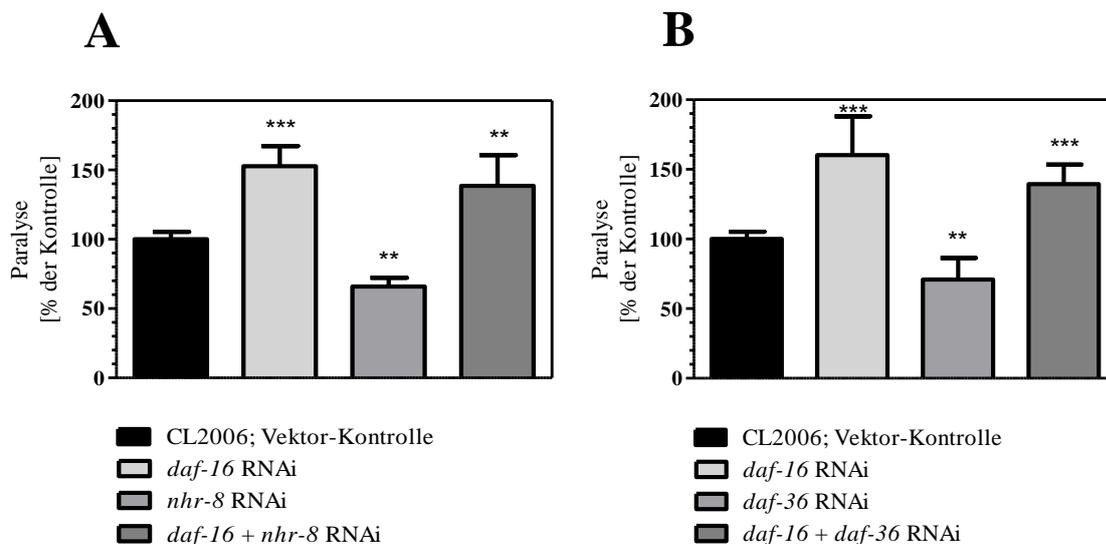


Abbildung 4.2: Paralyseraten von CL2006 nach simultaner RNAi von *nhr-8* bzw. *daf-36* und *daf-16*.

Die Paralyseraten von CL2006 wurden nach Doppel-RNAi des Transkriptionsfaktors *daf-16* und *nhr-8* (A) bzw. nach Doppel-RNAi von *daf-16* und *daf-36* RNAi (B) sowie nach einem 1,5-stündigen Hitzeschock bei 35°C in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden ermittelt. **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. Kontrolle

4.1.3 Die Mitglieder des Steroid-Signalweges hemmen die nukleäre DAF-16-Lokalisation

Da DAF-16 ein Transkriptionsfaktor ist, wäre neben der Beeinflussung seiner Expression auch dessen Lokalisation im Nukleus ein Regulationsmechanismus, über den die Mitglieder des Steroid-Signalweges Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von DAF-16 nehmen könnten. Um dies zu überprüfen, wurde der transgene *C. elegans* Stamm TJ356 verwendet, der ein DAF-16::GFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des *daf-16*-Promotors exprimiert.

Die RNAi von *nhr-8*, *daf-36*, *daf-9* und *daf-12* resultierten jeweils in einer signifikanten Steigerung der nukleären DAF-16-Lokalisation (Abbildung 4.3), durch die die Annahme der hemmenden Wirkung des Steroid-Signalweges auf die Aktivität von DAF-16 gestützt werden kann.

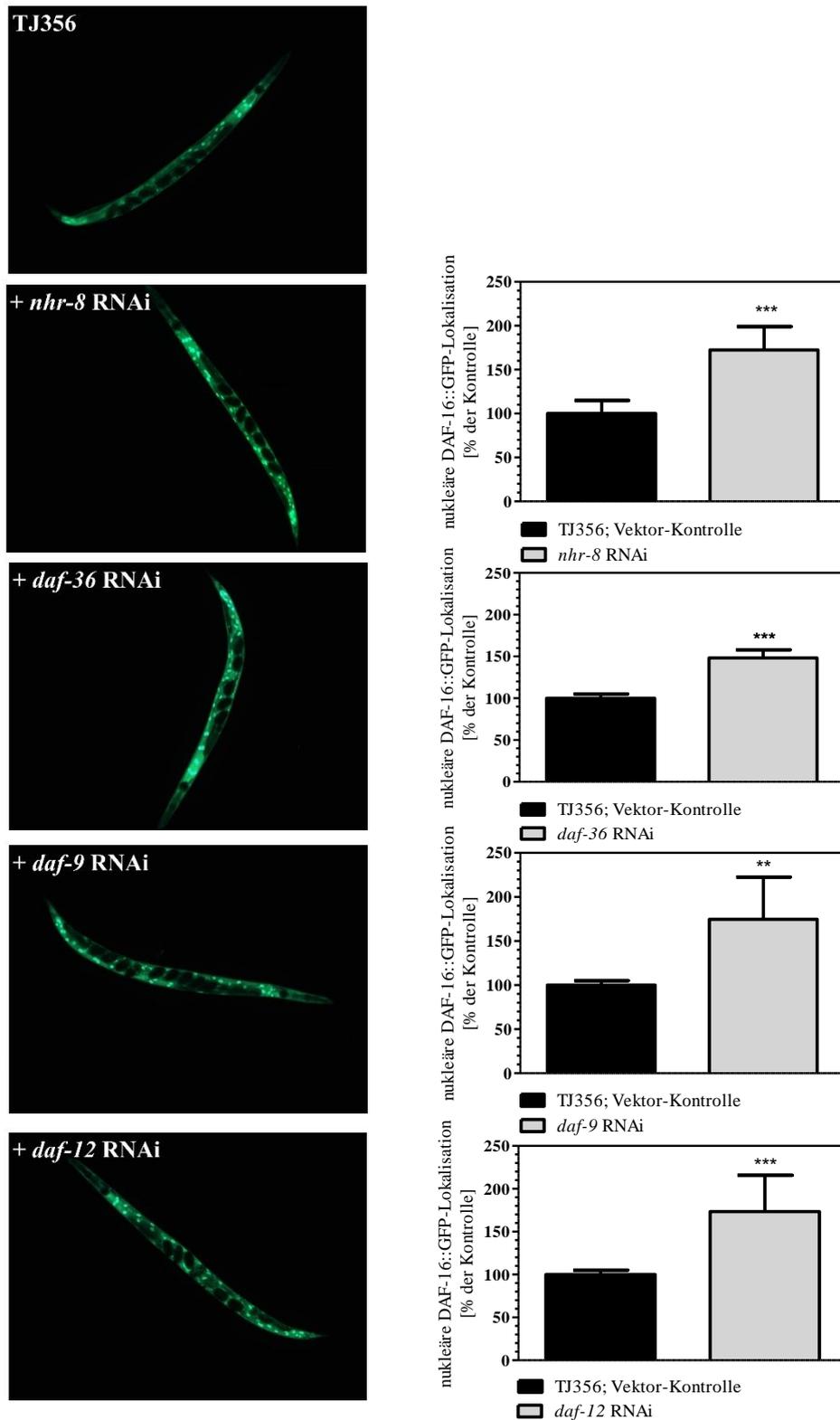


Abbildung 4.3: Nukleäre DAF-16::GFP-Lokalisation in TJ356 nach RNAi der Mitglieder des Steroid-Signalweges.

Nachweis der nukleären DAF-16::GFP-Lokalisation nach *nhr-8* RNAi, *daf-36* RNAi, *daf-9* RNAi bzw. *daf-12* RNAi. Die nukleäre DAF-16::GFP-Lokalisation wurde in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden nach 1-stündigem Hitzeschock (35°C) mit folgender 1-stündiger Inkubation bei 20°C gemessen. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

Um nachzuweisen, dass die nukleäre Lokalisation von DAF-16 mit einer transkriptionellen Aktivität einhergeht, wurde im Folgenden die Expression des Superoxid-Dismutase Gens *sod-3* untersucht, das ein Zielgen des Transkriptionsfaktors darstellt. Zu diesem Zweck erfolgte die Verwendung des transgenen *C. elegans* Stamms CF1553, der durch ein *sod-3::gfp*-Transgen gekennzeichnet ist und damit die SOD-3-Expression anhand des gekoppelten Fluoreszenz-Markers veranschaulicht. Zunächst wurde durch die *daf-16* RNAi in CF1553 gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Einfluss auf die SOD-3-Expression hat. So war eine Reduktion der SOD-3-Expression unter *daf-16* RNAi um 34 % \pm 10 zu beobachten (Abbildung 4.4).

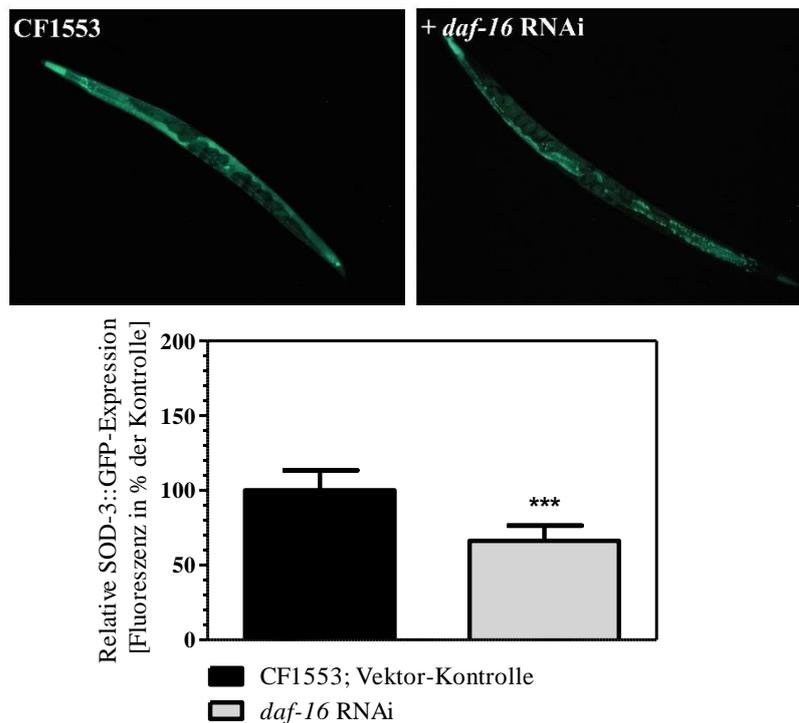


Abbildung 4.4: Relative SOD-3::GFP-Expression in CF1553 nach *daf-16* RNAi.

Quantifizierung der SOD-3::GFP-Expression nach *daf-16* RNAi. Die Messung wurde in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden nach 1,5-stündigem Hitzeschock (35°C) vorgenommen. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

Um zu zeigen, dass die Effekte der DAF-16-Aktivität auf die Paralyse u.a. durch transkriptionelle Einflüsse auf die SOD-3-Expression vermittelt werden, wurde in CL2006 eine *sod-3* RNAi durchgeführt. Die RNAi-vermittelte Verminderung der SOD-3-Expression bewirkte in CL2006 eine Steigerung der Paralyserate um 22 % \pm 7, wodurch die protektive Funktion der Superoxid-Dismutase gegenüber der A β -Toxizität verdeutlicht wird (Abbildung 4.5). Daher kann die Annahme getroffen werden, dass zumindest ein Teil der protektiven DAF-16-Aktivität durch transkriptionelle Aktivierung des *sod-3* Gens vermittelt wird.

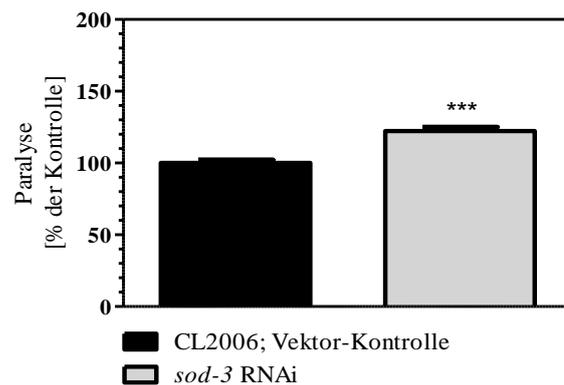


Abbildung 4.5: Paralyserate von CL2006 nach *sod-3* RNAi.

Die Paralyserate von CL2006 nach *sod-3* RNAi wurde nach einem 1,5-stündigen Hitzeschock bei 35°C in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden ermittelt. ***p < 0,001 vs. Kontrolle

Die daraufhin durchgeführte RNAi-vermittelte Hemmung des Steroid-Signalweges in CF1553 bestätigte die Vermutung, dass die infolge dieser Behandlung induzierte gesteigerte nukleäre Lokalisation von DAF-16 (Abbildung 4.3) auch mit einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität für dessen Zielgene einhergeht (Abbildung 4.6). Infolge der *nhr-8* RNAi konnte in CF1553 eine um 28 % ± 25 signifikant gesteigerte *sod-3* Promotoraktivität im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Die *daf-36* RNAi erhöhte die SOD-3-Expression um 41 % ± 22 im Vergleich zur Vektor-Kontrolle, ähnlich wie die *daf-9* RNAi (42 % ± 14) und die *daf-12* RNAi (38 % ± 19).

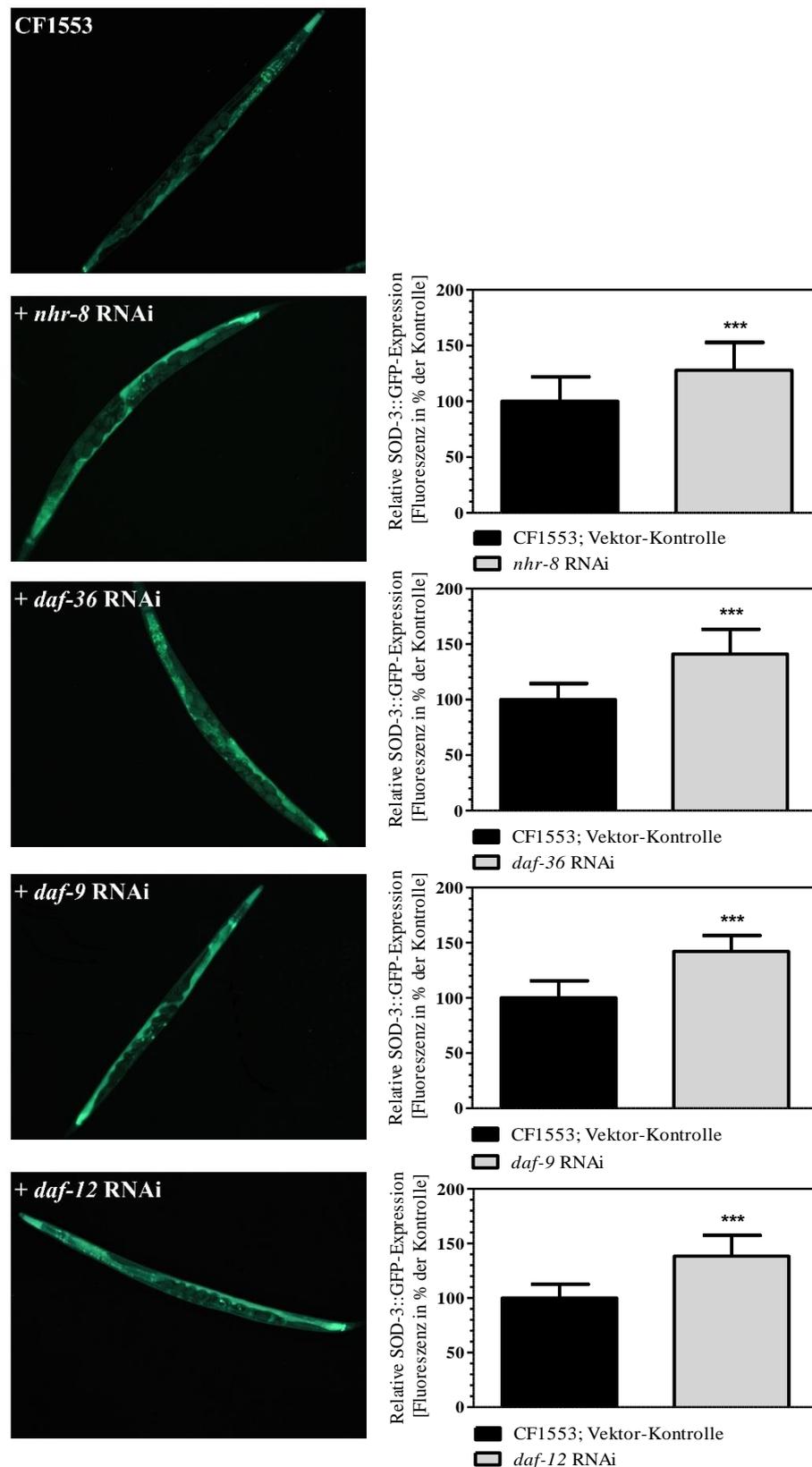


Abbildung 4.6: Relative SOD-3::GFP-Expression in CF1553 nach RNAi der Mitglieder des Steroidsignalweges.

Quantifizierung der SOD-3::GFP-Expression nach *nhr-8* RNAi, *daf-36* RNAi, *daf-9* RNAi bzw. *daf-12* RNAi. Die Messung wurde in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden nach 1,5-stündigem Hitzeschock (35°C) vorgenommen. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

Im nächsten Schritt wurde als Nachweis der Abhängigkeit der erhöhten SOD-3-Expression ein simultaner *knock-down* von *daf-16* und des jeweiligen Mitglieds des Steroid-Signalweges in CF1553 mittels einer Doppel-RNAi durchgeführt. Wie aus der Abbildung 4.7 hervorgeht, führte die RNAi von *nhr-8*, *daf-36*, *daf-9* und *daf-12* jeweils zu einer signifikanten Erhöhung der SOD-3-Expression gegenüber der Vektor-Kontrolle. Der *knock-down* von *daf-16* resultierte auch bei reduzierter Menge an RNAi-Bakterien, die sich aus der Doppel-RNAi ergab, in einer signifikanten Reduktion der SOD-3-Expression (vgl. Abbildung 4.4). Diese durch die *daf-16* RNAi erzielte Reduktion der SOD-3-Expression war dominant über die durch *nhr-8*, *daf-36*, *daf-9* bzw. *daf-12* induzierte Erhöhungen der SOD-3-Menge (Abbildung 4.7). Letztendlich konnte damit gezeigt werden, dass durch das Fehlen von DAF-16 der steigernde Effekt auf die SOD-3::GFP-Expression, der durch die Hemmung des Steroid-Signalweges induziert wird, ausbleibt.

Insgesamt lässt sich aus den gezeigten Ergebnissen schlussfolgern, dass die protektive Wirkung des gehemmten Steroidsignalwegs auf die Paralyse von CL2006 auf der gesteigerten Aktivität des DAF-16 Transkriptionsfaktors und der damit assoziierten gesteigerten Expression des antioxidativ wirksamen Enzyms SOD-3 beruht.

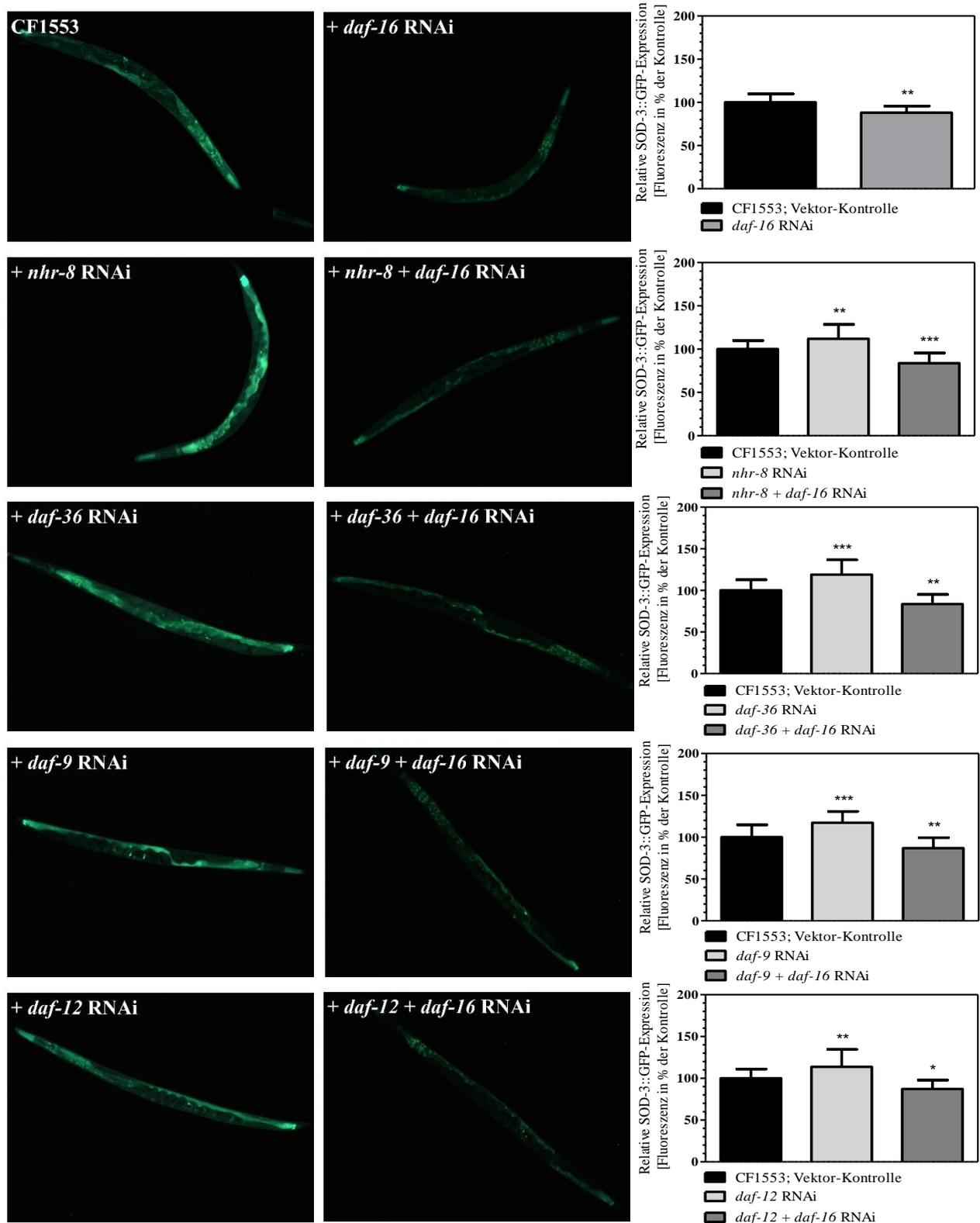


Abbildung 4.7: Relative SOD-3::GFP-Expression in CF1553 nach Doppel-RNAi von *daf-16* und jeweils einem der Mitglieder des Steroidsignalweges.

Quantifizierung der SOD-3::GFP-Expression nach Doppel-RNAi von *daf-16* RNAi und *nhr-8* RNAi, *daf-16* RNAi und *daf-36* RNAi, *daf-16* RNAi und *daf-9* RNAi bzw. *daf-16* RNAi und *daf-12* RNAi. Die Messung wurde in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden nach 1,5-stündigem Hitzeschock (35°C) vorgenommen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

4.2 Interaktion von Cholesterol und Cholecalciferol mit dem Steroid-Signalweg

4.2.1 Cholesterol aktiviert den Steroid-Signalweg und steigert die Paralyse in CL2006

Cholesterol dient dem mit dem nukleären Hormonrezeptor DAF-12 assoziierten Steroid-Signalweg als Ausgangssubstrat für die Synthese von dafachronischen Säuren, die final als Liganden für DAF-12 fungieren. Daher sollte untersucht werden, ob eine erhöhte Cholesterolzufuhr die als Folge eines gehemmten Steroid-Signalweges reduzierte Paralyse steigern kann.

Zu diesem Zweck wurden die CL2006 Nematoden ab dem L1-Stadium in einem NGM aufgezogen, das 15 µg/ml Cholesterol statt der sonst regulären 5 µg/ml Cholesterol in der Kontrolle enthielt. In Abbildung 4.8 sind die Effekte einer Cholesterol-supplementation auf die durch RNAi verschiedener Mitglieder des Steroid-Signalweges induzierte reduzierte Paralyse gezeigt. Zunächst kann festgestellt werden, dass die Aufzucht der Nematoden mit einer Cholesterolkonzentration von 15 µg/ml keinen signifikanten Effekt im Vergleich zur Vektor-Kontrolle mit 5 µg/ml Cholesterol auf die Paralyse hat. Wie bereits in Abbildung 4.1 gezeigt, führt die RNAi-vermittelte Reduktion der Expression von *nhr-8*, *daf-36*, *daf-9* bzw. *daf-12* jeweils zu einer signifikanten Senkung der Paralyse gegenüber der Vektor-Kontrolle. Die Aufzucht der Nematoden in einem NGM mit einer erhöhten Cholesterolkonzentration von 15 µg/ml steigert die Paralyseraten unter allen *knock-downs* auf das Niveau der Kontrolle (Abbildung 4.8). Es scheint plausibel, dass aufgrund der unter RNAi bestehenden Restaktivitäten, die Aktivierung des Steroid-Signalweges durch die erhöhte Verfügbarkeit des Substrats die Paralyse-Steigerung verursacht.

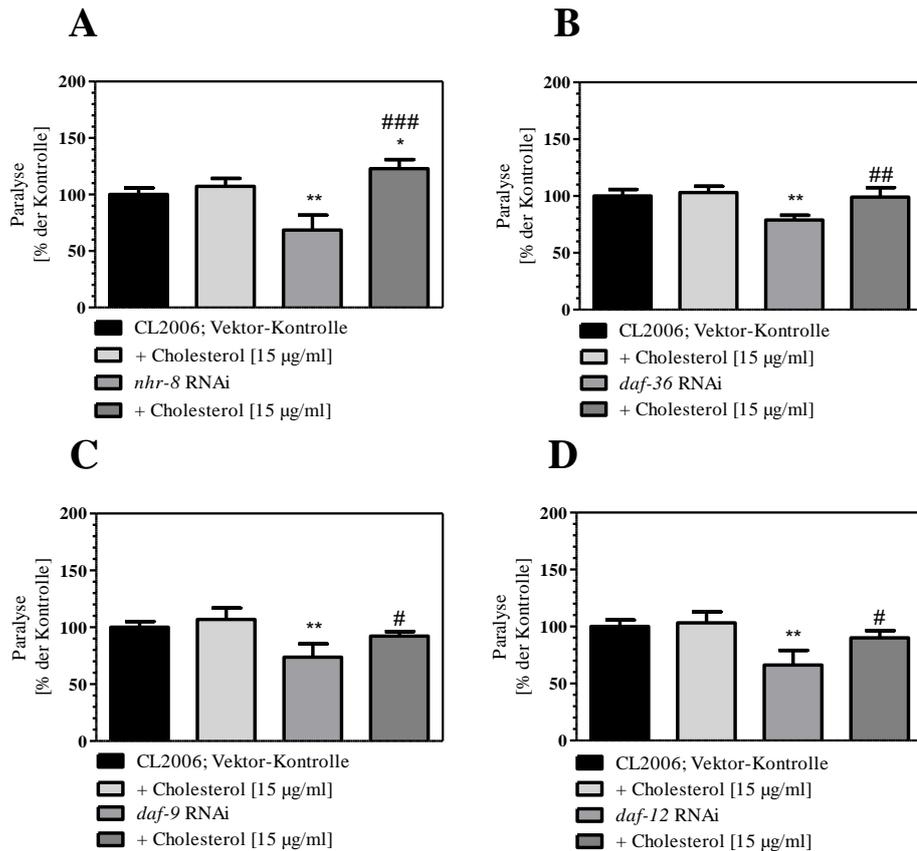


Abbildung 4.8: Einfluss einer erhöhten Cholesterolzufuhr auf die Paralyserate in CL2006 unter RNAi verschiedener Mitglieder des Steroid-Signalweges.

Die Paralyserate von CL2006 nach *nhr-8* (A), *daf-36* (B), *daf-9* (C), *daf-12* RNAi (D) und erhöhter Cholesterolzufuhr [15 µg/ml] ab dem L1-Stadium wurde nach einem 1,5-stündigen Hitzeschock bei 35°C in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden ermittelt. *p < 0,05, **p < 0,01 vs. Kontrolle; #p < 0,05, ###p < 0,01, ####p < 0,001 vs. RNAi-Gruppe

Da bereits die Relevanz der Aktivität des Steroid-Signalweges für die nukleäre Lokalisation und Aktivität von DAF-16 herausgestellt wurde (4.1.3), soll auch der Effekt der erhöhten Cholesterolzufuhr auf die DAF-16-Lokalisation beschrieben werden. Dazu wurden die TJ356 Nematoden jeweils mit einer erhöhten Zufuhr an Cholesterol [15 µg/ml] unter RNAi eines Mitglieds des Steroid-Signalweges behandelt. Wie entsprechend der Effekte einer erhöhten Cholesterolzufuhr auf die Paralyserate in CL2006 (Abbildung 4.8) zu erwarten war, zeigte sich, dass die alleinige Gabe von 15 µg/ml Cholesterol auch keinen signifikanten Effekt auf die nukleäre DAF-16::GFP-Lokalisation hat (Abbildung 4.9). Die RNAi der Mitglieder des Steroid-Signalweges bewirkten, wie bereits in Abbildung 4.3 gezeigt, eine signifikante Steigerung der nukleären DAF-16::GFP-Lokalisation im Vergleich zur Vektor-Kontrolle. Wenn hingegen der Steroid-Signalweg unter erhöhter Cholesterolzufuhr in TJ356 aktiviert wird, bleibt der durch den *knock-down* erzielte steigernde Effekt auf die nukleäre DAF-16-Lokalisation aus. Daraus lässt sich schließen, dass die Hemmung des Steroid-Signalweges, die durch die RNAi einzelner Mitglieder vermittelt wird, durch die erhöhte Cholesterolzufuhr ausgeglichen wird.

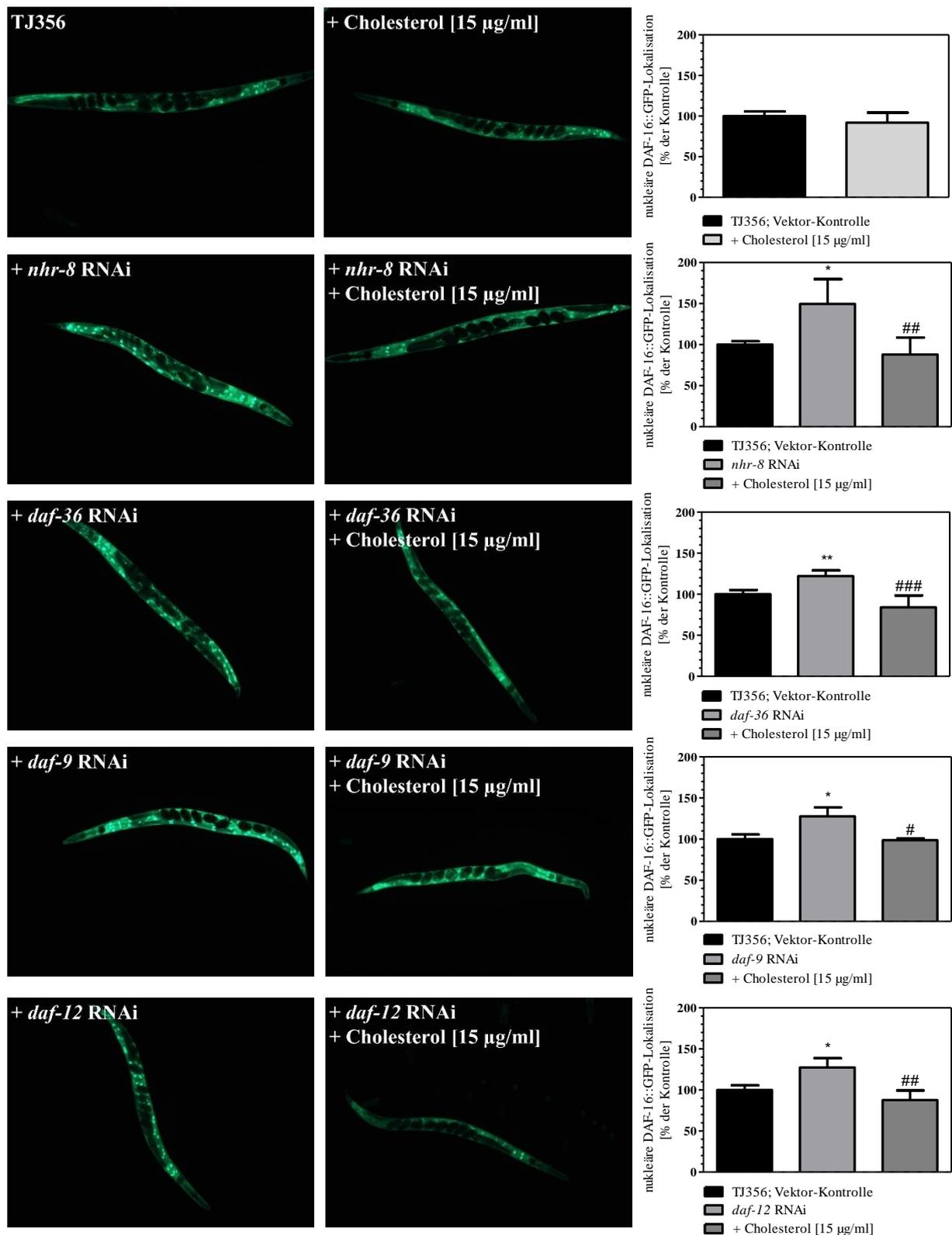


Abbildung 4.9: Nukleäre DAF-16::GFP Lokalisation in TJ356 nach Hemmung des Steroid-Signalweges und erhöhter Cholesterolzufuhr.

Nachweis der nukleären DAF-16::GFP-Lokalisation nach erhöhter Cholesterolzufuhr [15 µg/ml] ab dem L1-Stadium und der RNAi des Steroid-Signalweges. Die nukleäre DAF-16::GFP-Lokalisation wurde in 2 Tage alten Jungadulten Nematoden nach 1-stündigem Hitzeschock (35°C) mit folgender 1-stündiger Inkubation bei 20°C gemessen. *p < 0,05, **p < 0,01 vs. Kontrolle; #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 vs. RNAi-Gruppe

Mittels des blau-fluoreszierenden Cholesterol-Analogons DHE, das in der Aufzucht von *C. elegans* statt Cholesterol als Sterolquelle eingesetzt werden kann, sind Rückschlüsse auf die relative Cholesterolaufnahme in *C. elegans* möglich. Um also die erhöhte zelluläre Verfügbarkeit von Cholesterol nachzuweisen, wurde auch die DHE-Konzentration 3-fach erhöht. Als Standardkonzentration wurde 100 μM DHE verwendet, eine Mindestkonzentration, die notwendig ist, um den Fluoreszenznachweis zu ermöglichen. Durch die Aufzucht der Nematoden in einem NGM mit 300 μM DHE konnte eine signifikante Steigerung der DHE-Fluoreszenz um $42\% \pm 33$ im Intestinaltrakt verzeichnet werden. Der *knock-down* des Cholesteroltransporters VIT-6 [325] resultierte hingegen in einer um $48\% \pm 23$ reduzierten Aufnahme von DHE im Vergleich zur Vektor-Kontrolle. Unter *vit-6* RNAi konnte die DHE-Aufnahme durch Erhöhung der DHE-Konzentration nicht mehr gesteigert werden (Abbildung 4.10). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass bei einem erhöhten Angebot von DHE bzw. Cholesterol auch mehr der Substrate durch VIT-6 aufgenommen werden.

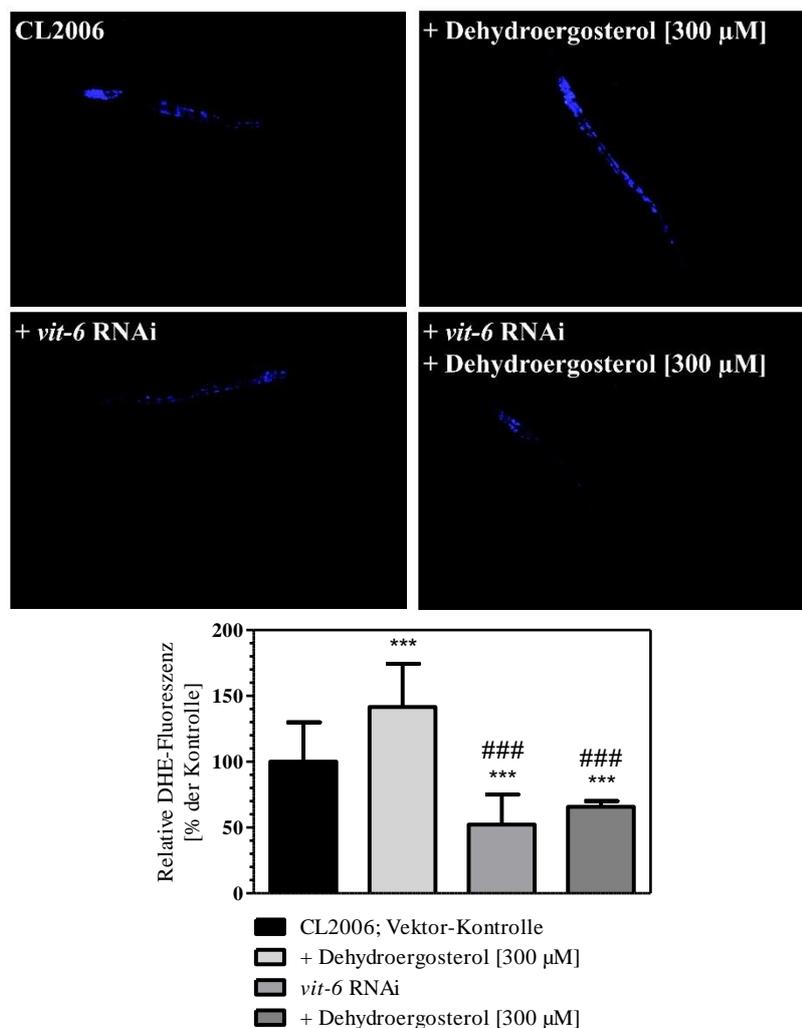


Abbildung 4.10: Relative DHE-Fluoreszenz in CL2006 nach *vit-6* RNAi und erhöhter DHE-Zufuhr.

Quantifizierung der DHE-Fluoreszenz in CL2006 nach *vit-6* RNAi und erhöhter DHE-Zufuhr [300 μM] ab dem L1-Stadium in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; ### $p < 0,001$ vs. DHE [300 μM]

Dass die reduzierte Cholesterolverorgung unter *vit-6* RNAi die Paralyse in CL2006 mindert, konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden [324]. Der Einfluss der Cholesterolaufnahme auf die Aktivität des Steroid-Signalweges und die Ausprägung der Paralyse konnte in der vorliegenden Arbeit weiter bestätigt werden. Während unter erhöhter Cholesterolkonzentration kein Paralyse-senkender Effekt der *nhr-8* RNAi auftrat, war unter Doppel-RNAi von *nhr-8* und *vit-6* eine signifikant reduzierte Paralyse festzustellen (Abbildung 4.11). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Aktivität des Steroid-Signalweges und damit die Ausprägung der Paralyserate in CL2006 abhängig vom VIT-6-vermittelten Cholesteroltransport ist.

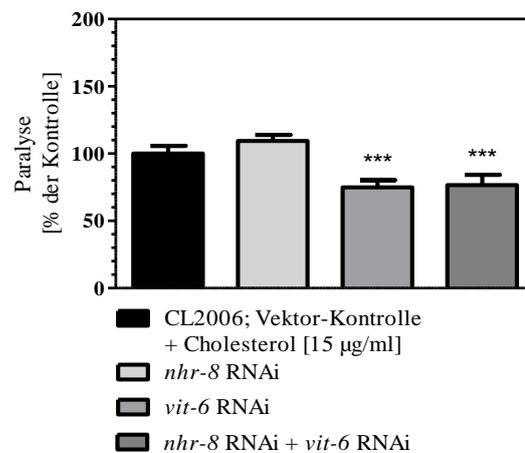


Abbildung 4.11: Paralyserate von CL2006 nach Doppel-RNAi von *nhr-8* und *vit-6* bei erhöhter Cholesterolfuhr.

Die Paralyserate von CL2006 wurde nach Doppel-RNAi von *nhr-8* und *vit-6* bei erhöhter Cholesterolfuhr [15 µg/ml] ab dem L1-Stadium nach einem 1,5-stündigen Hitzeschock bei 35°C in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden ermittelt. ***p < 0,001 vs. Kontrolle

4.2.2 Cholecalciferol senkt die Paralyse in CL2006 durch die Hemmung des Steroid-Signalweges

Im Zusammenhang mit der AD-Pathogenese wird eine schlechte Versorgung mit Vitamin D₃, das auch als Cholecalciferol bezeichnet wird, mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert. Um zu untersuchen, ob die Aβ-Toxizität und damit die Ausbildung des Paralyse-Phänotyps in CL2006 durch Cholecalciferol beeinflusst werden kann, erfolgte eine 48 h andauernde Inkubation der CL2006 Nematoden ab dem jung-adulten Stadium mit Cholecalciferol in drei unterschiedlichen Konzentrationen. In Abbildung 4.12 ist dargestellt, dass die Behandlung mit Cholecalciferol in allen drei Konzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der Paralyserate in CL2006 führte, wobei in der niedrigsten Konzentration von 1 µM bereits der maximale Effekt erzielt wurde.

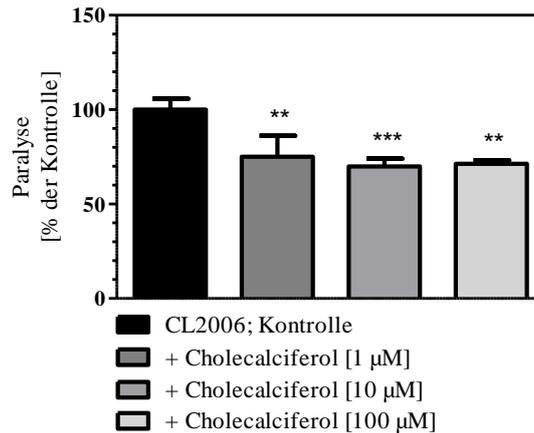


Abbildung 4.12: Paralyserate von CL2006 nach 48 h Inkubation mit 1 µM, 10 µM und 100 µM Cholecalciferol

Die Paralyserate von CL2006 wurde nach 48 h Inkubation mit 1 µM, 10 µM und 100 µM Cholecalciferol sowie nach einem 1,5-stündigen Hitzeschock bei 35°C in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden ermittelt. **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. Kontrolle

Cholecalciferol wird durch UV-Strahlung aus 7-Dehydrocholesterol gebildet und ist dementsprechend ein Strukturhomolog des Cholesterols. Um festzustellen, ob die beiden Strukturhomologe um die Bindungspartner des Steroid-Signalweges miteinander konkurrieren, wurde der Effekt von Cholecalciferol auf die Paralyse auch in Gegenwart erhöhter Cholesterolkonzentrationen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass durch die Applikation von 15 µg/ml Cholesterol der Paralyse-senkende Effekt von 1 µg/ml Cholecalciferol aufgehoben wurde (Abbildung 4.13). Dies lässt die Vermutung zu, dass Cholecalciferol und Cholesterol um den Cholesteroltransporter VIT-6 und/oder die Bindung eines oder mehrerer Mitglieder des Steroid-Signalweges konkurrieren.

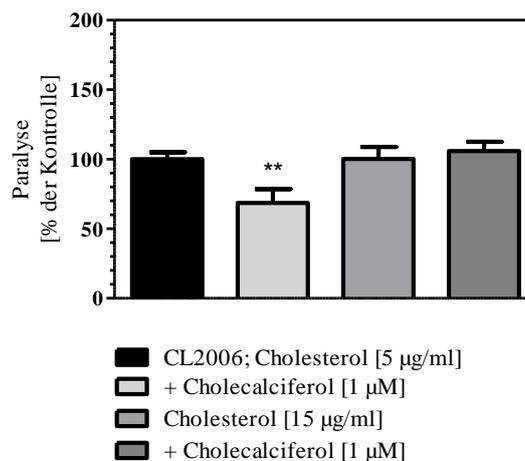


Abbildung 4.13: Paralyserate von CL2006 nach 48 h Inkubation mit 1 µM Cholecalciferol in An- und Abwesenheit erhöhter Cholesterolkonzentrationen.

Die Paralyserate von CL2006 wurde nach 48 h Inkubation mit 1 µM Cholecalciferol und erhöhter Cholesterolzufuhr [15 µg/ml] sowie nach einem 1,5-stündigen Hitzeschock bei 35°C in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden ermittelt. **p < 0,01 vs. Kontrolle

Tatsächlich bewirkte die Gabe von 1 μ M Cholecalciferol als auch der *knock-down* von *nhr-8*, *daf-36*, *daf-9* bzw. *daf-12* jeweils eine vergleichbare Senkung der Paralyserate (Abbildung 4.14). Da die Applikation von Cholecalciferol unter der jeweiligen RNAi keine zusätzliche Senkung der Paralyse mehr verursachte, ist davon auszugehen, dass Cholecalciferol den Steroid-Signalweg auf diesen Stufen hemmt.

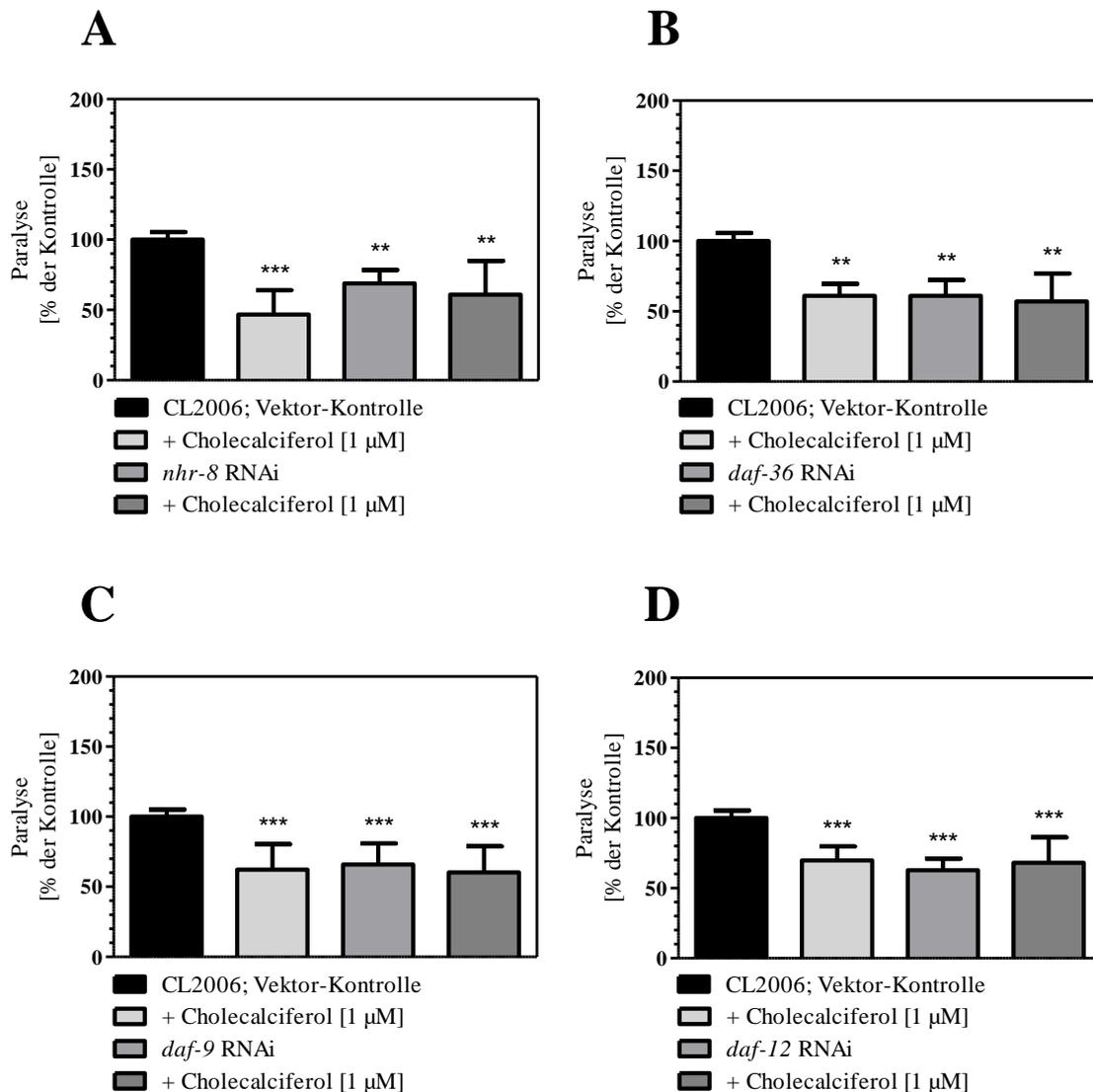


Abbildung 4.14: Paralyserate von CL2006 nach 48 h Inkubation mit 1 μ M Cholecalciferol unter Hemmung des Steroid-Signalweges.

Die Paralyserate von CL2006 wurde nach 48 h Inkubation mit 1 μ M Cholecalciferol unter *nhr-8* RNAi (A), *daf-36* RNAi (B), *daf-9* RNAi (C), *daf-12* RNAi (D) sowie nach einem 1,5-stündigen Hitzeschock bei 35°C in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden ermittelt. **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. Kontrolle

Um zu untersuchen, ob Cholecalciferol auch mit der Aufnahme des Cholesterols über VIT-6 interferiert, wurde wiederum DHE als fluoreszierendes Cholesterol-Homolog verwendet. Durch die 48-stündige Behandlung der CL2006 Nematoden mit 1 μ M Cholecalciferol konnte eine signifikante Reduktion der relativen DHE-Fluoreszenz im Intestinaltrakt um 20 % \pm 20 im

Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 4.15). Daraus lässt sich schließen, dass 1 μ M Cholecalciferol auch zu einer verminderten Aufnahme von Cholesterin in *C. elegans* führt und damit das Substrat für den Steroid-Signalweg limitiert. Des Weiteren wurde in diesem Zusammenhang die Relevanz des Cholesterin-Transportproteins VIT-6 für den gezeigten Effekt von Cholecalciferol untersucht. Die Tatsache, dass die DHE-Aufnahme nach der *vit-6* RNAi stärker reduziert wurde als durch Cholecalciferol (Abbildung 4.15), spricht dafür, dass Cholecalciferol in einer Konzentration von 1 μ M nicht in der Lage ist, VIT-6 vollständig zu inhibieren.

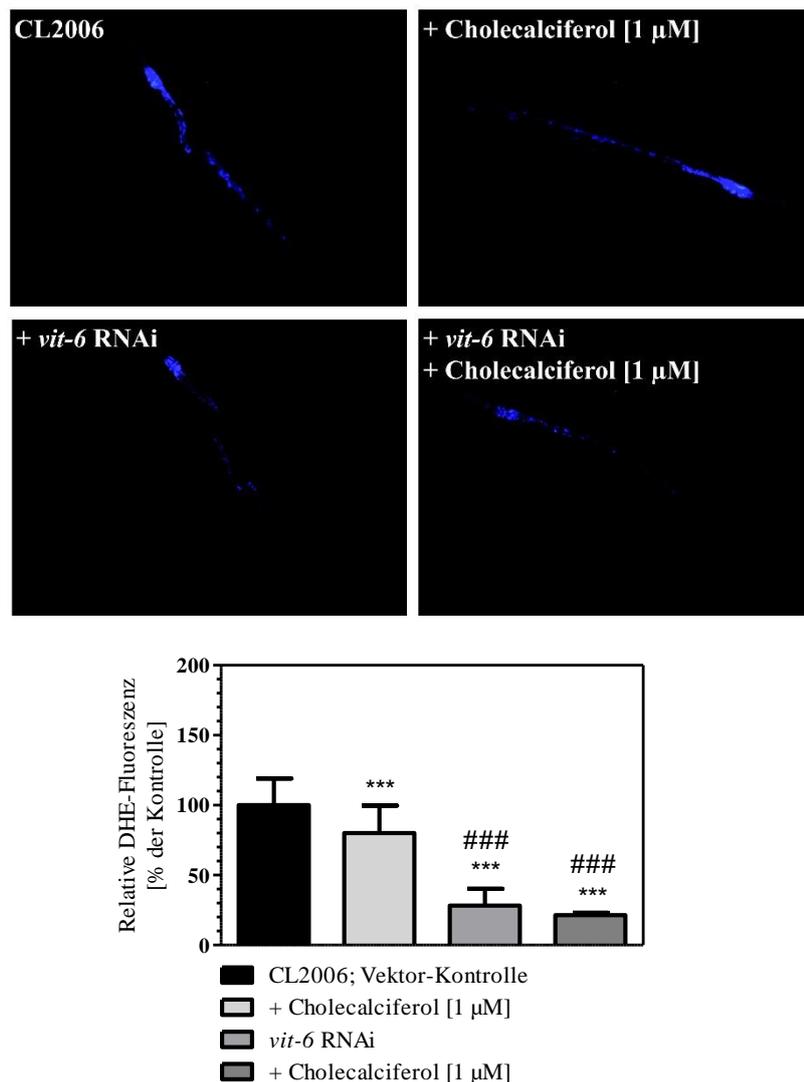


Abbildung 4.15: Relative DHE-Fluoreszenz in CL2006 nach 48 h Inkubation mit 1 μ M Cholecalciferol in An- und Abwesenheit einer *vit-6* RNAi.

Quantifizierung der DHE-Fluoreszenz in CL2006 nach 48 h Inkubation mit 1 μ M Cholecalciferol unter Hemmung der *vit-6* Expression in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; ### $p < 0,001$ vs. Cholecalciferol [1 μ M]

Da sich herausgestellt hat, dass Cholecalciferol mit Cholesterin um die Interaktion mit dem Cholesterintransporter VIT-6 und dem Steroid-Signalweg konkurriert, sollte im nächsten

Schritt die Relevanz des stromabwärts vom Steroid-Signalweg positionierten Transkriptionsfaktors DAF-16 für den Cholecalciferol-Effekt untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Paralyse von CL2006 infolge der Cholecalciferol-Behandlung unter *daf-16* RNAi bestimmt (Abbildung 4.16). Die Behandlung der CL2006 Nematoden mit *daf-16* RNAi allein induzierte die Erhöhung der Paralyserate um 49 % \pm 12 im Vergleich zur Vektor-Kontrolle. Durch die zusätzliche Behandlung mit 1 μ M Cholecalciferol konnte im Vergleich zur mit *daf-16* RNAi behandelten Gruppe kein Unterschied festgestellt werden, während Cholecalciferol in der Vektor-Kontrolle die Paralyse signifikant senkte. Der dominante Effekt der *daf-16* RNAi zeigt somit, dass Cholecalciferol den Transkriptionsfaktor aktiviert.

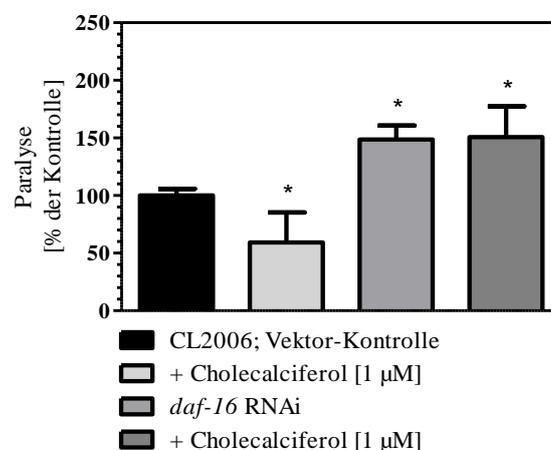


Abbildung 4.16: Paralyserate von CL2006 nach 48 h Inkubation mit 1 μ M Cholecalciferol unter Hemmung des Transkriptionsfaktors DAF-16.

Die Paralyserate von CL2006 wurde nach 48 h Inkubation mit 1 μ M Cholecalciferol unter *daf-16* RNAi sowie nach einem 1,5-stündigen Hitzeschock bei 35°C in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden ermittelt. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Zur Darstellung der nukleären Aktivität von DAF-16 unter dem Einfluss der Inkubation mit 1 μ M Cholecalciferol und der gleichzeitigen Hemmung von Mitgliedern des Steroid-Signalweges wurden wiederum TJ356 Nematoden verwendet. Aus der 48-stündigen Behandlung mit 1 μ M Cholecalciferol resultierte eine Steigerung der nukleären DAF-16::GFP-Lokalisation. Die Hemmung des Steroid-Signalweges bewirkte ebenso eine signifikante Steigerung der nukleären DAF-16::GFP-Translokation Vergleich zur Vektor-Kontrolle. Infolge der zusätzlichen Gabe von 1 μ M Cholecalciferol zu den RNAi behandelten Nematoden war kein additiver Effekt zu verzeichnen (Abbildung 4.17). Anhand der durchgeführten Untersuchung kann festgestellt werden, dass Cholecalciferol eine Steigerung der nukleären DAF-16::GFP-Lokalisation bewirkt, die auf die assoziierte Hemmung des Steroid-Signalweges zurückgeführt werden kann. Wenn der Steroid-Signalweg RNAi-vermittelt in dessen Aktivität eingeschränkt wird, zeigt die zusätzliche Inkubation mit 1 μ M Cholecalciferol keinen additiven Effekt.

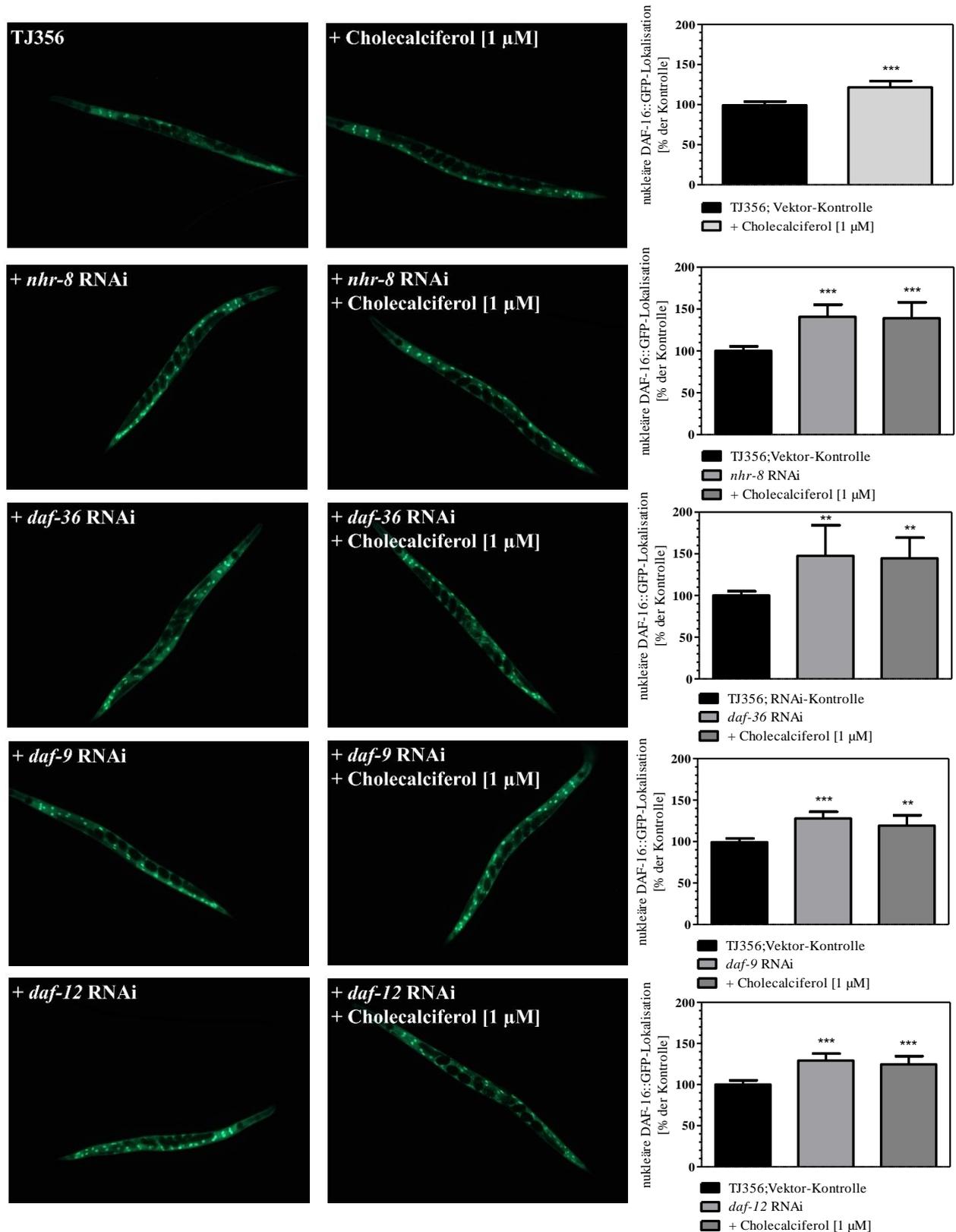


Abbildung 4.17: Nukleäre DAF-16::GFP Lokalisation in TJ356 nach 48 h Inkubation mit 1 µM Cholecalciferol unter Hemmung des Steroid-Signalweges.

Nachweis der nukleären DAF-16::GFP-Translokation nach 48 h Inkubation mit 1 µM Cholecalciferol und nach der RNAi von *nhr-8*, *daf-36*, *daf-9* und *daf-12*. Die nukleäre DAF-16::GFP-Lokalisation wurde in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden nach 1-stündigem Hitzeschock (35°C) mit folgender 1-stündiger Inkubation bei 20°C gemessen. **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. Kontrolle

4.3 Die *daf-12* RNAi resultiert in einer verminderten Ablagerung von A β -Aggregaten

Die Toxizität des A β -Peptids wird letztlich, wie in Kapitel 1.1.1.1 beschrieben, über dessen Aggregationsverhalten bestimmt. Deshalb sollte als nächstes untersucht werden, inwiefern die Hemmung des stromabwärts im Steroid-Signalweg stehenden nukleären Hormonrezeptors DAF-12 auf die A β -Aggregation Einfluss nimmt. Zu diesem Zweck wurde der rotfluoreszierende Farbstoff NIAD-4 eingesetzt, der spezifisch A β -Fibrillen anfärbt. Die Anfärbung von zuvor fixierten und permeabilisierten Nematoden mit NIAD-4 zeigte, dass die mit *daf-12* RNAi behandelten CL2006 Nematoden im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant verringerte Menge an A β -Ablagerungen ($43\% \pm 33$) aufwiesen (Abbildung 4.18). Das reduzierte Vorliegen von A β -Ablagerungen in den Körperwandmuskelzellen von CL2006 erklärt die verringerte Paralyse, die unter *daf-12* RNAi messbar ist (vgl. Abbildung 4.8).

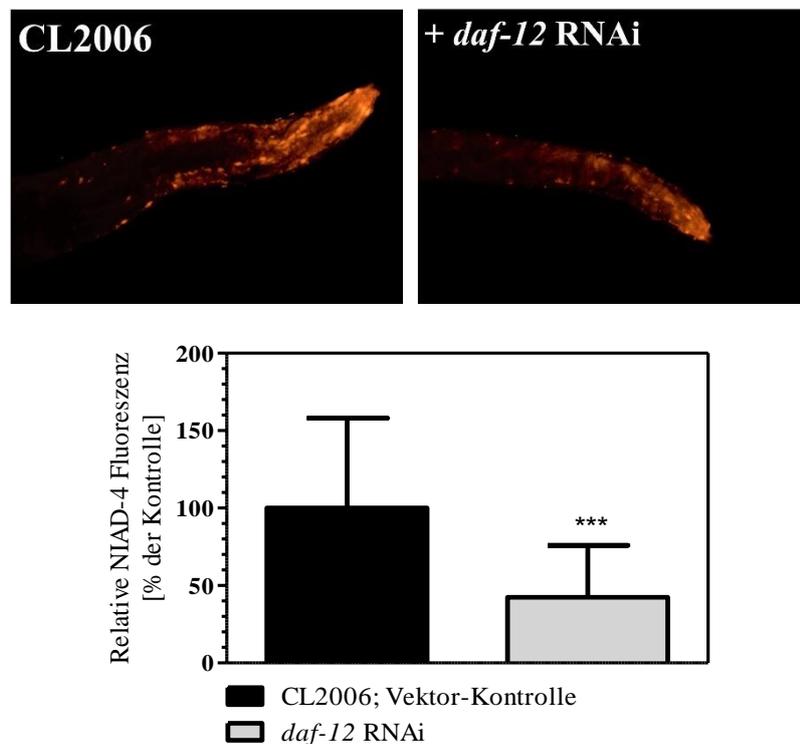


Abbildung 4.18: Relative NIAD-4 Fluoreszenz in CL2006 nach *daf-12* RNAi.

Auswertung der relativen NIAD-4 Fluoreszenz in CL2006 nach *daf-12* RNAi. Nach der Behandlung mit Hitzeschock (1,5 h 35°C) erfolgte die Fixierung (24 h) und Permeabilisierung (24 h) der 2 Tage alten jung-adulten Nematoden. Anschließend fand die Anfärbung mit 10 μ M NIAD-4 statt, woraufhin fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von den Nematodenköpfen erfolgten. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

4.4 Die *daf-16* RNAi hemmt den lysosomalen und proteasomalen Abbau von A β

Da die Aktivität des Steroid-Signalweges und damit auch von DAF-12 letztlich über die Aktivität von DAF-16 Einfluss auf die Proteinaggregation und Paralyse nimmt, sollte untersucht werden, inwiefern DAF-16 den lysosomalen Abbau als letzten Schritt der Autophagie sowie den proteasomalen Abbau von Proteinen beeinflusst. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die *daf-16* RNAi die Lysosomenbildung signifikant ($33\% \pm 17$) reduzierte (Abbildung 4.19).

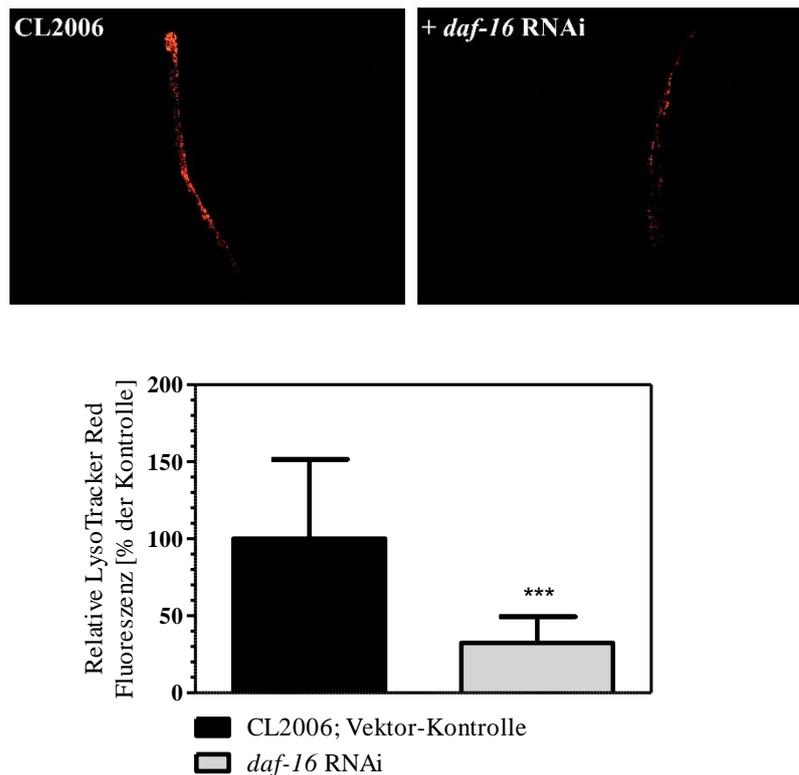


Abbildung 4.19: Lysosomendichte in CL2006 in Ab- bzw. Anwesenheit der *daf-16* RNAi.

Auswertung der relativen LysoTracker® Red-Fluoreszenz als Maß für die Lysosomenbildung in CL2006 unter *daf-16* RNAi. *** $p < 0.001$ vs. Kontrolle

Auch die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität wurde durch die RNAi von *daf-16* reduziert ($16\% \pm 3$) (Abbildung 4.20).

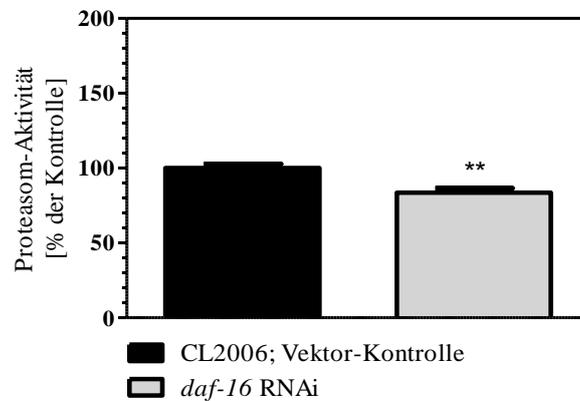


Abbildung 4.20: Proteasomaktivität in CL2006 in Ab- bzw. Anwesenheit der *daf-16* RNAi.

Spezifische Proteasomaktivität in CL2006 nach Behandlung mit Hitzeschock (1,5 h 35°C). Die Proteine wurden aus den Nematoden extrahiert, um die spezifische Proteasomaktivität mithilfe des Substrats Suc-LLVY-AMC zu quantifizieren. Der Proteasom-Inhibitor MG-132 wurde eingesetzt, um die spezifische Proteasomaktivität als Differenz zwischen der Aktivität in Anwesenheit des Inhibitors und der Gesamtaktivität zu bestimmen; ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle

Es kann somit im Hinblick auf die A β -Aggregation postuliert werden, dass diese durch die Hemmung des Steroid-Signalweges und der daraus folgenden Aktivierung des DAF-16-Transkriptionsfaktors durch den gesteigerten autophagosomalen und proteasomalen Abbau reduziert wird.

4.5 Die Bedeutung des PPAR α -Homolog NHR-49 und seiner Bindungspartner für die A β -Toxizität in CL2006

4.5.1 Die reduzierte Expression von *nhr-49*, *nhr-66* bzw. *nhr-80* bewirkt eine Steigerung der Paralyse

Ein weiterer in dieser Arbeit untersuchter nukleärer Hormonrezeptor ist das in *C. elegans* beschriebene PPAR α -Homolog NHR-49. Die Rezeptoren der PPAR-Familie wirken durch ihre Liganden an der Vermittlung von verschiedenen Stoffwechselprozessen mit und sind zudem an antioxidativen und antiinflammatorischen Effekten beteiligt. Diese Aktivitäten könnten daher einen Einfluss auf die im Rahmen der AD-Pathogenese auftretenden und durch A β ausgelösten oxidativen und inflammatorischen Schäden nehmen. Um den Einfluss von NHR-49 auf die A β -Toxizität in CL2006 zu ergründen, erfolgte eine RNAi-vermittelte Reduktion der Expression. Zusätzlich wurde in diesem Zusammenhang die Relevanz der beiden für NHR-49 beschriebenen Bindungspartner, NHR-66 und NHR-80, untersucht. In Abbildung 4.21 sind die Ergebnisse der Paralysemessungen dargestellt. Sowohl die RNAi von *nhr-49*, als auch die RNAi von *nhr-66* und von *nhr-80* führten zu einer signifikanten Steigerung der Paralyse in CL2006. Dies lässt darauf schließen, dass NHR-49 und dessen Bindungspartner an Prozessen in CL2006 beteiligt sind, die sich protektiv auf die A β -Toxizität auswirken.

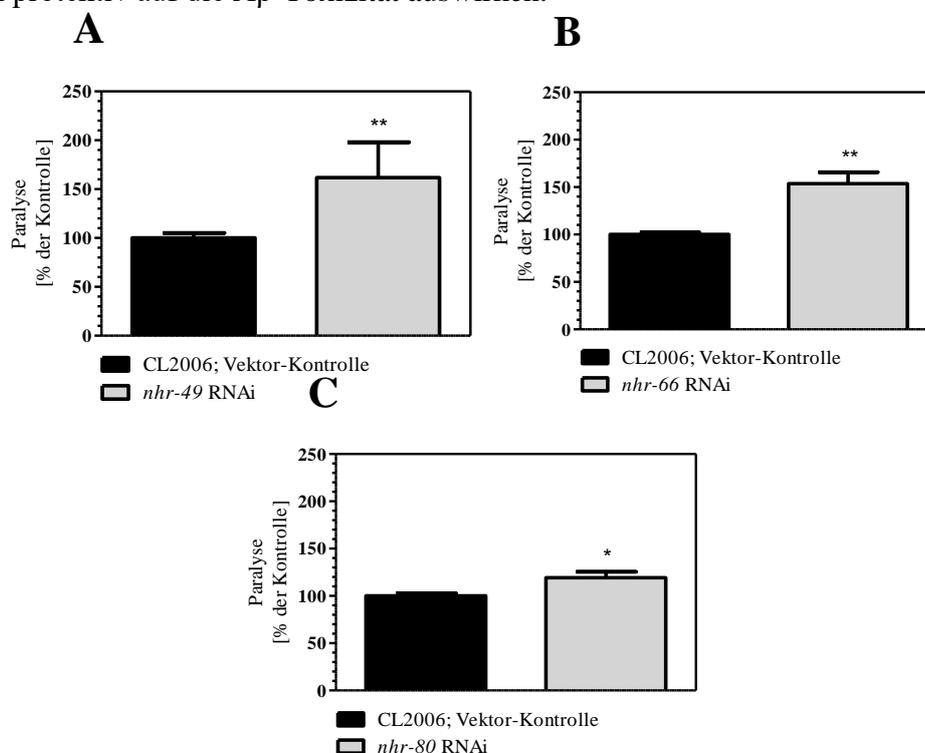


Abbildung 4.21: Paralyserate von CL2006 nach *nhr-49*, *nhr-66* bzw. *nhr-80* RNAi.

Die Paralyseraten von CL2006 wurden nach *nhr-49* (A), *nhr-66* (B) bzw. *nhr-80* RNAi (C) sowie nach einem 1,5-stündigen Hitzeschock bei 35°C in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden ermittelt. *p < 0,05, **p < 0,01 vs. Kontrolle

4.5.2 NHR-49 ist stromaufwärts des Steroid-Signalweges aktiv und zeigt zusammen mit seinen Bindungspartnern unterschiedliche Effekte auf die nukleäre Lokalisation und transkriptionelle Aktivität von DAF-16

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob NHR-49 mit dem Steroid-Signalweg und der DAF-16-Aktivität interferiert und darüber die Paralyse in CL2006 beeinflusst.

Aus der Abbildung 4.22 geht hervor, dass der Paralyse-steigernde Effekt der *nhr-49* RNAi sowohl den Paralyse-senkenden Effekt der *daf-9* RNAi als auch den der *daf-12* RNAi dominiert. Dies deutet darauf hin, dass NHR-49 stromaufwärts von DAF-9 und DAF-12 gelegen den Steroid-Signalweg inhibiert.

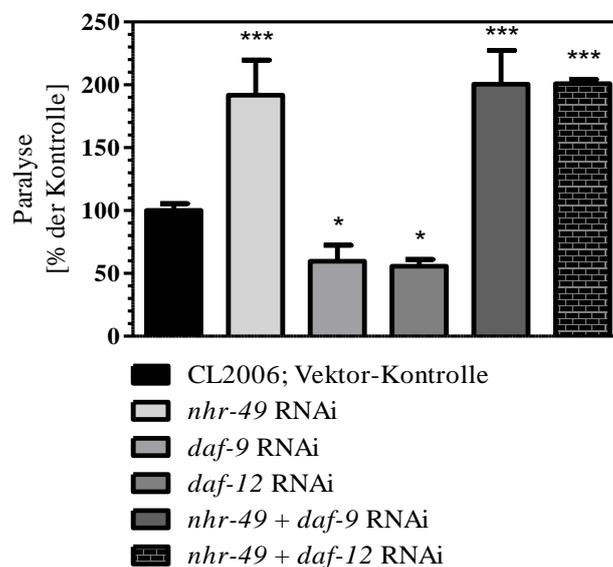


Abbildung 4.22: Paralyserate von CL2006 nach der Doppel-RNAi von *nhr-49* und *daf-9* bzw. der Doppel-RNAi von *nhr-49* und *daf-12*.

Die Paralyseraten von CL2006 wurden nach *nhr-49*, *daf-9*, *daf-12* RNAi sowie der Doppel-RNAi von *nhr-49* und *daf-9* bzw. von *nhr-49* und *daf-12* RNAi sowie nach einem 1,5-stündigen Hitzeschock bei 35°C in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden ermittelt. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. Kontrolle

Auf die nukleäre DAF-16-Lokalisation hat die *nhr-49* RNAi im Vergleich zur Vektor-Kontrolle einen reduzierenden Effekt gezeigt. Analog zu den Ergebnissen in CL2006 konnte infolge der Doppel-RNAi mit *daf-9* bzw. *daf-12*, die jeweils allein zu einer Steigerung der nukleären DAF-16-Lokalisation führten, beobachtet werden, dass der Effekt der *nhr-49* RNAi überwiegt (Abbildung 4.23). Auch aus diesem Ergebnis kann geschlussfolgert werden, dass NHR-49 stromaufwärts des Steroid-Signalweges positioniert ist und eine hemmende Wirkung auf diesen vermittelt.

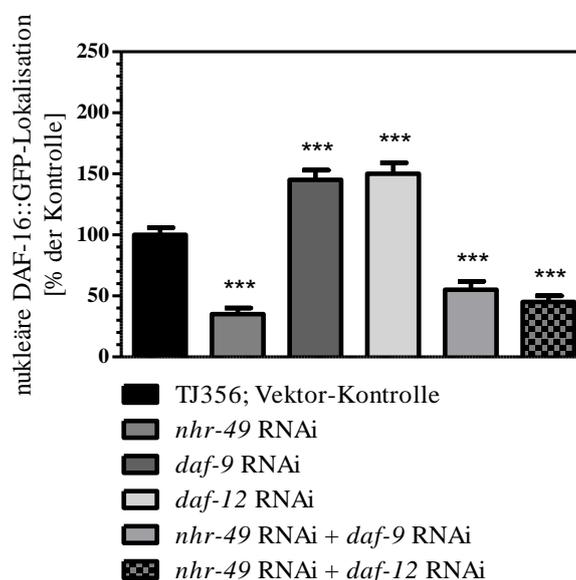
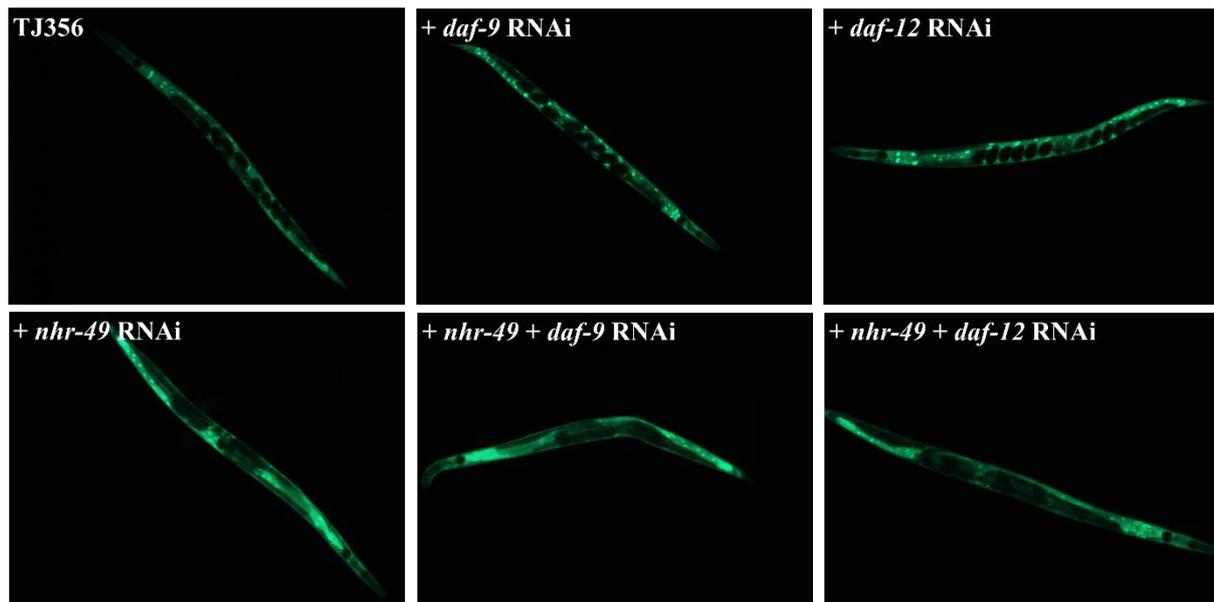


Abbildung 4.23: Nukleäre DAF-16::GFP Lokalisation in TJ356 nach der Doppel-RNAi von *nhr-49* und *daf-9* bzw. der Doppel-RNAi von *nhr-49* und *daf-12*.

Nachweis der nukleären DAF-16::GFP-Lokalisation nach *nhr-49* RNAi, *nhr-49* + *daf-9* sowie *nhr-49* + *daf-12* Doppel-RNAi. Die nukleäre DAF-16::GFP-Lokalisation wurde in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden nach 1-stündigem Hitzeschock (35°C) mit folgender 1-stündiger Inkubation bei 20°C gemessen. *p < 0,05, ***p < 0,001 vs. Kontrolle; ##p < 0,01 vs. *nhr-49* RNAi

Die reduzierte Expression der beiden NHR-49-Bindungspartner NHR-66 und NHR-80 bewirkte indes keine Veränderung der nukleären DAF-16-Lokalisation im Vergleich zur Vektor-Kontrolle. Auch nach der Doppel-RNAi von *nhr-49* und *nhr-66* bewirkt die *nhr-66* RNAi keine Veränderung der durch *nhr-49* RNAi reduzierten nukleären DAF-16-Lokalisation. Dies deutet darauf hin, dass die Steigerung der Paralyse nach der *nhr-66* RNAi nicht über eine Verminderung der nukleären DAF-16-Lokalisation vermittelt wird. Ein ähnliches Ergebnis ist bei der Doppel-RNAi von *nhr-49* und *nhr-80* zu beobachten. Auch hier hat der *knock-down* des Bindungspartners keinen Einfluss auf die durch *nhr-49* RNAi verursachte Hemmung der DAF-16::GFP-Translokation in den Zellkern.

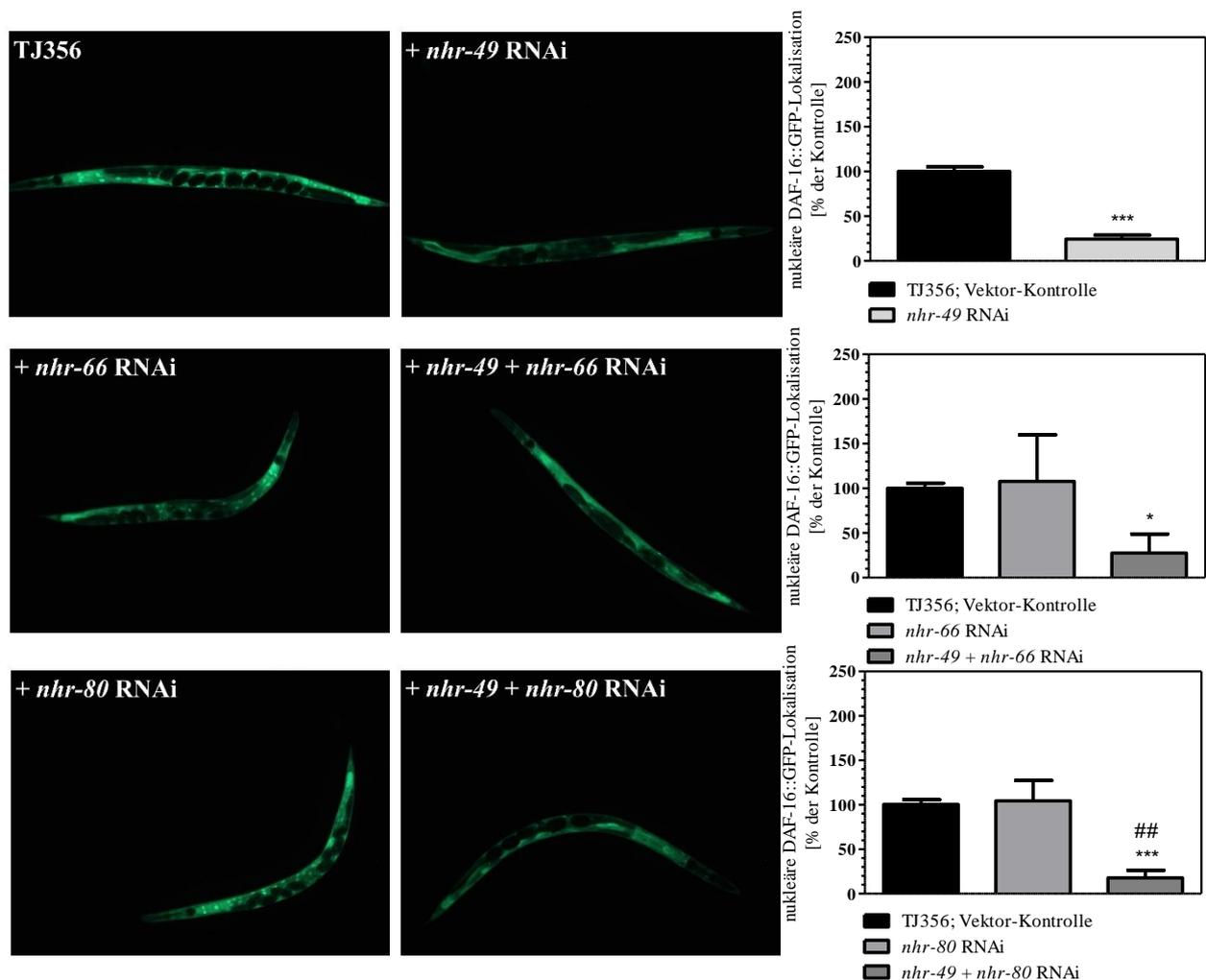


Abbildung 4.24: Nukleäre DAF-16::GFP Lokalisation in TJ356 nach *nhr-49*, *nhr-66* bzw. *nhr-80* RNAi und nach Doppel-RNAi von *nhr-49* und *nhr-66* bzw. *nhr-80*.

Nachweis der nukleären DAF-16::GFP-Lokalisation nach *nhr-49* RNAi, *nhr-49* + *nhr-66* sowie *nhr-49* + *nhr-80* Doppel-RNAi. Die nukleäre DAF-16::GFP-Lokalisation wurde in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden nach 1-stündigem Hitzeschock (35°C) mit folgender 1-stündiger Inkubation bei 20°C gemessen. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; ## $p < 0,01$ vs. *nhr-49* RNAi

Um zu untersuchen, ob womöglich die Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors durch seine Bindungspartner moduliert und dadurch die Transkription von dessen Zielgenen beeinflusst wird, wurde die relative Expressionsänderung von SOD-3 unter *nhr-49*, *nhr-66* bzw. *nhr-80* RNAi bestimmt. Erstaunlicherweise bewirkte die *nhr-80* RNAi trotz unveränderter nukleärer DAF-16::GFP-Lokalisation (Abbildung 4.24) eine Erhöhung der SOD-3::GFP-Expression, während die *nhr-66* RNAi ohne Einfluss blieb (Abbildung 4.25).

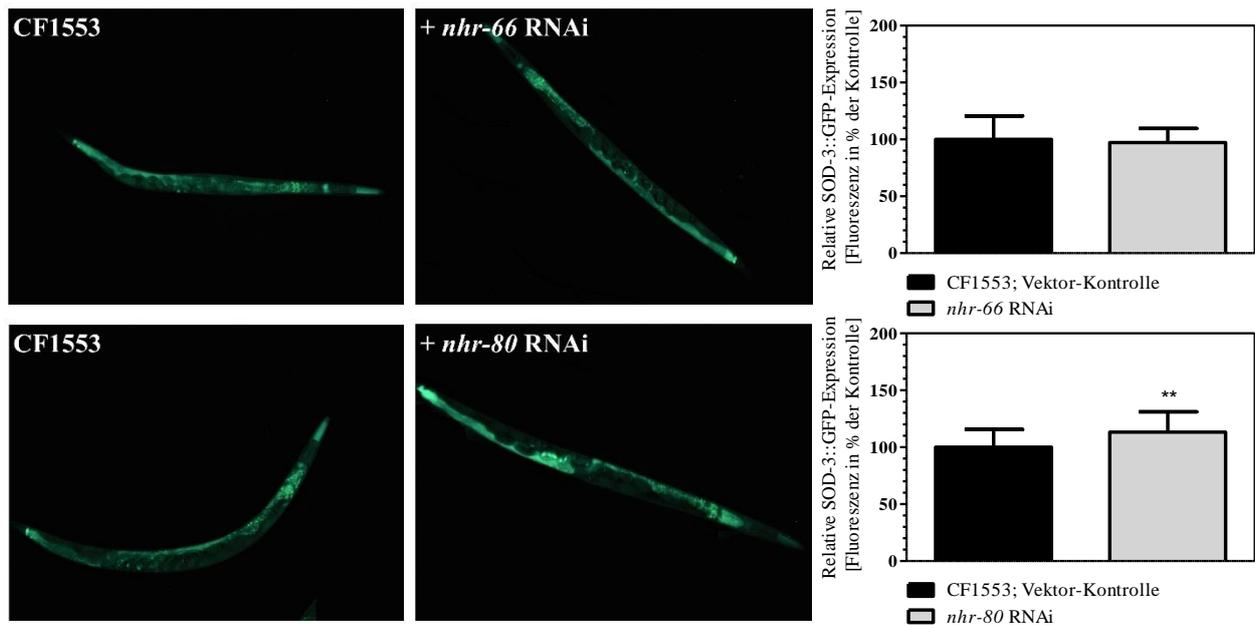


Abbildung 4.25: Relative SOD-3::GFP-Expression in CF1553 nach *nhr-66* bzw. *nhr-80* RNAi.

Quantifizierung der SOD-3::GFP-Expression nach *nhr-66* RNAi bzw. *nhr-80* RNAi. Die Messung wurde in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden nach 1,5-stündigem Hitzeschock (35°C) vorgenommen. **p < 0,01 vs. Kontrolle

4.5.3 Der Paralyse-hemmende Effekt von NHR-80 beruht auf der Steigerung der β -Oxidation

Das PPAR α -Homolog NHR-49 und seine Bindungspartner NHR-66 sowie NHR-80 haben u.a. eine regulierende Wirkung auf die Fettsäuren- β -Oxidation in *C. elegans*, da sie die Expression von beteiligten Schlüsselenzymen beeinflussen. Da die protektiven Effekte von NHR-66 bzw. NHR-80 hinsichtlich der A β -Toxizität unabhängig von der DAF-16-Lokalisation und der SOD-3-Expression waren, wurde zunächst untersucht, ob der *knock-down* des für die Enoyl-CoA-Hydratase kodierenden Gens *ech-1* Einfluss auf die Paralyse in CL2006 nimmt. Tatsächlich führte die *ech-1* RNAi zu einer signifikanten Steigerung der Paralyserate (Abbildung 4.26).

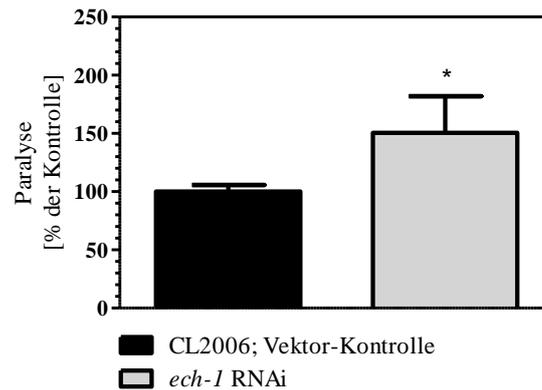


Abbildung 4.26: Paralyserate von CL2006 nach *ech-1* RNAi.

Die Paralyserate von CL2006 wurde nach *ech-1* RNAi sowie nach einem 1,5-stündigen Hitzeschock bei 35°C in 2 Tage alten jung-adulten Nematoden ermittelt. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Da sowohl die *nhr-66* und die *nhr-80* RNAi als auch die *ech-1* RNAi zu einer Steigerung der Paralyseraten führten, war die Feststellung eines funktionellen Zusammenhangs zwischen der NHR-49-Bindungspartner und dem Schlüsselenzym der Fettsäuren- β -Oxidation nicht möglich. Deshalb wurde exemplarisch untersucht, ob der *knock-down* von *nhr-80* zu einer Veränderung der *ech-1*-Transkript-Spiegel führt.

Das in Abbildung 4.27 dargestellte Balkendiagramm ist ein repräsentatives Ergebnis der Messung der relativen *ech-1* mRNA-Spiegel unter *nhr-80* RNAi in CL2006 und zeigt eine reduzierte *ech-1* Expression unter *nhr-80* RNAi ($0,4 \pm 0,5$) im Vergleich zur Vektor-Kontrolle. Dieses Ergebnis stützt die Annahme, dass durch die RNAi-vermittelte, gehemmte Aktivität von NHR-80 der Ablauf der β -Oxidation beeinträchtigt wird. *Ech-1* wird weiterhin als ein reguliertes Zielgen von NHR-49 als auch von NHR-66 beschrieben [286, 289], so dass insbesondere die NHR-49-Bindungspartner NHR-66 und NHR-80 über eine gesteigerte β -Oxidation Paralyse-senkend wirken könnten.

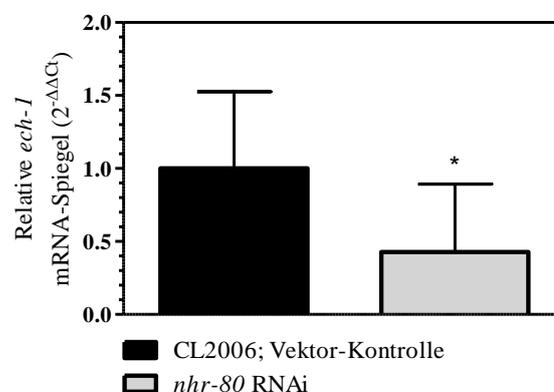


Abbildung 4.27: Relative *ech-1* Expression nach *nhr-80* RNAi.

Relative *ech-1* Expression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) in CL2006 mit *nhr-80* RNAi. Die RNA wurde aus den Nematoden isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Mittels qRT-PCR mit den Primern *ech-1*-fw-939-2 und *ech-1*-r-1095-2 wurden die *ech-1* Transkript-Spiegel bestimmt und quantifiziert. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5 DISKUSSION

Als eine Folge der steigenden Lebenserwartung des Menschen ist ein zunehmendes Auftreten von neurodegenerativen Erkrankungen zu beobachten [15]. Dazu zählt die Demenz, die sich auf unterschiedlichen Ursachen begründet, jedoch am häufigsten das Resultat einer pathologisch erhöhten Bildung des A β -Peptids im Gehirn darstellt. Diese Demenzform wird als AD bezeichnet [4, 13]. Infolge der amyloidogenen Prozessierung des APP entsteht das A β -Peptid, das hauptsächlich in Form des A β ₁₋₄₀ und des A β ₁₋₄₂ vorkommt [50]. Unter physiologischen Bedingungen wird vorrangig A β ₁₋₄₀ gebildet, das auch an der Neuronenbildung beteiligt ist [326]. A β ₁₋₄₂ stellt aufgrund der höheren Aggregationsneigung die toxischere Form dar, deren Bildung bei AD-Patienten gesteigert ist [51]. Als ein Resultat dieser toxischen Verschiebung entstehen die für die AD charakteristischen senilen Plaques, die sich extrazellulär ablagern und lange Zeit als der Auslöser für die AD-Pathogenese angesehen wurden [52]. Neueren Erkenntnissen zufolge sind die löslichen A β -Oligomere, die intrazellulär lokalisiert sind, für die Manifestation des AD-assoziierten Krankheitsbildes verantwortlich [53, 54]. Speziell im ER, in den Mitochondrien und im Golgi-Apparat konnte eine A β -Ansammlung nachgewiesen werden [32, 327, 328]. In den Mitochondrien resultiert die übermäßige Bildung von A β in einem verminderten Energiestoffwechsel infolge der Beeinträchtigung der Atmungskette, die zur Entstehung von oxidativem Stress in Form erhöhter ROS-Spiegel führt [81, 82, 86]. Diese vermehrte Bildung von ROS geht mit einer gesteigerten Lipidperoxidation der Zellmembran einher, welche dessen Funktion beeinträchtigt und die Permeabilität erhöht. Die daraus resultierende gestörte Metallionenhomöostase im Zellinneren führt letztendlich zur Apoptose der Nervenzelle [86]. Weiterhin wird die neuronale Degeneration durch die Interaktion der A β -Aggregate mit verschiedenen Rezeptoren wie z.B. dem NMDA-Rezeptor gefördert [94].

Insgesamt ist die Relevanz von A β für die AD-Pathogenese unbestritten und das Forschungsinteresse deshalb auf die Entstehungsmechanismen der neuronalen A β -Toxizität und die assoziierten Wirkmechanismen ausgerichtet. Zu diesem Zweck bedient sich die Forschung verschiedener Modelle, die von Zellkulturen bis hin zu komplexen Organismen reichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der transgene *C. elegans* Stamm CL2006 verwendet. In das Genom von CL2006 wurde ein humanes A β ₁₋₄₂ Minigen integriert, das durch einen Muskel-spezifischen Promotor reguliert wird [258]. Untersuchungen haben ergeben, dass nicht A β ₁₋₄₂ sondern das verkürzte A β ₃₋₄₂ in den Körperwandmuskelzellen von CL2006 gebildet wird. In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass die verkürzte Form sogar noch toxischer als A β ₁₋₄₂ aufgrund der höheren Aggregationsneigung ist und außerdem die Aggregationseigenschaft von A β ₁₋₄₀ stimuliert [259]. Daher ist CL2006 trotz der modifizierten Form für die Untersuchung

der A β -Toxizität geeignet. Als ein Marker für die A β -Toxizität bildet CL2006 mit fortschreitendem Alter aufgrund der muskulären Schädigungen einen Paralyse-Phänotyp aus [258]. REGITZ und WENZEL konnten zeigen, dass der Paralyse-Phänotyp von CL2006 mit einer vermehrten Protein-Aggregation einhergeht [324].

Innerhalb dieser Arbeit steht die Untersuchung der Bedeutung von nukleären Hormonrezeptoren für die A β -Toxizität in CL2006 im Mittelpunkt. Nukleäre Hormonrezeptoren sind über Liganden induzierbare Transkriptionsfaktoren, die auf verschiedene Prozesse eine regulierende Funktion haben. Die Liganden steuern die Aktivität der nukleären Hormonrezeptoren und sind daher essenziell für das Wachstum, den Stoffwechsel und die Entwicklung eines Organismus [169]. In *C. elegans* sind 284 nukleäre Hormonrezeptoren beschrieben, von denen etwa 20 Homologien zu nukleären Hormonrezeptoren anderer Organismen vorweisen. Sie werden in *C. elegans* u.a. mit der Regulation der Entwicklung, der Diapause und der Lebensspanne assoziiert und beeinflussen den Fett- sowie den Fremdstoffwechsel [284].

Ein Vertreter ist DAF-12, dessen Liganden dafachronische Säuren sind, die über den Steroid-Signalweg aus Cholesterol synthetisiert werden. Dabei wird das Cholesterol zunächst durch die Rieske-ähnliche Oxygenase DAF-36 zu 7-Dehydrocholesterol oxidiert, welches anschließend durch das Cytochrom P450-abhängige Enzym DAF-9 zu dafachronischen Säuren umgesetzt wird [273, 279]. Als regulierend für die Aktivität des Steroid-Signalweges wird der nukleäre Hormonrezeptor NHR-8 beschrieben, da dieser die Expression von DAF-36 beeinflusst [283]. Für die Aktivität von DAF-9 und DAF-12 konnten REGITZ und WENZEL bereits eine verstärkende Wirkung auf die A β -Toxizität in CL2006 nachweisen [324]. Homologien von DAF-12 bestehen zum humanen Vitamin D-Rezeptor, der als nukleärer Hormonrezeptor die Funktionen von Vitamin D vermittelt [142]. Sowohl für Cholesterol als auch für Vitamin D wird eine Einflussnahme auf die AD-Pathogenese im Menschen diskutiert. So korrelieren die Cholesterolspiegel des Menschen, besonders im mittleren Lebensalter, mit dem Auftreten der AD [126]. Dagegen wird ein Mangel an Vitamin D₃ mit einem erhöhten AD-Erkrankungsrisiko assoziiert [128, 143]. Gegenstand dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von Vitamin D und Cholesterol in Abhängigkeit des Steroid-Signalweges auf die A β -Toxizität im Alzheimer-Modell von *C. elegans* zu untersuchen.

Hinsichtlich der AD-Pathogenese wird zudem der Einfluss von nukleären Hormonrezeptoren der PPAR-Familie diskutiert, da im Zusammenhang mit deren Agonisten verschiedene Wirkungen auf den A β -Stoffwechsel beobachtet werden konnten, die sich protektiv auf den neurodegenerativen Prozess auswirkten [191–194]. Daher sollten das PPAR α -Homolog NHR-49 und seine beiden Bindungspartner NHR-66 und NHR-80 bezüglich ihrer Bedeutung für die A β -

Toxizität in CL2006 betrachtet werden. Weiterhin wurde erörtert, ob NHR-49 mit dem zuvor beschriebenen Steroid-Signalweg interagiert.

5.1 DAF-12 beeinflusst die A β -Toxizität in CL2006 über die Interaktion mit dem DAF-16 Transkriptionsfaktor und in Abhängigkeit von der Bindung von Cholesterol und Cholecalciferol

In Untersuchungen zur AD-Pathogenese konnte eine Korrelation zwischen den Cholesterolspiegeln im mittleren Lebensalter und der Erkrankungswahrscheinlichkeit identifiziert werden, weshalb ein Zusammenhang diskutiert wird [126]. Dabei ist noch nicht genau geklärt, auf welchem Wirkmechanismus dieser Zusammenhang begründet sein könnte.

Das Gehirn ist im menschlichen Organismus das Organ mit dem höchsten Cholesterolgehalt [136]. Cholesterol bildet eine Strukturkomponente in den Myelinscheiden sowie den Plasmamembranen der Neuronen und der Gliazellen und ist essenziell für die Neuronenentwicklung [137, 138].

Als Bestandteil der LDL- und VLDL-Partikel ist das Apolipoprotein ApoB-100 am Cholesteroltransport beteiligt. *Post mortem* Untersuchungen in AD-Patienten haben gezeigt, dass die LDL- und ApoB-100-Spiegel mit den A β ₁₋₄₂-Spiegeln im Gehirn korrelieren [329]. Die Überversorgung der Neuronen mit Cholesterol scheint daher pathologische Mechanismen im Gehirn zu fördern, die zur Entstehung der AD führen.

Um diesen Zusammenhang zu ergründen, haben RAMÍREZ *et al.* ein Mausmodell für die familiäre Hypercholesterolämie genutzt, welches ApoB-100 überexprimiert und durch einen *knock-out* keinen LDL-Rezeptor mehr bildet. Infolge der erhöhten Cholesterolspiegel waren in dem Mausmodell eine Dystrophie der Neuriten, oxidative Schäden, eine Astrogliose und eine vasculäre β -Amyloidose festzustellen, die letztendlich zur Schädigung der Neuronen führten und in einer kognitiven Beeinträchtigung der Tiere resultierte [330]. In den Studien von LÖFFLER *et al.* wurden Mausmodelle eingesetzt, die jeweils APP und ApoB-100 einzeln oder gemeinsam überexprimierten. In den drei Mausmodellen konnte die Gruppe jeweils eine gesteigerte Lipidperoxidation in den Gehirnen nachweisen, die mit einem Gedächtnisverlust einherging. Dabei konnte die gesteigerte Lipidperoxidation in den ApoB-100-Mäusen schon detektiert werden bevor Verhaltensdefizite erkennbar waren. Währenddessen war in den APP-Mäusen die gesteigerte Lipidperoxidation erst nach der Manifestation des Gedächtnisverlusts messbar. In den ApoB-100-Mäusen konnte zudem keine A β -Ablagerung detektiert werden, wodurch der Einfluss der ApoB-100-induzierten Lipidperoxidation für die kognitive Funktion deutlich wird

[331]. Weiterhin konnten LÖFFLER *et al.* in den ApoB-100-Mäusen infolge einer fettreichen Nahrung erhöhte ACAT und APOE mRNA Spiegel feststellen, die den Abbau von freiem Cholesterol andeuteten. Zusätzlich war eine Erhöhung der BACE- und der murinen APP-Spiegel zu beobachten. In allen Modellen, die APP-überexprimierten, wurden neben den erhöhten A β -Spiegeln reduzierte Spiegel an freiem Cholesterol im Kortex festgestellt. Zusätzlich wurden in diesem Zusammenhang erhöhte Expressionsspiegel der HMG-CoA-Reduktase mRNA detektiert, die auf einen Anpassungsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Cholesterol-Versorgung hindeuteten [332]. BERECZKI *et al.* stellten in den Gehirnen ApoB-100-überexprimierender Mäuse eine vermehrte Apoptose der Neuronen sowie erhöhte APP-Spiegel fest. Zudem konnten sie Amyloid-Plaques im Hippocampus, im Kortex und dem Hypothalamus nachweisen. Da die Überexpression von ApoB-100 mit einer Hypercholesterolämie assoziiert ist, können die Effekte in Verbindung mit der Überversorgung mit Cholesterol gebracht werden [333].

Als eine Wirkung der Cholesterol-Überversorgung der Neuronen identifizierten GHRIBI *et al.* in einem Kaninchen-Modell den steigernden Effekt auf die BACE1-Aktivität, die in einer gesteigerten amyloidogenen APP-Prozessierung resultierte. In diesem Zusammenhang konnte auch die Entstehung von A β_{1-42} -Plaques nachgewiesen werden [334]. In einer Zellkulturstudie, die in Hippocampus-Neuronen von Ratten durchgeführt wurde, haben SIMONS *et al.* gezeigt, dass ein Cholesterol-Mangel die amyloidogene Prozessierung von APP hemmt und daher unter diesen Bedingungen weniger A β gebildet wird [335]. Weiterhin bewirkte das reduzierte Cholesterolangebot in Hippocampus-Neuronen von Mäusen, denen A β_{1-40} Peptide injiziert wurden, eine Hemmung der Aggregation von A β [336]. Daher wird auch die Bedeutung der Cholesterolhaltigen *Lipid rafts* für die Aggregation von A β diskutiert [337].

Ein für den Cholesterol-Stoffwechsel relevanter nukleärer Hormonrezeptor ist der LXR, da dieser an der Regulation der *de novo* Cholesterolsynthese, der Induktion der Gallensäuresynthese und der Aktivierung des reversen Cholesteroltransports beteiligt ist [338]. FITZ *et al.* verfütterten an Mäuse, die mutiertes humanes APP exprimierten, eine Cholesterol-reiche Diät, die zu einer zusätzlichen Beeinträchtigung der kognitiven Funktion der Tiere führte. Durch die zusätzliche Gabe eines LXR-Agonisten konnte dieser Effekt aufgehoben werden, was sich auf einer verminderten Ablagerung von A β zurückführen lässt. Zudem konnte festgestellt werden, dass durch die Gabe des LXR-Agonisten die Expression von ABCA1 und APOE gesteigert wurde. Die Autoren schlussfolgerten, dass die vermehrt gebildeten APOE-tragenden Lipoproteine für den Abbau von A β verantwortlich sind [339].

Die Versorgung mit Vitamin D₃ wird als ein weiterer relevanter Einflussfaktor für die Entstehung von AD diskutiert [340]. In zahlreichen Tiermodell- und Zellkulturstudien konnten eine protektive Wirkung von Cholecalciferol auf die Bildung von A β -Aggregaten und die assoziierten negativen Auswirkungen festgestellt werden. Beispielsweise konnte in A β -exprimierenden Mäusen gezeigt werden, dass die Bindung von Cholecalciferol an den VDR die Expression des P-Glykoproteins erhöht, das einen gesteigerten Efflux von A β über die Blut-Hirn-Schranke in die Peripherie vermittelt und damit die A β -Konzentrationen im Gehirn reduziert, wodurch die Bildung von Plaques zurückging und sich die kognitiven Funktionen verbesserten [341]. Der positive Effekt der Vitamin D₃ Supplementation konnte auch in der Mausmodell-Studie von YU *et al.* herausgestellt werden, in der die Mäuse weniger A β -Plaques und eine verbesserte kognitive Funktion im Vergleich zur nicht supplementierten Behandlungsgruppe aufwiesen [342]. Weiterhin wird die protektive Funktion von Vitamin D₃ durch eine gesteigerte Synthese von neurotrophen Faktoren sowie der gesteigerten Makrophagen vermittelten Phagozytose von A β beschrieben [162–164].

Dass die Cholesterollowerkung im Medium oder die Hemmung der Cholesterolaufnahme einen Einfluss auf die Ausbildung des Alzheimer-Phänotyps von CL2006 haben, haben REGITZ und WENZEL in ihrer Studie bereits gezeigt. Sowohl durch eine reduzierte Cholesterolfuhr als auch durch die Hemmung der Cholesterolaufnahme infolge des *knock-downs* des Cholesteroltransporters VIT-6 konnte eine Hemmung des Steroid-Signalweges erzielt werden, was in einer Senkung der Paralyse resultierte [324].

Als regulierend für die Cholesterollowerkung in *C. elegans* beschreiben MAGNER *et al.* den nukleären Hormonrezeptor NHR-8. Mutationen, die zum Funktionsverlust von NHR-8 führen, resultieren in einem Phänotyp, der dem eines Mangels an da-fachronischen Säuren ähnelt. Dies ist u.a. darauf zurückzuführen, dass NHR-8 die Expression von DAF-36 und damit die Aktivität des Steroid-Signalweges induziert [283]. Gemäß dieser funktionellen Beschreibung von NHR-8 resultierte die, innerhalb dieser Arbeit durchgeführte, *nhr-8* RNAi in CL2006 in einer Hemmung des Steroid-Signalweges, die sich in einer reduzierten Paralyse ausdrückte. Die zusätzliche Erhöhung der Cholesterolkonzentration im Medium bewirkte unter diesen Bedingungen einen Anstieg der Paralyse in den mit *nhr-8* RNAi behandelten CL2006 Nematoden auf den Wert der Kontrolle. Dies bestätigt also, dass NHR-8 den Steroid-Signalweg aktiviert und dass ein aktivierter Steroid-Signalweg die Paralyse in CL2006 steigert. Einhergehend mit diesem Ergebnis führte die erhöhte Cholesterolkonzentration auch bei dem *knock-down* der von

NHR-8 stromabwärts positionierten Mitglieder des Steroid-Signalweges DAF-36, DAF-9 und DAF-12 zu einer Aufhebung des RNAi-bedingten Paralyse-senkenden Effektes.

In der Funktion als nukleärer Hormonrezeptor ist DAF-12 in *C. elegans* an der Entscheidung beteiligt, ob unter den gegebenen Umweltbedingungen der Organismus in einem Zustand des reproduktiven Wachstums oder des Dauerstadiums verharrt, was einen Einfluss auf die Lebensspanne hat [273]. Die Langlebigkeit von *C. elegans* wird durch eine Reihe von Faktoren bestimmt, zu denen neben DAF-12 auch der DAF-16 Transkriptionsfaktor zählt, der das Homolog zum humanen FOXO darstellt [198]. Anhand der Entfernung der Keimbahn konnte nachgewiesen werden, dass sowohl DAF-12 als auch DAF-16 für die Ausprägung der Lebensspanne notwendig sind [343]. Die Aktivität von DAF-16 wird durch den Insulin/IGF-Signalweg reguliert. Ein inaktiver Insulin/IGF-Signalweg resultiert in einer Dephosphorylierung von DAF-16, woraufhin DAF-16 in den Zellkern transloziert, um die Transkription von Genen der Stressresistenz und der Langlebigkeit zu initiieren [268].

DOWELL *et al.* beschreiben in einem *in vitro*-Versuch eine Interaktion zwischen DAF-16 und DAF-12. Im Zusammenhang mit deren Homologien wird argumentiert, dass die Interaktion die transkriptionelle Aktivität der Faktoren beeinflussen kann [344]. In einer experimentellen Studie von MATYASH *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von DAF-16 auch durch DAF-12 reguliert werden kann. Den Ergebnissen zufolge induziert das Liganden-freie DAF-12 die nukleäre Translokation von DAF-16 [345]. GERISCH *et al.* ergänzen in diesem Kontext, dass die Wirkung von DAF-12 auf DAF-16 neben der Versorgung mit dafachronischen Säuren auch abhängig von der Anwesenheit einer funktionellen Keimbahn ist. Bei einem Mangel an Liganden, der dem Mangel an Nahrung entspricht, wird die Langlebigkeit des Nematoden dadurch gesteigert, dass DAF-16 vermehrt aktiv ist. Wenn hingegen dafachronische Säuren vorhanden sind, dann werden reproduktive Mechanismen durch das Liganden-gebundene DAF-12 aktiviert. Im Keimbahn-losen Nematoden begünstigt das Liganden-gebundene DAF-12 hingegen zusätzlich die nukleäre Aktivität von DAF-16, wodurch die Nematoden eine höhere Lebensspanne aufweisen [346]. DUMAS *et al.* stellten ebenso fest, dass sowohl das Liganden-freie als auch das Liganden-gebundene DAF-12 einen Einfluss auf die Lebensspanne von *C. elegans* in Abhängigkeit der Aktivität des Insulin/IGF-Signalweges hat [347].

Die stromabwärts gelegene Positionierung von DAF-16 gegenüber dem Steroid-Signalweg konnten auch REGITZ und WENZEL in CL2006 feststellen, in dem der *daf-16* RNAi Effekt gegenüber dem Effekt der *daf-9* und der *daf-12* RNAi dominant auf die Paralyserate wirkte [324]. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit auch für DAF-36 und für NHR-8 eine stromaufwärts gelegene Positionierung gegenüber DAF-16 nachgewiesen werden, in dem der Paralyse-

steigernde Effekt der *daf-16* RNAi in der jeweiligen Doppel-RNAi gegenüber dem Paralyse-senkenden Effekt der *nhr-8* bzw. der *daf-36* RNAi dominant war. MAGNER *et al.* beschreiben für NHR-8 gegenüber dem Steroid-Signalweg eine stromaufwärts gelegene Positionierung und vermuten dies auch für DAF-16, wobei in diesem Fall auch eine parallele Positionierung als möglich erachtet wurde [283].

Um zu überprüfen, ob der stromaufwärts lokalisierte Steroid-Signalweg einen Einfluss auf die nukleäre Lokalisation von DAF-16 hat, erfolgte eine durch RNAi erzielte, verminderte Expression von *nhr-8*, *daf-36*, *daf-9* bzw. von *daf-12* in dem transgenen Nematodenstamm TJ356, der ein an den *daf-16*-Promotor gekoppeltes GFP-Reporter-gen beinhaltet. Dies ermöglichte die fluoreszenzmikroskopische Visualisierung der Lokalisation von DAF-16 in *C. elegans*. Wie CL2006 wurde auch TJ356 vor der Bestimmung des entsprechenden Parameters einem Hitze-stress (1 h bei 35°C) ausgesetzt. Die Hemmung des Steroid-Signalweges führte in allen vier Behandlungsgruppen zu einer signifikanten Steigerung der nukleären DAF-16-Lokalisation gegenüber der Vektor-Kontrolle. Ein regulatorischer Zusammenhang zwischen dem Steroid-Signalweg und der Lokalisation des DAF-16-Transkriptionsfaktors konnte auch in der experimentellen Studie von BERMAN und KENYON nachgewiesen werden. Sie stellten allerdings in Keimbahn-losen *C. elegans* Nematoden fest, dass sich die Hemmung von DAF-12 in reduzierten nukleären DAF-16-Translokation niederschlägt. Sie nehmen an, dass die Keimbahn den Steroid-Signalweg nutzt, um die Aktivität von DAF-16 im Intestinum zu regulieren [348]. GERISCH *et al.* sind in ihrer Studie zum gleichen Ergebnis gekommen und konnten zu dem zeigen, dass durch die zusätzliche Gabe von dafachronischen Säuren die nukleäre DAF-16-Lokalisation gesteigert werden konnte [346]. Die Entfernung der Keimbahn in *C. elegans* ist insgesamt mit der Verlängerung der Lebensspanne verbunden, die auf die vermehrte Aktivität von sowohl DAF-16 als auch DAF-12 zurückgeht [343].

Zusätzlich wurde für die Bestimmung der transkriptionellen Aktivität von DAF-16 unter der Hemmung des Steroid-Signalweges die Expression des *sod-3*-Gens untersucht, das für ein antioxidativ wirksames Enzym kodiert und ein charakteristisches Zielgen von DAF-16 darstellt. Mittels RNAi wurde zunächst überprüft, ob SOD-3 eine Relevanz für die A β -Toxizität in CL2006 hat. Die *sod-3* RNAi resultierte in einer signifikanten Steigerung der Paralyserate, was tatsächlich auf eine protektive Wirkung der SOD-3 gegenüber der A β -Toxizität schließen lässt. Zur Untersuchung der SOD-3-Expression diente ein transgener Nematodenstamm, der am *sod-3*-Promotor ein GFP-Reporter-gen gekoppelt hat. Nach einem 1,5 stündigen Hitzeschock und der RNAi von *nhr-8*, *daf-36*, *daf-9* oder *daf-12* war eine signifikante Steigerung der SOD-3-Expression zu beobachten. Die Steigerung der SOD-3-Expression war nachweislich

von der DAF-16 Aktivität abhängig, da die *daf-16* RNAi eine Senkung der SOD-3-Expression verursachte, die dominant gegenüber der Hemmung des Steroid-Signalweges war. In einer Studie von ZHANG *et al.* beschreiben die Autoren, dass die Liganden-gebundene Form von DAF-12 die Expression der SOD-3 hemmt und vermuten eine parallele Aktivität des Steroid-Signalweges zum Insulin/IGF-Signalweg [349]. MAGNER *et al.* zeigen in ihrer Studie, dass in *nhr-8* Mutanten die SOD-3-Expression gegenüber der Kontrolle gesteigert ist [283]. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der nukleäre Hormonrezeptor DAF-12, der durch den stromaufwärts gelegenen Steroid-Signalweg mit dafachronischen Säuren als Liganden versorgt wird, in Liganden-gebundener Form durch die Hemmung von DAF-16 die Expression von Stress-assoziierten Genen reduziert und dadurch die A β -Toxizität in *C. elegans* verstärkt.

Da für die Aktivität der nukleären Hormonrezeptoren, wie DAF-12, die Liganden von entscheidender Rolle sind, sollte im nächsten Schritt die Relevanz von Cholesterol und von Cholecalciferol für die Aktivität von DAF-12 und damit letztlich von DAF-16 untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Cholesterolangebot im NGM, in dem die Nematoden aufgezogen wurden, verdreifacht, um zu untersuchen, ob dadurch der protektive Effekt eines gehemmten Steroid-Signalweges auf die Paralyse in CL2006 relativiert werden kann. Die erhöhte Cholesterolkonzentration bewirkte in der Vektor-Kontrolle keine Steigerung der Paralyse in CL2006. Dies bedeutet, dass der Steroid-Signalweg unter Standardbedingungen von 5 μ g/ml Cholesterol offensichtlich den maximalen Effekt der Paralysesteigerung in CL2006 ausübt. Erst durch die RNAi von *nhr-8*, *daf-36*, *daf-9* und *daf-12* wurde ein Effekt der erhöhten Cholesterolkonzentration deutlich, der in der Aufhebung der Paralyse-senkenden Wirkung der jeweiligen RNAi bestand. Mittels des blau-fluoreszierenden Cholesterolanalogons DHE, das in der Aufzucht von *C. elegans* statt Cholesterol als Sterolquelle eingesetzt werden kann und Aussagen über die relative Cholesterolaufnahme in *C. elegans* ermöglicht, konnte in CL2006 außerdem nachgewiesen werden, dass bei einem erhöhten Angebot an DHE, respektive Cholesterol, mehr der Sterole in den Organismus aufgenommen werden. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die DHE-, respektive Cholesterolversorgung abhängig von dem Cholesterol-Transportprotein VIT-6 ist. Die Relevanz von VIT-6 für die Cholesterolversorgung und damit die Paralyse konnte zudem durch eine Doppel-RNAi mit *nhr-8* nachgewiesen werden. Während eine Erhöhung des Cholesterols den senkenden Effekt der *nhr-8* RNAi auf die Paralyse aufheben konnte, führte der zusätzliche *knock-down* von VIT-6 zu einer signifikanten Reduktion der Paralyse, auch unter erhöhten Cholesterolkonzentrationen im Medium.

Die Wirkung des Steroid-Signalweges in Abhängigkeit seines Substrats auf die DAF-16-Translokation wird dadurch sichtbar, dass die durch die Hemmung des Steroid-Signalweges bedingte Erhöhung der nukleären DAF-16-Lokalisation durch die Erhöhung der Cholesterolkonzentration reduziert werden konnte. Die Relevanz der Cholesterolverorgung für die Aktivität von DAF-16 konnten auch IHARA *et al.* nachweisen, die infolge einer reduzierten Cholesterolverorgung einen steigernden Effekt auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors feststellten [350].

Da die nukleären Hormonrezeptoren DAF-12 und NHR-8 Homologe des humanen Vitamin D-Rezeptors darstellen und Vitamin D ein Strukturhomolog von Cholesterol ist, wurde die Wirkung von Cholecalciferol (Vitamin D₃) auf die Paralyse untersucht.

Die 48-stündige Inkubation der CL2006 Nematoden mit 1, 10 und 100 µM Cholecalciferol resultierte in einer signifikanten, gleich starken Senkung der Paralyserate. Einen ähnlichen Effekt konnten MARK *et al.* in einem anderen Alzheimermodell von *C. elegans* beobachten. In CL4176 senkte Vitamin D₃ die Paralyse allerdings konzentrationsabhängig. Sie setzten Vitamin D₃ in den Konzentrationen 10, 25, 50 und 100 µM ein, wobei die Inkubation mit 100 µM Vitamin D₃ den stärksten Effekt aufwies [351]. In der Publikation von MARK *et al.* wurde statt des in dieser Arbeit verwendeten Ethanol:Tween®20 als Lösungsmittel für Vitamin D₃ DMSO eingesetzt, wodurch die Wirkung von Vitamin D₃ beeinflusst werden könnte. Zu dem besteht auch ein Unterschied in der Inkubationsart mit Vitamin D₃, denn in der Publikation wurden die CL4176 ab dem L3-Stadium für insgesamt 36 h auf Agar-Platten mit Vitamin D₃ behandelt.

Als vermittelnder Mechanismus für den Paralyse-senkenden Effekt des Cholecalciferols konnte in der vorliegenden Arbeit die Konkurrenz mit Cholesterol um die Bindung an die Mitglieder des Steroid-Signalweges identifiziert werden. Durch Cholecalciferol wird bereits die Aufnahme von Cholesterol gesenkt, denn beide Steroide werden offensichtlich mittels VIT-6 transportiert. Jedenfalls senkte Cholecalciferol in der vorliegenden Arbeit die Aufnahme von DHE signifikant. Dieser Verdrängungseffekt war auch hinsichtlich der Paralyse nachweisbar, in dem eine erhöhte Cholesterolzufuhr [15 µg/ml] den Paralyse-senkenden Effekt von Cholecalciferol in CL2006 wieder aufhob. Um zu ermitteln, ob die Wirkung von Cholecalciferol auf die Paralyse über den Steroid-Signalweg vermittelt wird, erfolgte unter dessen RNAi-induzierter Hemmung die Gabe von Cholecalciferol. Da unter diesen Bedingungen keine zusätzliche Reduktion der durch *nhr-8*, *daf-36*, *daf-9* bzw. *daf-12* RNAi bereits reduzierten Paralyserate zu beobachten war, kann angenommen werden, dass Cholecalciferol den Steroid-Signalweg hemmt.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit herausgestellt werden, dass wiederum der DAF-16 Transkriptionsfaktor essenziell für die Wirkung von Cholecalciferol ist, da unter *daf-16* RNAi kein Paralyse-senkender Effekt mehr in CL2006 beobachtet werden konnte. Cholecalciferol induzierte zudem und erwartungsgemäß eine Steigerung der nukleären DAF-16-Translokation.

MESSING *et al.* untersuchten die Wirkung von Cholecalciferol im Wildtyp von *C. elegans* und in einer *daf-12* Mutante. Es wurde jeweils ein lebensverlängernder Effekt von 1000 µg/ml Cholecalciferol festgestellt, wobei dieser im Wildtyp signifikant stärker ausgeprägt war als in der *daf-12* Mutante. Die Autoren vermuten, dass Cholecalciferol neben DAF-12 noch über weitere nukleäre Hormonrezeptoren seine Wirkung auf die Lebensspanne vermittelt [352]. Hinsichtlich des in dieser Arbeit nachgewiesenen hemmenden Effekts des Cholecalciferols auf den Steroid-Signalweg kann das Ergebnis von MESSING *et al.* auch dahingehend interpretiert werden, dass durch die Mutation in *daf-12* andere Mechanismen vermittelt werden als durch dessen Hemmung. Die Cholecalciferol-induzierte Hemmung von DAF-12 entspricht der Wirkung eines Liganden-freien DAF-12, dass die nukleäre Aktivität von DAF-16 fördert. Wenn hingegen durch eine Mutation kein funktionelles DAF-12 mehr verfügbar ist, wird auch nicht mehr die Aktivität von DAF-16 induziert. Der geringere lebensverlängernde Effekt von Cholecalciferol in der *daf-12* Mutante legt die Vermutung nahe, dass Cholecalciferol womöglich einen weiteren protektiven Mechanismus initiiert. MARK *et al.* zeigten, dass Cholecalciferol mit funktionellen Proteinen der Proteostase interagiert und dadurch die Lebensspanne von *C. elegans* erweitert [351].

Nachdem mittels der Paralysemessungen herausgestellt werden konnte, dass sich die Aktivität von DAF-12 auf die A β -Toxizität in CL2006 auswirkt, war es ein Ziel der Arbeit, zu überprüfen, ob sich dieses Ergebnis auf der Veränderung von A β -Ablagerungen in CL2006 begründet. REGITZ und WENZEL haben diesbezüglich bereits gezeigt, dass die Paralyse von CL2006 mit dem erhöhten Vorkommen an aggregiertem Protein assoziiert ist [324].

In dieser Arbeit wurde für die Anfärbung der A β -Ablagerungen in CL2006 der Fluoreszenzfarbstoff NIAD-4 verwendet, der spezifisch an A β -Fibrillen bindet [319, 320]. In CL2006 Nematoden, in denen RNAi-vermittelt die DAF-12-Expression vermindert wurde, konnte eine signifikante Reduktion der relativen NIAD-4 Fluoreszenz gemessen werden, die auf eine Senkung der gebildeten A β -Ablagerungen schließen lässt. Aufgrund der vorhergehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe, die eine essenzielle Bedeutung des Proteinabbaus über die Autophagie und das UPS im Rahmen der Protektion gegenüber A β -induzierter Degeneration in CL2006 beschrieben haben [353, 354], sollte schließlich überprüft werden, ob der zentrale

Regulator mit Einfluss auf die Paralyse, DAF-16, diese Abbauwege in ihrer Aktivität beeinflusst. Für die Bestimmung der Autophagie wurden die Lysosomen als finale Strukturen mit dem Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker® Red DND-99 angefärbt. Um die Aktivität des UPS zu bestimmen, wurde ein fluorogenes Substrat verwendet, das durch die Chymotrypsin-ähnliche Protease des Proteasoms abgebaut und damit detektierbar wird. Unter *daf-16* RNAi war sowohl der lysosomale als auch der proteasomale Abbau in CL2006 vermindert, was somit final den Paralyse-steigernden Effekt unter *daf-16* RNAi erklären könnte. Da die *daf-12* RNAi mit einer Reduktion der gebildeten A β -Fibrillen in CL2006 einhergeht, kann durch die vorher gezeigte regulative Funktion auf die DAF-16 Aktivität postuliert werden, dass weniger Liganden-gebundenes DAF-12 vermutlich mit einem gesteigerten lysosomalen und proteasomalen Abbau von A β einhergeht. In der Studie von JIA *et al.* war die Überexpression von DAF-16 in *C. elegans* mit einer vermehrten Bildung von Autophagosomen verbunden [355]. TÓTH *et al.* postulieren resultierend aus ihren Untersuchungen, dass Signalwege, die mit der Langlebigkeit assoziiert sind, letztlich die Autophagie positiv regulieren. Die in *daf-2* Mutanten gemessene Erweiterung der Lebensspanne wurde durch die zusätzliche Mutation eines Autophagie-relevanten Gens gehemmt [356]. Weiterhin beschreiben COHEN *et al.* für DAF-16 einen protektiven Einfluss auf die Aggregation von A β ₁₋₄₂ in *C. elegans* [357].

Daraus lässt sich folgern, dass durch die Hemmung des Steroid-Signalweges und der damit verbundenen Aktivierung von DAF-16 Proteinabbauwege stimuliert werden, welche die Proteinaggregation und damit die A β -Toxizität limitieren.

5.2 Die Aktivität des PPAR α -Homologs NHR-49 wirkt sich protektiv auf die β -Amyloid-induzierte Toxizität in CL2006 aus

Ein weiterer nukleärer Hormonrezeptor, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, war das PPAR α -Homolog NHR-49. Die nukleären Hormonrezeptoren der PPAR-Familie, die durch die Bindung von Fettsäuren reguliert werden, sind u.a. an der Regulation des Fett- und des Cholesterolfstoffwechsels beteiligt. Alle PPAR-Isoformen werden im adulten Gehirn des Menschen exprimiert [358].

Im Zusammenhang mit der AD werden den PPAR α -Agonisten neuroprotektive Funktionen zugesprochen. Fibrate agieren als Agonisten von PPAR α und sind an verschiedenen regulativen Mechanismen beteiligt, welche die Alzheimer-Pathogenese hemmen. In einer Studie mit APP/PS1 transgenen Mäusen konnte ein steigender Effekt von Fenofibrat auf die PPAR α -Expression gezeigt werden, der mit reduzierten BACE-1 mRNA- und Protein-Spiegeln assoziiert

war. Dieses Ergebnis war mit einer geringeren Bildung von löslichem APP β und A β ₁₋₄₂ assoziiert [191]. Damit einhergehend sind die Ergebnisse von CORBETT *et al.*, die in Mäusen in Verbindung mit der Aktivität von PPAR α eine gesteigerte Expression von ADAM10 beobachten konnten, die in der nicht-amyloidogenen Verstoffwechslung von APP resultierte [359]. Durch die Interaktion mit HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren wie den Statinen hat PPAR α zudem eine regulative Funktion auf die Expression von BDNF, die in einem Alzheimer-Mausmodell zu einer verbesserten Gedächtnis- und Lernfunktion führte [360]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass der aktivierte PPAR α -Transkriptionsfaktor einen stimulierenden Einfluss auf die Autophagie hat und sich durch den vermehrten autophagosomalen Abbau von A β die kognitive Funktion in einem Alzheimer-Mausmodell verbesserte [192].

Als Bindungspartner für das PPAR α -Homolog NHR-49 konnten PATHARE *et al.* NHR-66 und NHR-80 in *C. elegans* identifizieren, die an der Regulation von NHR-49-Zielgenen beteiligt sind und daher die Ausprägung der verschiedenen Phänotypen der *nhr-49*-Mutanten beeinflussen [289]. Die Heterodimerisierung von NHR-49 und NHR-66 führt zu einer Hemmung des Sphingolipidabbaus und der Lipaseaktivität [289, 361]. NHR-80 reguliert durch die Interaktion mit NHR-49 die Genexpression von Fettsäuren-Desaturasen, wodurch u.a. das Verhältnis von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren in den Lipidmembranen von *C. elegans* modifiziert wird [289]. Weiterhin konnten GOUDEAU *et al.* in Nematoden, den die Keimbahn entfernt wurde, zeigen, dass die daraus resultierende Verlängerung der Lebensspanne eine gesteigerte Aktivität von NHR-80 benötigt. NHR-80 bewirkte unter diesen Bedingungen eine gesteigerte Genexpression von *fat-6*, welches für die $\Delta 9$ -Desaturase kodiert, wodurch die Bildung von Ölsäure gesteigert wurde [362]. In der Studie von BROCK *et al.* zeigten *C. elegans* Nematoden, die eine Mutation in *nhr-80* hatten, eine geringere Verkürzung der Lebensspanne im Vergleich zu Nematoden, die eine Mutation in *nhr-49* aufwiesen. Dies kann auf den unterschiedlichen regulierten Zielgenen von NHR-49 und NHR-80 begründet sein [363]. HORIKAWA und SAKAMOTO stellten durch ihre Untersuchungen in *C. elegans* fest, dass der Fettsäuren-Stoffwechsel in Stressresistenz-Mechanismen involviert ist. Dabei konnte zum Teil eine Abhängigkeit von der DAF-16-Aktivität herausgestellt werden [364].

Sowohl die innerhalb dieser Arbeit durchgeführte *nhr-49* RNAi als auch die verminderte Expression der beiden Bindungspartner von NHR-49, NHR-66 und NHR-80, resultierten in einer signifikanten Steigerung der Paralyserate in CL2006. Dies zeigt, dass sich die Aktivität vom PPAR α -Homolog NHR-49 und von seinen Bindungspartnern auch in *C. elegans* protektiv auf die A β -Toxizität auswirkt. Um zu ergründen, ob die Aktivität von NHR-49 auf die Aktivität des Steroid-Signalweges einwirkt, erfolgte eine Doppel-RNAi von *nhr-49* mit *daf-9* und

daf-12. Da sich der Effekt der *nhr-49* RNAi in beiden Fällen als dominant herausstellte, kann postuliert werden, dass die Aktivität von NHR-49 stromaufwärts des Steroid-Signalweges lokalisiert ist.

Die *nhr-49* RNAi resultierte erwartungsgemäß auch in einer signifikanten Reduktion der nukleären DAF-16-Lokalisation. Während der Doppel-RNAi mit *daf-9* und *daf-12* war der Effekt der *nhr-49* RNAi auf die nukleäre DAF-16-Lokalisation dominant. Zusammen mit den unter diesen Bedingungen beobachteten Effekten auf die Paralyserate in CL2006 kann geschlussfolgert werden, dass NHR-49 die nukleäre Lokalisation und die Aktivität von DAF-16 durch die Hemmung des Steroid-Signalweges steigert.

RATNAPPAN *et al.* untersuchten in *C. elegans* Nematoden, denen die Keimbahn-Stammzellen entfernt wurden, den Effekt der Inaktivierung von NHR-49 auf die DAF-16-Aktivität. Interessanterweise konnte in dieser Studie festgestellt werden, dass die Expression der DAF-16-Zielgene durch die Inaktivierung von NHR-49 gehemmt wurde. Weiterhin wurde im Zusammenhang mit der Inaktivität von NHR-49 in dieser Studie gezeigt, dass das Protein KRI-1, das für die nukleäre Lokalisation von DAF-16 in *C. elegans* essenziell ist, vermehrt in den Membranen statt im Cytosol und Nukleus lokalisiert ist [365]. In einer weiteren Studie haben RATNAPPAN *et al.* außerdem festgestellt, dass DAF-16 eine erhöhte Transkription von NHR-49 in Keimbahn-losen *C. elegans* Nematoden vermittelt [287]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwischen NHR-49 und DAF-16 eine positive *Feedback*-Regulation besteht, die mit verantwortlich für den lebensverlängernden Effekt während der Entfernung der Keimbahn in *C. elegans* ist [365].

In weiterführenden Experimenten außerhalb der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich die Wirkung des PPAR α -Agonisten Fenofibrat in diesem Zusammenhang untersucht. Die 48 h andauernde Behandlung mit 10 μ M Fenofibrat reduzierte die Paralyserate in CL2006 und steigerte gleichzeitig die nukleäre DAF-16-Lokalisation in TJ356. Über eine *nhr-49* RNAi konnte in beiden Modellen nachgewiesen werden, dass die gezeigten Effekte vom PPAR α -Homolog NHR-49 abhängig waren.

Dahingegen zeigten weder die *nhr-66* noch die *nhr-80* RNAi einen Einfluss auf die nukleäre DAF-16-Lokalisation. Deshalb wurde überprüft, ob durch die Bindungspartner die transkriptionelle Aktivität von DAF-16 beeinflusst wird. Die zu diesem Zweck durchgeführte Messung der Expression des DAF-16 Zielgens SOD-3 zeigte für die RNAi von *nhr-80* einen steigernden Effekt auf die Expression. Unter der *nhr-66* RNAi blieb die SOD-3-Expression unverändert. GOUDEAU *et al.* stellten ebenso in Keimbahn-losen *C. elegans* Nematoden fest, dass die *nhr-80* RNAi keinen Effekt auf die DAF-16-Translokation hat. Stattdessen konnten sie im Hinblick

auf die Ausprägung der Lebensspanne zeigen, dass DAF-16 die transkriptionelle Aktivität von NHR-80 beeinflussen kann [362].

Da somit der Paralyse-senkende Effekt von NHR-66 und NHR-80 weder durch eine erhöhte nukleäre DAF-16-Lokalisation noch durch eine erhöhte SOD-3-Expression zu erklären war, wurde als nächstes überprüft, ob die von NHR-49 und seinen Bindungspartnern regulierte β -Oxidation eine Relevanz für deren Einfluss auf die A β -Toxizität in CL2006 hat. Dies wurde exemplarisch anhand der *nhr-80* RNAi untersucht. Das Gen *ech-1* kodiert in *C. elegans* für die Enoyl-CoA Hydratase, die in der β -Oxidation involviert ist. Mittels der qRT-PCR wurde die regulative Funktion der *nhr-80* RNAi für die *ech-1* Expression überprüft. Tatsächlich bewirkte die *nhr-80* RNAi eine Reduktion der *ech-1*-Transkriptspiegel. PATHARE *et al.* beschreiben auch für die Aktivität von NHR-49 und NHR-66 eine Steigerung der *ech-1*-Expression in *C. elegans* [289]. In Anbetracht dessen, dass die RNAi von *ech-1* in einer signifikanten Steigerung der Paralyserate von CL2006 resultierte, kann postuliert werden, dass der Paralyse-steigernde Effekt der *nhr-80* RNAi und vermutlich auch der *nhr-66* RNAi auf der gehemmten β -Oxidation beruht.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Mit der zunehmenden Lebenserwartung des Menschen ist ein vermehrtes Auftreten von neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz zu beobachten. Sie ist die häufigste Form der Altersdemenz und zeichnet sich histopathologisch durch das Auftreten von senilen Plaques im Gehirn aus, welche durch die neuronale Ablagerung von β -Amyloid (A β)-Aggregaten charakterisiert sind. Aufgrund der damit verbundenen neurotoxischen Effekte wird die Akkumulation von A β -Aggregaten als eine Hauptursache für die Alzheimer typische Symptomatik angesehen, die sich im Wesentlichen durch eine fortschreitende kognitive Dysfunktion der Betroffenen auszeichnet. Neben der genetisch bedingten Alzheimer-Demenz gibt es eine sporadische Form, für die sowohl verschiedene Risiko- als auch präventive Faktoren diskutiert werden. Zahlreiche Faktoren der Nahrung wirken entweder direkt oder als Vorläufer auf die Aktivität nukleärer Hormonrezeptoren ein und beeinflussen dadurch zahlreiche Prozesse, die im Rahmen der Alzheimer-Pathogenese von Relevanz sind. In diesem Zusammenhang wird einerseits Cholesterin als fördernd und Vitamin D₃ als verhindernd oder verzögernd für die Alzheimer-Pathogenese beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde das transgene *C. elegans* Alzheimer-Modell CL2006 verwendet, das in seinen Muskelzellen humanes A β ₁₋₄₂ bildet und bedingt durch die daraus resultierende gehemmte neuromuskuläre Transmission mit fortschreitendem Alter einen charakteristischen Paralyse-Phänotyp ausbildet.

In *C. elegans* wird Cholesterin durch den Steroid-Signalweg zu diacyclischen Säuren verstoffwechselt, die als Liganden für den nukleären Hormonrezeptor DAF-12 fungieren. Die durch RNA-Interferenz (RNAi) erzielte verminderte Expression des *daf-36* Gens, das für ein Mitglied des Steroid-Signalweges kodiert, und des *nhr-8* Gens, das für einen nukleären Hormonrezeptor mit regulatorischer Funktion für den Steroid-Signalweg kodiert, führten zu einer reduzierten Paralyse in CL2006. Außerdem konnte infolge der RNAi-vermittelten Hemmung des Steroid-Signalweges sowohl eine gesteigerte nukleäre Lokalisation des stromabwärts positionierten DAF-16 Transkriptionsfaktors als auch eine gesteigerte SOD-3-Expression mithilfe von transgenen Nematodenstämmen, die ein GFP-Reporter gen an den entsprechenden Promotor gekoppelt haben, nachgewiesen werden. Demzufolge bewirkte die reduzierte Aktivität des Steroid-Signalweges eine Aktivierung des Stressantwort-Genes transkribierenden DAF-16. Die mit der Hemmung des Steroid-Signalweges verbundenen protektiven Effekte auf den Alzheimer-Phänotyp konnten durch eine Erhöhung der Cholesterin-Applikation allesamt wieder aufgehoben werden.

Weiterhin hat sich gezeigt, dass DAF-12 durch die Hemmung von DAF-16 auch den proteasomalen und lysosomalen Abbau von A β -Aggregaten reduziert.

Das als neuroprotektiv diskutierte Vitamin D₃ senkte bereits in einer Konzentration von 1 μ M signifikant die Paralyse in CL2006. Es konnte gezeigt werden, dass der protektive Effekt von Cholecalciferol auf einer Kompetition mit Cholesterolem um die Aufnahme in die Intestinalzellen und die Interaktion mit den Mitgliedern des Steroid-Signalweges beruht. Letztlich bewirkte dies eine verstärkte nukleäre Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16, der sich auch für die Alzheimer-Phänotyp-reduzierenden Effekte des Vitamin D₃ als essenziell herausstellte.

PPAR- α ist ein nukleärer Hormonrezeptor, dem eine protektive Rolle im Hinblick auf die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung zugesprochen wird. Sowohl der *knock-down* von NHR-49 als auch von seinen Bindungspartnern NHR-66 und NHR-80 steigerten die Paralyse in CL2006 signifikant. Mittels Doppel-RNAi von *nhr-49* und *daf-9* bzw. *daf-12* konnte gezeigt werden, dass NHR-49 stromaufwärts des Steroid-Signalweges positioniert ist und die Aktivität des Steroid-Signalweges hemmt. Während allerdings NHR-49 die nukleäre DAF-16-Lokalisation bewirkt, können dies dessen Bindungspartner nicht. Auch die transkriptionelle Steigerung der SOD-3-Expression wurde weder durch NHR-66 noch durch NHR-80 verändert. Vielmehr scheinen die NHR-49-Bindungspartner über eine Steigerung der Fettsäuren- β -Oxidation, die auch ein typisches reguliertes Ziel von NHR-49 darstellt, den Alzheimer-Phänotyp zu reduzieren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Steroid-Signalweg durch die Generierung von Liganden für DAF-12 in *C. elegans* zu einer Hemmung der nukleären DAF-16-Translokation und damit zu einem reduzierten Schutz gegenüber der A β -induzierten Paralyse führt. Cholesterolem als Substrat des Steroid-Signalweges wirkt somit hemmend auf die nukleäre DAF-16-Translokation und verstärkt den Alzheimer-Phänotyp in CL2006. Vitamin D₃ konkurriert mit den Cholesterolem-Metaboliten um die Bindung an die Mitglieder des Steroid-Signalweges.

NHR-49 konnte schließlich als ein weiterer nukleärer Hormonrezeptor identifiziert werden, der den Steroid-Signalweg inhibiert und darüber DAF-16-abhängig die Paralyse in CL2006 senkt.

7 SUMMARY

With the increasing life expectancy of humans an increased occurrence of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's dementia can be observed. It is the most common form of senile dementia and is characterized histopathologically by the appearance of senile plaques in the brain, which are characterized by the neuronal deposition of amyloid β ($A\beta$) aggregates. Due to the associated neurotoxic effects, the accumulation of $A\beta$ aggregates is considered to be a major cause of Alzheimer's typical symptoms, which are essentially characterized by progressive cognitive dysfunction of the affected persons. In addition to genetically caused Alzheimer's dementia, there is a sporadic form for which various risk and preventive factors are discussed. Numerous dietary factors have a direct or precursor effect on the activity of nuclear hormone receptors and thus influence numerous processes relevant to Alzheimer's pathogenesis. In this context, cholesterol is described as promoting and vitamin D_3 as preventing or delaying Alzheimer's pathogenesis. The present work uses the transgenic *C. elegans* Alzheimer model CL2006, which expresses human $A\beta_{1-42}$ in its muscle cells and forms a characteristic paralysis phenotype with progressive age due to the resulting inhibited neuromuscular transmission.

In *C. elegans*, cholesterol is metabolized by the steroid-signaling pathway to dafachronic acids, which act as ligands for the nuclear hormone receptor DAF-12. Reduced expression by RNA interference (RNAi) of the *daf-36* gene, which encodes a member of the steroid-signaling pathway, and the *nhr-8* gene, which encodes a nuclear hormone receptor with regulatory function for the steroid-signaling pathway, led to reduced paralysis in CL2006. In addition, experiments in transgenic nematode strains that coupled a GFP reporter gene with the corresponding promoter showed that RNAi-mediated inhibition of the steroid-signaling pathway led to increased nuclear localization of the downstream DAF-16 transcription factor and increased SOD-3 expression. Consequently, the reduced activity of the steroid-signaling pathway led to activation of the stress response gene transcribing DAF-16. The protective effects on the Alzheimer phenotype associated with the inhibition of the steroid-signaling pathway could all be reversed by an increase of cholesterol application.

Furthermore, DAF-12 has been shown to reduce proteasomal and lysosomal degradation of $A\beta$ aggregates by inhibiting DAF-16.

Vitamin D_3 , which is discussed as neuroprotective, already significantly lowered paralysis in CL2006 at a concentration of 1 μ M. It could be shown that the protective effect of cholecalciferol is based on competition with cholesterol for uptake into intestinal cells and interaction with

members of the steroid-signaling pathway. Finally, this led to an increased nuclear localization of the transcription factor DAF-16, which was also found to be essential for the Alzheimer phenotype-reducing effects of vitamin D₃.

PPAR- α is a nuclear hormone receptor that is expected to play a protective role in the development of Alzheimer's disease. Both knockdown of NHR-49 and its binding partners NHR-66 and NHR-80 significantly increased paralysis in CL2006. Double RNAi of *nhr-49* and *daf-9* or *daf-12* showed that NHR-49 is positioned upstream of the steroid-signaling pathway and inhibits the activation of the steroid-signaling pathway. However, while NHR-49 causes DAF-16 nuclear localization, its binding partners do not. Neither NHR-66 nor NHR-80 altered the transcriptional increase of SOD-3 expression. The NHR-49 binding partners seem to reduce the Alzheimer's phenotype by increasing fatty acid oxidation, which is also a typical regulated target of NHR-49.

In summary, it can be concluded that the steroid-signaling pathway, by generating ligands for DAF-12 in *C. elegans*, leads to inhibition of nuclear DAF-16 translocation and thus to reduced protection against A β -induced paralysis. As a substrate of the steroid-signaling pathway, cholesterol thus inhibits nuclear DAF-16 translocation and enhances the Alzheimer's phenotype in CL2006. Vitamin D₃ competes with cholesterol metabolites for binding to members of the steroid-signaling pathway.

Finally, NHR-49 was identified as another nuclear hormone receptor that inhibits the steroid-signaling pathway and reduces paralysis in CL2006 depending on DAF-16.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Maurer, K., Volk, S., Gerbaldo, H. (1997): Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet*, 349 (9064): 1546–1549.
2. Alzheimer, A. (1906): Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt*, 23: 1129–1136.
3. Gorevic, P. D., Goñi, F., Pons-Estel, B., Alvarez, F., Peress, N. S., Frangione, B. (1986): Isolation and partial characterization of neurofibrillary tangles and amyloid plaque core in Alzheimer's disease: immunohistological studies. *J Neuropathol Exp Neurol*, 45 (6): 647–664.
4. Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., Beyreuther, K. (1985): Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 82 (12): 4245–4249.
5. Selkoe, D. J., Abraham, C. R., Podlisny, M. B., Duffy, L. K. (1986): Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease. *J Neurochem.*, 46 (6): 1820–1834.
6. Glenner, G. G., Wong, C. W. (2012): Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. 1984. *Biochem Biophys Res Commun*, 425 (3): 534–539.
7. Thal, D. R., Braak, H. (2005): Postmortale Diagnosestellung bei Morbus Alzheimer. *Pathologe*, 26 (3): 201–213.
8. Rouch, I., Dorey, J.-M., Boublay, N., Henaff, M.-A., Dibie-Racoupeau, F., Makaroff, Z., Harston, S., Benoit, M., Barrellon, M.-O., Fédérico, D., Laurent, B., Padovan, C., Krolak-Salmon, P. (2014): Personality, Alzheimer's disease and behavioural and cognitive symptoms of dementia: the PACO prospective cohort study protocol. *BMC Geriatr.*, 14: 110.
9. Mega, M. S., Cummings, J. L., Fiorello, T., Gornbein, J. (1996): The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology*, 46 (1): 130–135.
10. Shimabukuro, J., Awata, S., Matsuoka, H. (2005): Behavioral and psychological symptoms of dementia characteristic of mild Alzheimer patients. *Psychiatry Clin Neurosci.*, 59 (3): 274–279.
11. Shin, I.-S., Carter, M., Masterman, D., Fairbanks, L., Cummings, J. L. (2005): Neuropsychiatric symptoms and quality of life in Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry.*, 13 (6): 469–474.

12. World Health Organization (2019): Dementia, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (Zugriff am 25.09.2019).
13. Sütterlin, S., Hoßmann, I., Klingholz, R. (2011): Demenz-Report: Wie sich die Regionen in Deutschland, Österreich und der Schweiz auf die Alterung der Gesellschaft vorbereiten können. Erste Auflage, Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung, Berlin.
14. Ferencz, B., Gerritsen, L. (2015): Genetics and underlying pathology of dementia. *Neuropsychol Rev.*, 25 (1): 113–124.
15. Wyss-Coray, T. (2016): Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature*, 539 (7628): 180–186.
16. Tom, S. E., Hubbard, R. A., Crane, P. K., Haneuse, S. J., Bowen, J., McCormick, W. C., McCurry, S., Larson, E. B. (2015): Characterization of dementia and Alzheimer's disease in an older population: updated incidence and life expectancy with and without dementia. *Am J Public Health.*, 105 (2): 408–413.
17. Querfurth, H. W., LaFerla, F. M. (2010): Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.*, 362 (4): 329–344.
18. Herrup, K. (2015): The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci.*, 18 (6): 794–799.
19. Mangialasche, F., Xu, W., Kivipelto, M. (2013): Prevention of Alzheimer's Disease: Intervention Studies. *InTech*.
20. von Arnim, C. A. F., Gola, U., Biesalski, H. K. (2010): More than the sum of its parts? Nutrition in Alzheimer's disease. *Nutrition*, 26 (7-8): 694–700.
21. Johansson, L., Guo, X., Hällström, T., Norton, M. C., Waern, M., Ostling, S., Bengtsson, C., Skoog, I. (2013): Common psychosocial stressors in middle-aged women related to longstanding distress and increased risk of Alzheimer's disease: a 38-year longitudinal population study. *BMJ Open*, 3 (9): e003142.
22. Ahlskog, J. E., Geda, Y. E., Graff-Radford, N. R., Petersen, R. C. (2011): Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. *Mayo Clin Proc*, 86 (9): 876–884.
23. Reitz, C., Mayeux, R. (2014): Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol.*, 88 (4): 640–651.
24. Rodda, J., Carter, J. (2012): Cholinesterase inhibitors and memantine for symptomatic treatment of dementia. *BMJ*, 344: e2986.
25. Ubhi, K., Masliah, E. (2013): Alzheimer's disease: recent advances and future perspectives. *J Alzheimers Dis.*, 33 Suppl 1: S185-S194.

26. Yan, R., Vassar, R. (2014): Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol.*, 13 (3): 319–329.
27. Crump, C. J., Johnson, D. S., Li, Y.- (2013): Development and mechanism of γ -secretase modulators for Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 52 (19): 3197–3216.
28. Xin, S. H., Tan, L., Cao, X., Yu, J. T. (2018): Clearance of Amyloid Beta and Tau in Alzheimer's Disease: from Mechanisms to Therapy. *Neurotox Res*, 34 (3): 733–748.
29. Song, J. H., Yu, J. T., Tan, L. (2015): Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alzheimer's Disease: Risk, Mechanisms, and Therapy. *Mol Neurobiol*, 52 (3): 1477–1493.
30. Dumont, M., Beal, M. F. (2011): Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*, 51 (5): 1014–1026.
31. Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrazek, R., Mackenzie, I. R., McGeer, P. L., O'Banion, M. K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., Wyss-Coray, T. (2000): Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 21 (3): 383–421.
32. LaFerla, F. M., Green, K. N., Oddo, S. (2007): Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.*, 8 (7): 499–509.
33. Zhang, H., Ma, Q., Zhang, Y. W., Xu, H. (2012): Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J Neurochem.*, 120 Suppl 1: 9–21.
34. Dawkins, E., Small, D. H. (2014): Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem.*, 129 (5): 756–769.
35. Müller, U. C., Zheng, H. (2012): Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2 (2): a006288.
36. Haass, C., Selkoe, D. J. (2007): Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8 (2): 101–112.
37. Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J., Hooper, N. M. (2003): ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res*, 74 (3): 342–352.
38. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M. (1999): Beta-secretase cleavage of Alzheimer's

- amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286 (5440): 735–741.
39. Iwatsubo, T. (2004): The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Curr Opin Neurobiol*, 14 (3): 379–383.
40. Thinakaran, G., Koo, E. H. (2008): Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*, 283 (44): 29615–29619.
41. Gouras, G. K., Almeida, C. G., Takahashi, R. H. (2005): Intraneuronal Abeta accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 26 (9): 1235–1244.
42. Takahashi, R. H., Nagao, T., Gouras, G. K. (2017): Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol Int*, 67 (4): 185–193.
43. Lai, A. Y., McLaurin, J. (2010): Mechanisms of amyloid-beta peptide uptake by neurons: the role of lipid rafts and lipid raft-associated proteins. *Int J Alzheimers Dis*, 2011: 548380.
44. Kam, T. I., Gwon, Y., Jung, Y. K. (2014): Amyloid beta receptors responsible for neurotoxicity and cellular defects in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*, 71 (24): 4803–4813.
45. Jaeger, S., Pietrzik, C. U. (2008): Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.*, 5 (1): 15–25.
46. Kandimalla, K. K., Scott, O. G., Fulzele, S., Davidson, M. W., Poduslo, J. F. (2009): Mechanism of neuronal versus endothelial cell uptake of Alzheimer's disease amyloid beta protein. *PloS one*, 4 (2): e4627.
47. Wilson, C. A., Doms, R. W., Lee, V. M. (1999): Intracellular APP processing and A beta production in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58 (8).
48. Del Prete, D., Suski, J. M., Oulès, B., Debayle, D., Gay, A. S., Lacas-Gervais, S., Busiere, R., Bauer, C., Pinton, P., Paterlini-Bréchet, P., Wieckowski, M. R., Checler, F., Chami, M. (2017): Localization and Processing of the Amyloid- β Protein Precursor in Mitochondria-Associated Membranes. *J Alzheimers Dis.*, 55 (4): 1549–1570.
49. Bouter, Y., Dietrich, K., Wittnam, J. L., Rezaei-Ghaleh, N., Pillot, T., Papot-Couturier, S., Lefebvre, T., Sprenger, F., Wirths, O., Zweckstetter, M., Bayer, T. A. (2013): N-truncated amyloid β (A β) 4-42 forms stable aggregates and induces acute and long-lasting behavioral deficits. *Acta Neuropathol.*, 126 (2): 189–205.
50. Pauwels, K., Williams, T. L., Morris, K. L., Jonckheere, W., Vandersteen, A., Kelly, G., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Pastore, A., Serpell, L. C., Broersen, K. (2012):

- Structural basis for increased toxicity of pathological $a\beta_{42}:a\beta_{40}$ ratios in Alzheimer disease. *J Biol Chem.*, 287 (8): 5650–5660.
51. Chen, Y. R., Glabe, C. G. (2006): Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid-beta peptides Abeta40 and Abeta42: stable trimer or tetramer formation by Abeta42. *J Biol Chem.*, 281 (34): 24414–24422.
 52. Hardy, J., Higgins, G. (1992): Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256 (5054): 184–185.
 53. McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A. I., Masters, C. L. (1999): Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 46 (6): 860–866.
 54. Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E., Rogers, J. (1999): Soluble Amyloid β Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer's Disease. *Am J Pathol.*, 155 (3): 853–862.
 55. Tamagno, E., Bardini, P., Guglielmotto, M., Danni, O., Tabaton, M. (2006): The various aggregation states of beta-amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression. *Free Radic Biol Med.*, 41 (2): 202–212.
 56. Lin, M. T., Beal, M. F. (2006): Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443 (7113): 787–795.
 57. Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S. C., Parker, I., Glabe, C. G. (2005): Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem.*, 280 (17): 17294–17300.
 58. Guglielmotto, M., Monteleone, D., Piras, A., Valsecchi, V., Tropiano, M., Ariano, S., Fornaro, M., Vercelli, A., Puyal, J., Arancio, O., Tabaton, M., Tamagno, E. (2014): $A\beta_{1-42}$ monomers or oligomers have different effects on autophagy and apoptosis. *Autophagy*, 10 (10): 1827–1843.
 59. Hardy, J., Selkoe, D. J. (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297 (5580): 353–356.
 60. Fonseca, M. B., Solá, S., Xavier, J. M., Dionísio, P. A., Rodrigues, C. M. (2013): Amyloid β peptides promote autophagy-dependent differentiation of mouse neural stem cells: $A\beta$ -mediated neural differentiation. *Mol Neurobiol*, 48 (3): 829–840.
 61. Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fà, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., Arancio, O. (2008): Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci.*, 28 (53): 14537–14545.

62. Arendt, T., Stieler, J. T., Holzer, M. (2016): Tau and tauopathies. *Brain Res Bull.*, 126 (Pt 3): 238–292.
63. Avila, J., Lucas, J. J., Perez, M., Hernandez, F. (2004): Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev.*, 84 (2): 361–384.
64. Leugers, C. J., Lee, G. (2010): Tau potentiates nerve growth factor-induced mitogen-activated protein kinase signaling and neurite initiation without a requirement for microtubule binding. *J Biol Chem.*, 285 (25): 19125–19134.
65. Mandelkow, E. M., Schweers, O., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Trinczek, B., Mandelkow, E. (1996): Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann N Y Acad Sci.*, 777: 96–106.
66. Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., Mucke, L. (2011): The Many Faces of Tau. *Neuron*, 70 (3): 410–426.
67. Fischer, D., Mukrasch, M. D., Biernat, J., Bibow, S., Blackledge, M., Griesinger, C., Mandelkow, E., Zweckstetter, M. (2009): Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochemistry*, 48 (42): 10047–10055.
68. Jho, Y. S., Zhulina, E. B., Kim, M. W., Pincus, P. A. (2010): Monte carlo simulations of tau proteins: effect of phosphorylation. *Biophys J*, 99 (8): 2387–2397.
69. Bergen, M. von, Barghorn, S., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. (2005): Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochim Biophys Acta.*, 1739 (2-3): 158–166.
70. Beharry, C., Cohen, L. S., Di, J., Ibrahim, K., Briffa-Mirabella, S., Alonso, A. C. (2014): Tau-induced neurodegeneration: mechanisms and targets. *Neurosci Bull.*, 30 (2): 346–358.
71. Congdon, E. E., Duff, K. E. (2008): Is tau aggregation toxic or protective? *J Alzheimers Dis.*, 14 (4): 453–457.
72. Hanger, D. P., Anderton, B. H., Noble, W. (2009): Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med.*, 15 (3): 112–119.
73. Terwel, D., Muyllaert, D., Dewachter, I., Borghgraef, P., Croes, S., Devijver, H., van Leuven, F. (2008): Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. *Am J Pathol.*, 172 (3): 786–798.
74. Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S. H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M., McGowan, E.

- (2001): Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*, 293 (5534): 1487–1491.
75. Boutajangout, A., Authelet, M., Blanchard, V., Touchet, N., Treppe, G., Pradier, L., Brion, J. P. (2004): Characterisation of cytoskeletal abnormalities in mice transgenic for wild-type human tau and familial Alzheimer's disease mutants of APP and presenilin-1. *Neurobiol Dis.*, 15 (1): 47–60.
76. Calkins, M. J., Reddy, P. H. (2011): Amyloid beta impairs mitochondrial anterograde transport and degenerates synapses in Alzheimer's disease neurons. *Biochim Biophys Acta.*, 1812 (4): 507–513.
77. Knobloch, M., Konietzko, U., Krebs, D. C., Nitsch, R. M. (2007): Intracellular A β and cognitive deficits precede beta-amyloid deposition in transgenic arcA β mice. *Neurobiol Aging.*, 28 (9): 1297–1306.
78. Moreira, P. I., Carvalho, C., Zhu, X., Smith, M. A., Perry, G. (2010): Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochim Biophys Acta.*, 1802 (1): 2–10.
79. Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R. L., Atwood, C. S., Johnson, A. B., Kress, Y., Vinters, H. V., Tabaton, M., Shimohama, S., Cash, A. D., Siedlak, S. L., Harris, P. L., Jones, P. K., Petersen, R. B., Perry, G., Smith, M. A. (2001): Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer's Disease. *J Neurosci.*, 21 (9): 3017–3023.
80. Wang, X., Su, B., Siedlak, S. L., Moreira, P. I., Fujioka, H., Wang, Y., Casadesus, G., Zhu, X. (2008): Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105 (49): 19318–19323.
81. Ibáñez, V., Pietrini, P., Alexander, G. E., Furey, M. L., Teichberg, D., Rajapakse, J. C., Rapoport, S. I., Schapiro, M. B., Horwitz, B. (1998): Regional glucose metabolic abnormalities are not the result of atrophy in Alzheimer's disease. *Neurology*, 50 (6): 1585–1593.
82. Parker, W. D., Parks, J., Filley, C. M., Kleinschmidt-DeMasters, B. K. (1994): Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology*, 44 (6): 1090–1096.
83. Casley, C. S., Canevari, L., Land, J. M., Clark, J. B., Sharpe, M. A. (2002): Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem.*, 80 (1): 91–100.
84. Rhein, V., Baysang, G., Rao, S., Meier, F., Bonert, A., Müller-Spahn, F., Eckert, A. (2009): Amyloid-beta leads to impaired cellular respiration, energy production and

- mitochondrial electron chain complex activities in human neuroblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol.*, 29 (6-7): 1063–1071.
85. Maurer, I., Zierz, S., Möller, H. J. (2000): A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol Aging.*, 21 (3): 455–462.
86. Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H., Zhu, X. (2014): Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.*, 1842 (8): 1240–1247.
87. Rodrigues, C. M., Solá, S., Brito, M. A., Brondino, C. D., Brites, D., Moura, J. J. (2001): Amyloid beta-peptide disrupts mitochondrial membrane lipid and protein structure: protective role of tauroursodeoxycholate. *Biochem Biophys Res Commun.*, 281 (2): 468–474.
88. Mark, R. J., Pang, Z., Geddes, J. W., Uchida, K., Mattson, M. P. (1997): Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *J Neurosci.*, 17 (3): 1046–1054.
89. Mecocci, P., MacGarvey, U., Beal, M. F. (1994): Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 36 (5): 747–751.
90. Aksenov, M. Y., Aksenova, M. V., Butterfield, D. A., Geddes, J. W., Markesbery, W. R. (2001): Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience.*, 103 (2): 373–383.
91. Marcus, D. L., Thomas, C., Rodriguez, C., Simberkoff, K., Tsai, J. S., Strafaci, J. A., Freedman, M. L. (1998): Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.*, 150 (1): 40–44.
92. Omar, R. A., Chyan, Y.-J., Andorn, A. C., Poeggeler, B., Robakis, N. K., Pappolla, M. A. (1999): Increased Expression but Reduced Activity of Antioxidant Enzymes in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.*, 1 (3): 139–145.
93. Kawahara, M., Negishi-Kato, M., Sadakane, Y. (2009): Calcium dyshomeostasis and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid protein. *Expert Rev Neurother.*, 9 (5): 681–693.
94. Arbel-Ornath, M., Hudry, E., Boivin, J. R., Hashimoto, T., Takeda, S., Kuchibhotla, K. V., Hou, S., Lattarulo, C. R., Belcher, A. M., Shakerdge, N., Trujillo, P. B., Muzikansky, A., Betensky, R. A., Hyman, B. T., Bacskai, B. J. (2017): Soluble oligomeric amyloid- β induces calcium dyshomeostasis that precedes synapse loss in the living mouse brain. *Mol Neurodegener.*, 12 (1): 27.
95. Petrushanko, I. Y., Mitkevich, V. A., Anashkina, A. A., Adzhubei, A. A., Burnysheva, K. M., Lakunina, V. A., Kamanina, Y. V., Dergousova, E. A., Lopina, O. D., Ogunshola, O.

- O., Bogdanova, A. Y., Makarov, A. A. (2016): Direct interaction of beta-amyloid with Na,K-ATPase as a putative regulator of the enzyme function. *Sci Rep.*, 6: 27738.
96. Berrocal, M., Sepulveda, M. R., Vazquez-Hernandez, M., Mata, A. M. (2012): Calmodulin antagonizes amyloid- β peptides-mediated inhibition of brain plasma membrane Ca(2+)-ATPase. *Biochim Biophys Acta.*, 1822 (6): 961–969.
97. Kim, J., Yang, Y., Song, S. S., Na, J. H., Oh, K. J., Jeong, C., Yu, Y. G., Shin, Y. K. (2014): Beta-amyloid oligomers activate apoptotic BAK pore for cytochrome c release. *Biophys J.*, 107 (7): 1601–1608.
98. Rossor, M. N., Fox, N. C., Mummery, C. J., Schott, J. M., Warren, J. D. (2010): The diagnosis of young-onset dementia. *Lancet Neurol.*, 9 (8): 793–806.
99. Antonarakis, S. E., Lyle, R., Dermitzakis, E. T., Reymond, A., Deutsch, S. (2004): Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet.*, 5 (10): 725–738.
100. Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Watkins, P. C., Bruns, G. A., St George-Hyslop, P., van Keuren, M. L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D. M., Neve, R. L. (1987): Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*, 235 (4791): 880–884.
101. Portelius, E., Soininen, H., Andreasson, U., Zetterberg, H., Persson, R., Karlsson, G., Blennow, K., Herukka, S. K., Mattsson, N. (2014): Exploring Alzheimer molecular pathology in Down's syndrome cerebrospinal fluid. *Neurodegener Dis.*, 14 (2): 98–106.
102. Tcw, J., Goate, A. M. (2017): Genetics of β -Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 7 (6): a024539.
103. Vilatela, M. E., López-López, M., Yescas-Gómez, P. (2012): Genetics of Alzheimer's disease. *Arch Med Res.*, 43 (8): 622–631.
104. Cacace, R., Slegers, K., van Broeckhoven, C. (2016): Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement.*, 12 (6): 733–748.
105. Alzheimer's Disease Collaborative Group (1995): The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nat Genet.*, 11 (2): 219–222.
106. Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T. (1995): Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, 376 (6543): 775–778.
107. Steiner, H. (2004): Uncovering gamma-secretase. *Curr Alzheimer Res.*, 1 (3): 175–181.

108. Larner, A. J., Doran, M. (2009): Genotype-phenotype relationships of presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease: an update. *J Alzheimers Dis.*, 17 (2): 259–265.
109. Bekris, L. M., Yu, C.-E., Bird, T. D., Tsuang, D. W. (2010): Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.*, 23 (4): 213–227.
110. Dai, M. H., Zheng, H., Zeng, L. D., Zhang, Y. (2017): The genes associated with early-onset Alzheimer's disease. *Oncotarget.*, 9 (19): 15132–15143.
111. Corder, E., Saunders, A., Strittmatter, W., Schmechel, D., Gaskell, P., Small, G., Roses, A., Haines, J., Pericak-Vance, M. (1993): Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261 (5123): 921–923.
112. Mahley, R. W. (1988): Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240 (4852): 622–630.
113. Huang, Y., Mahley, R. W. (2014): Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Dis*, 72 Pt A: 3–12.
114. Chartier-Harlin, M. C., Parfitt, M., Legrain, S., Pérez-Tur, J., Brousseau, T., Evans, A., Berr, C., Vidal, O., Roques, P., Gourlet, V. (1994): Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol Genet*, 3 (4): 569–574.
115. Ward, A., Crean, S., Mercaldi, C. J., Collins, J. M., Boyd, D., Cook, M. N., Arrighi, H. M. (2012): Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/e4) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*, 38 (1): 1–17.
116. Hashimoto, T., Serrano-Pozo, A., Hori, Y., Adams, K. W., Takeda, S., Banerji, A. O., Mitani, A., Joyner, D., Thyssen, D. H., Bacskai, B. J., Frosch, M. P., Spires-Jones, T. L., Finn, M. B., Holtzman, D. M., Hyman, B. T. (2012): Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid β peptide. *J Neurosci*, 32 (43): 15181–15192.
117. Guimas A., C., Sadat Mirfakhar, F., Perdigão, C., Burrinha, T. (2018): Impact of late-onset Alzheimer's genetic risk factors on beta-amyloid endocytic production. *Cell Mol Life Sci.*, 75 (14): 2577–2589.
118. Dorey, E., Chang, N., Liu, Q. Y., Yang, Z., Zhang, W. (2014): Apolipoprotein E, amyloid-beta, and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.*, 30 (2): 317–330.
119. Beffert, U., Cohn, J. S., Petit-Turcotte, C., Tremblay, M., Aumont, N., Ramassamy, C., Davignon, J., Poirier, J. (1999): Apolipoprotein E and beta-amyloid levels in the

- hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease subjects are disease-related and apolipoprotein E genotype dependent. *Brain Res*, 843 (1-2): 87–94.
120. Bu, G., Cam, J., Zerbinatti, C. (2006): LRP in amyloid-beta production and metabolism. *Ann N Y Acad Sci.*, 1086: 35–53.
121. Beffert, U., Aumont, N., Dea, D., Lussier-Cacan, S., Davignon, J., Poirier, J. (1998): Beta-amyloid peptides increase the binding and internalization of apolipoprotein E to hippocampal neurons. *J Neurochem*, 70 (4): 1458–1466.
122. Arendt, T., Schindler, C., Brückner, M. K., Eschrich, K., Bigl, V., Zedlick, D., Marcova, L. (1997): Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein epsilon 4 allele. *J Neurosci*, 17 (2): 516–529.
123. Scherzer, C. R., Offe, K., Gearing, M., Rees, H. D., Fang, G., Heilman, C. J., Schaller, C., Bujo, H., Levey, A. I., Lah, J. J. (2004): Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 61 (8): 1200–1205.
124. Andersen, O. M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., Arnim, C. A. F. von, Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu, X., Bales, K. R., Cappai, R., Masters, C. L., Gliemann, J., Mufson, E. J., Hyman, B. T., Paul, S. M., Nykjaer, A., Willnow, T. E. (2005): Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (38): 13461–13466.
125. Offe, K., Dodson, S. E., Shoemaker, J. T., Fritz, J. J., Gearing, M., Levey, A. I., Lah, J. J. (2006): The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *J Neurosci*, 26 (5): 1596–1603.
126. Anstey, K. J., Ashby-Mitchell, K., Peters, R. (2017): Updating the Evidence on the Association between Serum Cholesterol and Risk of Late-Life Dementia: Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*, 56 (1): 215–228.
127. Ricciarelli, R., Canepa, E., Marengo, B., Marinari, U. M., Poli, G., Pronzato, M. A., Domenicotti, C. (2012): Cholesterol and Alzheimer's disease: a still poorly understood correlation. *IUBMB life*, 64 (12): 931–935.
128. Sommer, I., Griebler, U., Kien, C., Auer, S., Klerings, I., Hammer, R., Holzer, P., Gartlehner, G. (2017): Vitamin D deficiency as a risk factor for dementia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatr*, 17 (1): 16.
129. Park, S. H., Kim, J. H., Choi, K. H., Jang, Y. J., Bae, S. S., Choi, B. T., Shin, H. K. (2013): Hypercholesterolemia accelerates amyloid β -induced cognitive deficits. *Int J Mol Med*, 31 (3): 577–582.

130. Sun, J. H., Yu, J. T., Tan, L. (2015): The role of cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 51 (3): 947–965.
131. Rezen, T., Rozman, D., Pascussi, J. M., Monostory, K. (2011): Interplay between cholesterol and drug metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1814 (1): 146–160.
132. Lim, K. I., Yin, J. (2005): Localization of receptors in lipid rafts can inhibit signal transduction. *Biotechnol Bioeng*, 90 (6): 694–702.
133. Dietschy, J. M., Turley, S. D., Spady, D. K. (1993): Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res*, 34 (10): 1637–1659.
134. Alphonse, P. A., Jones, P. J. (2016): Revisiting Human Cholesterol Synthesis and Absorption: The Reciprocity Paradigm and its Key Regulators. *Lipids*, 51 (5): 519–536.
135. Mahley, R. W., Innerarity, T. L., Rall, S. C., JR., Weisgraber, K. H. (1984): Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*, 25 (12): 1277–1294.
136. Dietschy, J. M., Turley, S. D. (2001): Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol*, 12 (2): 105–112.
137. Dietschy, J. M., Turley, S. D. (2004): Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res*, 45 (8): 1375–1397.
138. Zhang, J., Liu, Q. (2015): Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell*, 6 (4): 254–264.
139. Fünfschilling, U., Saher, G., Le X., Möbius, W., Nave, K. A. (2007): Survival of adult neurons lacking cholesterol synthesis in vivo. *BMC Neurosci*, 8: 1.
140. Björkhem, I. (2007): Rediscovery of cerebrosterol. *Lipids*, 42 (1): 5–14.
141. Zhang, X., Lv, C., An, Y., Liu, Q., Rong, H., Tao, L., Wang, Y., Xiao, R. (2018): Increased Levels of 27-Hydroxycholesterol Induced by Dietary Cholesterol in Brain Contribute to Learning and Memory Impairment in Rats. *Mol Nutr Food Res*, 62 (3).
142. Littlejohns, T. J., Henley, W. E., Lang, I. A., Annweiler, C., Beauchet, O., Chaves, P. H., Fried, L., Kestenbaum, B. R., Kuller, L. H., Langa, K. M., Lopez, O. L., Kos, K., Soni, M., Llewellyn, D. J. (2014): Vitamin D and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Neurology*, 83 (10): 920–928.
143. Shen, L., Ji, H. F. (2015): Vitamin D deficiency is associated with increased risk of Alzheimer's disease and dementia: evidence from meta-analysis. *Nutr J*, 14: 76.
144. Holick, M. F. (2007): Optimal vitamin D status for the prevention and treatment of osteoporosis. *Drugs Aging*, 24 (12): 1017–1029.

145. Webb, A. R., Holick, M. F. (1988): The role of sunlight in the cutaneous production of vitamin D3. *Annu Rev Nutr*, 8: 375–399.
146. Holick, M. F. (2007): Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*, 357 (3): 266–281.
147. Rabenberg, M., Mensink, G. B. M. (2016): Vitamin-D-Status von Erwachsenen in Deutschland, Robert Koch-Institut, RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut), Berlin.
148. Walters, M. R., Nemere, I. (2004): Receptors for steroid hormones: membrane-associated and nuclear forms. *Cell Mol Life Sci*, 61 (18): 2309–2321.
149. Fleet, J. C. (2004): Rapid, membrane-initiated actions of 1,25 dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean? *J Nutr*, 134 (12): 3215–3218.
150. Suda, T., Ueno, Y., Fujii, K., Shinki, T. (2003): Vitamin D and bone. *J Cell Biochem*, 88 (2): 259–266.
151. Silver, J., Levi, R. (2005): Regulation of PTH synthesis and secretion relevant to the management of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* (95): S8-12.
152. Fernandes de Abreu, D. A., Eyles, D., Féron, F. (2009): Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology*, 34 Suppl 1: S265-S277.
153. El-Fakhri, N., McDevitt, H., Shaikh, M. G., Halsey, C., Ahmed, S. F. (2014): Vitamin D and its effects on glucose homeostasis, cardiovascular function and immune function. *Horm Res Paediatr*, 81 (6): 363–378.
154. Feldman, D., Krishnan, A. V., Swami, S., Giovannucci, E., Feldman, B. J. (2014): The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer*, 14 (5): 342–357.
155. Tai, K., Need, A. G., Horowitz, M., Chapman, I. M. (2008): Vitamin D, glucose, insulin, and insulin sensitivity. *Nutrition*, 24 (3): 279–285.
156. Balion, C., Griffith, L. E., Striffler, L., Henderson, M., Patterson, C., Heckman, G., Llewellyn, D. J., Raina, P. (2012): Vitamin D, cognition, and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*, 79 (13): 1397–1405.
157. Annweiler, C., Llewellyn, D. J., Beauchet, O. (2013): Low serum vitamin D concentrations in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis.*, 33 (3): 659–674.
158. Balabanova, S., Richter, H. P., Antoniadis, G., Homoki, J., Kremmer, N., Hanle, J., Teller, W. M. (1984): 25-Hydroxyvitamin D, 24, 25-dihydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in human cerebrospinal fluid. *Klin Wochenschr*, 62 (22): 1086–1090.

159. Eyles, D. W., Smith, S., Kinobe, R., Hewison, M., McGrath, J. J. (2005): Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat*, 29 (1): 21–30.
160. Lin, A. M., Chen, K. B., Chao, P. L. (2005): Antioxidative effect of vitamin D3 on zinc-induced oxidative stress in CNS. *Ann N Y Acad Sci*, 1053: 319–329.
161. Garcion, E., Nataf, S., Berod, A., Darcy, F., Brachet, P. (1997): 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res Mol Brain Res*, 45 (2): 255–267.
162. Brown, J., Bianco, J. I., McGrath, J. J., Eyles, D. W. (2003): 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett*, 343 (2): 139–143.
163. Schindowski, K., Belarbi, K., Buée, L. (2008): Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav*, 7 (Suppl. 1): 43–56.
164. Mizwicki, M. T., Menegaz, D., Zhang, J., Barrientos-Durán, A., Tse, S., Cashman, J. R., Griffin, P. R., Fiala, M. (2012): Genomic and nongenomic signaling induced by 1 α ,25(OH)₂-vitamin D3 promotes the recovery of amyloid- β phagocytosis by Alzheimer's disease macrophages. *J Alzheimers Dis*, 29 (1): 51–62.
165. Warren, A. J. (2002): Eukaryotic transcription factors. *Curr Opin Struct Biol.*, 12 (1): 107–114.
166. Moutinho, M., Landreth, G. E. (2017): Therapeutic potential of nuclear receptor agonists in Alzheimer's disease. *J Lipid Res.*, 58 (10): 1937–1949.
167. Murtaza, G., Khan, A. K., Rashid, R., Muneer, S., Hasan, S. M., Chen, J. (2017): FOXO Transcriptional Factors and Long-Term Living. *Oxid Med Cell Longev.*, 2017: 3494289.
168. Sever, R., Glass, C. K. (2013): Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 5 (3): a016709.
169. Aranda, A., Pascual, A. (2001): Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, 81 (3): 1269–1304.
170. Schulman, I. G. (2010): Nuclear receptors as drug targets for metabolic disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 62 (13): 1307–1315.
171. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., Laudet, V. (2006): Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, 58 (4): 685–704.

172. Helsen, C., Kerkhofs, S., Clinckemalie, L., Spans, L., Laurent, M., Boonen, S., Vanderschueren, D., Claessens, F. (2012): Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Mol Cell Endocrinol*, 348 (2): 411–417.
173. Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R. M. (1995): The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, 83 (6): 835–839.
174. Helsen, C., Claessens, F. (2014): Looking at nuclear receptors from a new angle. *Mol Cell Endocrinol*, 382 (1): 97–106.
175. Yen, P. M. (2015): Classical nuclear hormone receptor activity as a mediator of complex biological responses: a look at health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 29 (4): 517–528.
176. Mader, S., Leroy, P., Chen, J. Y., Chambon, P. (1993): Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *J Biol Chem*, 268 (1): 591–600.
177. Haussler, M. R., Jurutka, P. W., Mizwicki, M., Norman, A. W. (2011): Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 : genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 25 (4): 543–559.
178. Meyer, M. B., Watanuki, M., Kim, S., Shevde, N. K., Pike, J. W. (2006): The human transient receptor potential vanilloid type 6 distal promoter contains multiple vitamin D receptor binding sites that mediate activation by 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in intestinal cells. *Mol Endocrinol*, 20 (6): 1447–1461.
179. Haussler, M. R., Haussler, C. A., Whitfield, G. K., Hsieh, J. C., Thompson, P. D., Barthel, T. K., Bartik, L., Egan, J. B., Wu, Y., Kubicek, J. L., Lowmiller, C. L., Moffet, E. W., Forster, R. E., Jurutka, P. W. (2010): The nuclear vitamin D receptor controls the expression of genes encoding factors which feed the "Fountain of Youth" to mediate healthful aging. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 121 (1-2): 88–97.
180. Kolek, O. I., Hines, E. R., Jones, M. D., LeSueur, L. K., Lipko, M. A., Kiela, P. R., Collins, J. F., Haussler, M. R., Ghishan, F. K. (2005): $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 up-regulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289 (6): G1036-G1042.
181. Kersten, S., Stienstra, R. (2017): The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie*, 136: 75–84.

182. Rosenson, R. S. (2008): Fenofibrate: treatment of hyperlipidemia and beyond. *Expert Rev Cardiovasc Ther.*, 6 (10): 1319–1330.
183. Evans, R. M., Barish, G. D., Wang, Y. X. (2004): PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*, 10 (4): 355–361.
184. Lefterova, M. I., Haakonsson, A. K., Lazar, M. A., Mandrup, S. (2014): PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends Endocrinol Metab*, 25 (6): 293–302.
185. Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C., Sharma, S. (2011): The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*, 2 (4): 236–240.
186. Schupp, M., Lazar, M. A. (2010): Endogenous ligands for nuclear receptors: digging deeper. *J Biol Chem*, 285 (52): 40409–40415.
187. Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M., Kliewer, S. A. (1995): An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*, 270 (22): 12953–12956.
188. Liu, Y., Colby, J. K., Zuo, X., Jaoude, J., Wei, D., Shureiqi, I. (2018): The Role of PPAR- δ in Metabolism, Inflammation, and Cancer: Many Characters of a Critical Transcription Factor. *Int J Mol Sci*, 19 (11).
189. Grimaldi, P. A. (2007): Regulatory functions of PPARbeta in metabolism: implications for the treatment of metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta*, 1771 (8): 983–990.
190. Barish, G. D., Narkar, V. A., Evans, R. M. (2006): PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 116 (3): 590–597.
191. Zhang, H., Gao, Y., Qiao, P., Zhao, F., Yan, Y. (2014): Fenofibrate reduces amyloidogenic processing of APP in APP/PS1 transgenic mice via PPAR- α /PI3-K pathway. *Int J Dev Neurosci*, 38: 223–231.
192. Luo, R., Su, L. Y., Li, G., Yang, J., Liu, Q., Yang, L. X., Zhang, D. F., Zhou, H., Xu, M., Fan, Y., Li, J., Yao, Y. G. (2019): Activation of PPARA-mediated autophagy reduces Alzheimer disease-like pathology and cognitive decline in a murine model. *Autophagy*: 1–18.
193. Sastre, M., Dewachter, I., Rossner, S., Bogdanovic, N., Rosen, E., Borghgraef, P., Evert, B. O., Dumitrescu-Ozimek, L., Thal, D. R., Landreth, G., Walter, J., Klockgether, T., van Leuven, F., Heneka, M. T. (2006): Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress β -secretase gene promoter activity by the activation of PPAR γ . *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103 (2): 443–448.

194. Mandrekar-Colucci, S., Karlo, J. C., Landreth, G. E. (2012): Mechanisms underlying the rapid peroxisome proliferator-activated receptor- γ -mediated amyloid clearance and reversal of cognitive deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.*, 32 (30): 10117–10128.
195. Greer, E. L., Brunet, A. (2005): FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 24 (50): 7410–7425.
196. Link, W., Fernandez-Marcos, P. J. (2017): FOXO transcription factors at the interface of metabolism and cancer. *Int J Cancer*, 141 (12): 2379–2391.
197. Puig, O., Marr, M. T., Ruhf, M. L., Tjian, R. (2003): Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes Dev*, 17 (16): 2006–2020.
198. Tatar, M., Bartke, A., Antebi, A. (2003): The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science*, 299 (5611): 1346–1351.
199. Oh, K. J., Han, H. S., Kim, M. J., Koo, S. H. (2013): CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. *BMB Rep*, 46 (12): 567–574.
200. Lettieri Barbato, D., Aquilano, K., Ciriolo, M. R. (2014): FoxO1 at the nexus between fat catabolism and longevity pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1841 (10): 1555–1560.
201. Papanicolaou, K. N., Izumiya, Y., Walsh, K. (2008): Forkhead transcription factors and cardiovascular biology. *Circ Res*, 102 (1): 16–31.
202. Hoekman, M. F., Jacobs, F. M., Smidt, M. P., Burbach, J. P. (2006): Spatial and temporal expression of FoxO transcription factors in the developing and adult murine brain. *Gene Expr Patterns*, 6 (2): 134–140.
203. Kaestner, K. H., Knochel, W., Martinez, D. E. (2000): Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev*, 14 (2): 142–146.
204. Obsil, T., Obsilova, V. (2008): Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene*, 27 (16): 2263–2275.
205. Urbánek, P., Klotz, L.-O. (2017): Posttranscriptional regulation of FOXO expression: microRNAs and beyond. *Br J Pharmacol.*, 174 (12): 1514–1532.
206. Brown, A. K., Webb, A. E. (2018): Regulation of FOXO Factors in Mammalian Cells. *Curr Top Dev Biol*, 127: 165–192.
207. Lin, K., Dorman, J. B., Rodan, A., Kenyon, C. (1997): daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 278 (5341): 1319–1322.

208. Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G. I., Lee, L., Tissenbaum, H. A., Ruvkun, G. (1997): The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature*, 389 (6654): 994–999.
209. Shaw, L. M. (2011): The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle*, 10 (11): 1750–1756.
210. Rena, G., Guo, S., Cichy, S. C., Unterman, T. G., Cohen, P. (1999): Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem*, 274 (24): 17179–17183.
211. Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A., Greenberg, M. E. (2001): Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol*, 21 (3): 952–965.
212. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden K. C., Blenis, J., Greenberg, M. E. (1999): Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96 (6): 857–868.
213. Zhang, W., Patil, S., Chauhan, B., Guo, S., Powell, D. R., Le, J., Klotsas, A., Matika, R., Xiao, X., Franks, R., Heidenreich, K. A., Sajan, M. P., Farese, R. V., Stolz, D. B., Tso, P., Koo, S. H., Montminy, M., Unterman, T. G. (2006): FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J Biol Chem*, 281 (15): 10105–10117.
214. Klotz, L. O., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H., Monsalve, M. (2015): Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol*, 6: 51–72.
215. Boccitto, M., Kalb R. G. (2011): Regulation of Foxo-Dependent Transcription by Post-Translational Modifications. *Curr Drug Targets*, 12 (9): 1303–1310.
216. Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E., Mostoslavsky, R., Cohen, H. Y., Hu, L. S., Cheng, H. L., Jedrychowski, M. P., Gygi, S. P., Sinclair, D. A., Alt, F. W., Greenberg, M. E. (2004): Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 303 (5666): 2011–2015.
217. Klaips, C. L., Jayaraj, G. G., Hartl, F. U. (2018): Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J Cell Biol.*, 217 (1): 51–63.
218. Ciechanover, A., Kwon, Y. T. (2015): Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp Mol Med.*, 47: e147.

219. Amm, I., Sommer, T., Wolf, D. H. (2014): Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta*, 1843 (1): 182–196.
220. Glickman, M. H., Ciechanover, A. (2002): The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 82 (2): 373–428.
221. Budenholzer, L., Cheng, C. L., Li, Y., Hochstrasser, M. (2017): Proteasome Structure and Assembly. *J Mol Biol*, 429 (22): 3500–3524.
222. Sano, R., Reed, J. C. (2013): ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1833 (12): 3460–3470.
223. Ciechanover, A. (1998): The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J*, 17 (24): 7151–7160.
224. Üstün, S., Börnke, F. (2014): Interactions of Xanthomonas type-III effector proteins with the plant ubiquitin and ubiquitin-like pathways. *Front Plant Sci.*, 5: 736.
225. Pickart, C. M., Eddins, M. J. (2004): Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1695 (1-3): 55–72.
226. Jung, T., Catalgol, B., Grune, T. (2009): The proteasomal system. *Mol Aspects Med*, 30 (4): 191–296.
227. McKinnon, C., Tabrizi, S. J. (2014): The ubiquitin-proteasome system in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*, 21 (17): 2302–2321.
228. Ryter, S. W., Cloonan, S. M., Choi, A. M. (2013): Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Mol Cells*, 36 (1): 7–16.
229. Levine, B., Klionsky, D. J. (2004): Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6 (4): 463–477.
230. Rabinowitz, J. D., White, E. (2010): Autophagy and metabolism. *Science*, 330 (6009): 1344–1348.
231. Kroemer, G., Mariño, G., Levine, B. (2010): Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40 (2): 280–293.
232. He, C., Klionsky, D. J. (2009): Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 43: 67–93.
233. Martinez-Vicente, M., Cuervo, A. M. (2007): Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol*, 6 (4): 352–361.
234. Tasset, I., Cuervo, A. M. (2016): Role of chaperone-mediated autophagy in metabolism. *FEBS J*, 283 (13): 2403–2413.

235. Li, W. W., Li, J., Bao, J. K. (2012): Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*, 69 (7): 1125–1136.
236. Nixon, R. A., Yang, D. S. (2011): Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect. *Neurobiol Dis.*, 43 (1): 38–45.
237. Brenner, S. (1974): The genetics of *Caenorhabditis elegans.*, 77 (1): 71–94.
238. Altun, Z. F., Hall, D. H. (2009): Introduction. In: *WormAtlas.*, doi:10.3908/wormatlas.1.1, <http://www.wormatlas.org> (08.06.2018).
239. Clark, W. C. (1994): Origins of the parasitic habit in the nematoda. *Int J Parasitol*, 24 (8): 1117–1129.
240. Félix, M. A., Braendle, C. (2010): The natural history of *Caenorhabditis elegans.* *Curr Biol*, 20 (22): R965-R969.
241. Félix, M. A., Duveau, F. (2012): Population dynamics and habitat sharing of natural populations of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae.* *BMC Biol*, 10:59.
242. Corsi, A. K. (2006): A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans.* *Anal Biochem.*, 359 (1): 1–17.
243. Azevedo, R. B., Leroi, A. M. (2001): A power law for cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (10): 5699–5704.
244. Stiernagle, T. (2006): Maintenance of *C. elegans* The *C. elegans* Research Community, Wormbook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>.
245. C. elegans Sequencing Consortium. (1998): Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 282 (5396): 2012–2018.
246. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans.* *Nature*, 391 (6669): 806–811.
247. Lints, R., Hall, D. H. (2009): The cuticle. In: *WormAtlas.*, doi:10.3908/wormatlas.1.12, <http://www.wormatlas.org> (12.06.2018).
248. Altun, Z. F., Hall, D. H. (2011): Nervous system, general description. In: *WormAtlas.*, doi:10.3908/wormatlas.1.18, <http://www.wormatlas.org> (26.06.2018).
249. Altun, Z. F., Hall, D. H. (2009): Alimentary system, Pharynx. In: *WormAtlas.*, doi:10.3908/wormatlas.1.3, <http://www.wormatlas.org> (28.06.2018).
250. Altun, Z. F., Hall, D. H. (2009): Alimentary system, intestine. In: *WormAtlas.*, doi:10.3908/wormatlas.1.4, <http://www.wormatlas.org> (28.06.2018).
251. Lints, R., Hall, D. H. (2009): Reproductive system, germ line. In: *WormAtlas.*, doi:10.3908/wormatlas.1.23, <http://www.wormatlas.org> (29.06.2018).

252. Griffin, E. F., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A. (2017): Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer's Disease Using *Caenorhabditis elegans*. *ACS Chem Neurosci.*, 8 (12): 2596–2606.
253. Daigle, I., Li, C. (1993): *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90 (24): 12045–12049.
254. Hornsten, A., Lieberthal, J., Fadia, S., Malins, R., Ha, L., Xu, X., Daigle, I., Markowitz, M., O'Connor, G., Plasterk, R., Li, C. (2007): APL-1, a *Caenorhabditis elegans* protein related to the human beta-amyloid precursor protein, is essential for viability. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104 (6): 1971–1976.
255. Jarriault, S., Greenwald, I. (2005): Evidence for functional redundancy between *C. elegans* ADAM proteins SUP-17/Kuzbanian and ADM-4/TACE. *Dev Biol.*, 287 (1): 1–10.
256. Ewald, C. Y., Li, C. (2010): Understanding the molecular basis of Alzheimer's disease using a *Caenorhabditis elegans* model system. *Brain Struct Funct.*, 214 (2-3): 263–283.
257. Link, C. D. (2006): *C. elegans* models of age-associated neurodegenerative diseases: lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.*, 41 (10): 1007–1013.
258. Link, C. D. (1995): Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92 (20): 9368–9372.
259. McColl, G., Roberts, B. R., Gunn, A. P., Perez, K. A., Tew, D. J., Masters, C. L., Barnham, K. J., Cherny, R. A., Bush, A. I. (2009): The *Caenorhabditis elegans* A beta 1-42 model of Alzheimer disease predominantly expresses A beta 3-42. *J Biol Chem.*, 284 (34): 22697–22702.
260. Rebolledo, D. L., Aldunate, R., Kohn, R., Neira, I., Minniti, A. N., Inestrosa, N. C. (2011): Copper reduces A β oligomeric species and ameliorates neuromuscular synaptic defects in a *C. elegans* model of inclusion body myositis. *J Neurosci.*, 31 (28): 10149–10158.
261. Link, C. D., Taft, A., Kapulkin, V., Duke, K., Kim, S., Fei, Q., Wood, D. E., Sahagan, B. G. (2003): Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. *Neurobiol Aging*, 24 (3): 397–413.
262. Barbieri, M., Bonafè, M., Franceschi, C., Paolisso, G. (2003): Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 285 (5): E1064-71.

263. Tissenbaum, H. A., Ruvkun, G. (1998): An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 148 (2): 703–717.
264. Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y., Ruvkun, G. (1997): *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 277 (5328): 942–946.
265. Baumeister, R., Schaffitzel, E., Hertweck, M. (2006): Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity. *J Endocrinol*, 190 (2): 191–202.
266. Morris, J. Z., Tissenbaum, H. A., Ruvkun, G. (1996): A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 382 (6591): 536–539.
267. Paradis, S., Ruvkun, G. (1998): *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev*, 12 (16): 2488–2498.
268. Henderson, S. T., Johnson, T. E. (2001): *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol.*, 11 (24): 1975–1980.
269. Finch, C. E., Ruvkun, G. (2001): The Genetics of aging. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2: 435–462.
270. Gerisch, B., Weitzel, C., Kober-Eisermann, C., Rottiers, V., Antebi, A. (2001): A hormonal signaling pathway influencing *C. elegans* metabolism, reproductive development, and life span. *Dev Cell*, 1 (6): 841–851.
271. Rottiers, V., Antebi, A. (2006): Control of *Caenorhabditis elegans* life history by nuclear receptor signal transduction. *Exp Gerontol*, 41 (10): 904–909.
272. Kurzchalia, T. V., Ward, S. (2003): Why do worms need cholesterol? *Nat Cell Biol*, 5 (8): 684–688.
273. Motola, D. L., Cummins, C. L., Rottiers, V., Sharma, K. K., Li, T., Li, Y., Suino-Powell, K., Xu, H. E., Auchus, R. J., Antebi, A., Mangelsdorf, D. J. (2006): Identification of ligands for DAF-12 that govern dauer formation and reproduction in *C. elegans*. *Cell*, 124 (6): 1209–1223.
274. Tata, J. R. (1976): The expression of the vitellogenin gene. *Cell*, 9 (1): 1–14.
275. Kimble, J., Sharrock, W. J. (1983): Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 96: 189–196.
276. Spieth, J., Blumenthal, T. (1985): The *Caenorhabditis elegans* vitellogenin gene family includes a gene encoding a distantly related protein. *Mol Cell Biol*, 5 (10): 2495–2501.

277. Baker, M. E. (1988): Is vitellogenin an ancestor of apolipoprotein B-100 of human low-density lipoprotein and human lipoprotein-lipase? *Biochem J*, 255: 1057–1060.
278. Grant, B., Hirsh, D. (1999): Receptor-mediated Endocytosis in *Caenorhabditis elegans* Oocyte. *Mol Biol Cell*, 10 (12): 4311–4326.
279. Rottiers, V., Motola, D. L., Gerisch, B., Cummins, C. L., Nishiwaki, K., Mangelsdorf, D. J., Antebi, A. (2006): Hormonal control of *C. elegans* dauer formation and life span by a Rieske-like oxygenase. *Dev Cell*, 10 (4): 473–482.
280. Antebi, A., Yeh, W. H., Tait, D., Hedgecock, E. M., Riddle, D. L. (2000): *daf-12* encodes a nuclear receptor that regulates the dauer diapause and developmental age in *C. elegans*. *Genes Dev*, 14 (12): 1512–1527.
281. Held, J. M., White, M. P., Fisher, A. L., Gibson, B. W., Lithgow, G. J., Gill, M. S. (2006): DAF-12-dependent rescue of dauer formation in *Caenorhabditis elegans* by (25S)-cholestenoic acid. *Aging cell*, 5 (4): 283–291.
282. Beckstead, R. B., Thummel, C. S. (2006): Indicted: worms caught using steroids. *Cell*, 124 (6): 1137–1140.
283. Magner, D. B., Wollam, J., Shen, Y., Hoppe, C., Li, D., Latza, C., Rottiers, V., Hutter, H., Antebi, A. (2013): The NHR-8 nuclear receptor regulates cholesterol and bile acid homeostasis in *C. elegans*. *Cell Metab*, 18 (2): 212–224.
284. Antebi, A. (2006): Nuclear hormone receptors in *C. elegans*. *Wormbook*, 3: 1–13.
285. Robinson-Rechavi, M., Maina, C. V., Gissendanner, C. R., Laudet, V., Sluder, A. (2005): Explosive lineage-specific expansion of the orphan nuclear receptor HNF4 in nematodes. *J Mol Evol*, 60 (5): 577–586.
286. van Gilst, M. R., Hadjivassiliou, H., Jolly, A., Yamamoto, K. R. (2005): Nuclear hormone receptor NHR-49 controls fat consumption and fatty acid composition in *C. elegans*. *PLoS Biol*, 3 (2): e53.
287. Ratnappan, R., Amrit, F. R., Chen, S. W., Gill, H., Holden, K., Ward, J., Yamamoto, K. R., Olsen, C. P., Ghazi, A. (2014): Germline signals deploy NHR-49 to modulate fatty-acid β -oxidation and desaturation in somatic tissues of *C. elegans*. *PLoS Genet*, 10 (12): e1004829.
288. Goh, G. Y., Winter, J. J., Bhanshali, F., Doering, K. R., Lai, R., Lee, K., Veal, E. A., Taubert, S. (2018): NHR-49/HNF4 integrates regulation of fatty acid metabolism with a protective transcriptional response to oxidative stress and fasting. *Aging cell*, 17 (3): e12743.

289. Pathare, P. P., Lin, A., Bornfeldt, K. E., Taubert, S., van Gilst, M. R. (2012): Coordinate regulation of lipid metabolism by novel nuclear receptor partnerships. *PLoS Genet*, 8 (4): e1002645.
290. Papaevgeniou, N., Chondrogianni, N. (2014): The ubiquitin proteasome system in *Caenorhabditis elegans* and its regulation. *Redox Biol*, 2: 333–347.
291. Graham, R. W., Jones, D., Candido, E. P. (1989): UbiA, the major polyubiquitin locus in *Caenorhabditis elegans*, has unusual structural features and is constitutively expressed. *Mol Cell Biol*, 9 (1): 268–277.
292. Schlesinger, M. J., Bond, U. (1987): Ubiquitin genes. *Oxf Surv Eukaryot Genes*, 4: 77–91.
293. Johnston, S. C., Riddle, S. M., Cohen, R. E., Hill, C. P. (1999): Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases. *EMBO J*, 18 (14): 3877–3887.
294. Jones, D., Candido, E. P. (1993): Novel ubiquitin-like ribosomal protein fusion genes from the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *J Biol Chem*, 268 (26): 19545–19551.
295. Ozkaynak, E., Finley, D., Solomon, M. J., Varshavsky, A. (1987): The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J*, 6 (5): 1429–1439.
296. Gönczy, P., Echeverri, C., Oegema, K., Coulson, A., Jones, S. J., Copley, R. R., Duperon, J., Oegema, J., Brehm, M., Cassin, E., Hannak, E., Kirkham, M., Pichler, S., Flohrs, K., Goessen, A., Leidel, S., Alleaume, A. M., Martin, C., Ozlü, N., Bork, P., Hyman, A. A. (2000): Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature*, 408 (6810): 331–336.
297. Piano, F., Schetter, A. J., Mangone, M., Stein, L., Kemphues, K. J. (2000): RNAi analysis of genes expressed in the ovary of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, 10 (24): 1619–1622.
298. Kipreos, E. T. (2005): Ubiquitin-mediated pathways in *C. elegans*. *Wormbook*: 1–24.
299. Davy, A., Bello, P., Thierry-Mieg, N., Vaglio, P., Hitti, J., Doucette-Stamm, L., Thierry-Mieg, D., Reboul, J., Boulton, S., Walhout, A. J., Coux, O., Vidal, M. (2001): A protein-protein interaction map of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome. *EMBO Rep*, 2 (9): 821–828.
300. Takahashi, M., Iwasaki, H., Inoue, H., Takahashi, K. (2002): Reverse genetic analysis of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome subunits by RNA interference. *Biol Chem*, 383 (7-8): 1263–1266.

301. Chondrogianni, N., Georgila, K., Kourtis, N., Tavernarakis, N., Gonos, E. S. (2015): 20S proteasome activation promotes life span extension and resistance to proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J*, 29 (2): 611–622.
302. Meléndez, A., Levine, B. (2009): Autophagy in *C. elegans*. *Wormbook*: 1–26.
303. Lapierre, L. R., Gelino, S., Meléndez, A., Hansen, M. (2011): Autophagy and lipid metabolism coordinately modulate life span in germline-less *C. elegans*. *Curr Biol*, 21 (18): 1507–1514.
304. Sigmund, T., Barna, J., Tóth, M. L., Takács-Vellai, K., Pásti, G., Kovács, A. L., Vellai, T. (2008): Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Enzymol*, 451: 521–540.
305. Takacs-Vellai, K., Vellai, T., Puoti, A., Passannante, M., Wicky, C., Streit, A., Kovacs, A. L., Müller, F. (2005): Inactivation of the autophagy gene bec-1 triggers apoptotic cell death in *C. elegans*. *Curr Biol*, 15 (16): 1513–1517.
306. Meléndez, A., Tallóczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E. L., Hall, D. H., Levine, B. (2003): Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*, 301 (5638): 1387–1391.
307. Eisermann, D. J., Wenzel, U., Fitzenberger, E. (2017): Inhibition of chaperone-mediated autophagy prevents glucotoxicity in the *Caenorhabditis elegans mev-1* mutant by activation of the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun.*, 484 (1): 171–175.
308. Schuske, K., Palfreyman, M. T., Watanabe, S., Jorgensen, E. M. (2007): UNC-46 is required for trafficking of the vesicular GABA transporter. *Nat Neurosci*, 10 (7): 846–853.
309. Fire, A. (1999): RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.*, 15 (9): 358–363.
310. Hannon, G. J. (2002): RNA interference. *Nature*, 418 (6894): 244–251.
311. Grishok, A. (2005): RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.*, 579 (26): 5932–5939.
312. Cox-Paulson, E. A., Grana, T. M., Harris, M. A., Batzli, J. M. (2012): Studying human disease genes in *Caenorhabditis elegans*: a molecular genetics laboratory project. *CBE Life Sci Educ.*, 11 (2): 165–179.
313. Timmons, L., Court, D. L., Fire, A. (2001): Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263 (1-2): 103–112.
314. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.*, 263 (5148): 802–805.
315. Libina, N., Berman, J. R., Kenyon, C. (2003): Tissue-Specific Activities of *C. elegans* DAF-16 in the Regulation of Lifespan. *Cell*, 115 (4): 489–502.

316. Pierzyńska-Mach, A., Janowski, P. A., Dobrucki, J. W. (2014): Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles. *Cytometry A.*, 85 (8): 729–737.
317. Matyash, V., Geier, C., Henske, A., Mukherjee, S., Hirsh, D., Thiele, C., Grant, B., Maxfield, F. R., Kurzchalia, T. V. (2001): Distribution and transport of cholesterol in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell.*, 12 (6): 1725–1736.
318. Wüstner, D., Landt Larsen, A., Faergeman, N. J., Brewer, J. R., Sage, D. (2010): Selective visualization of fluorescent sterols in *Caenorhabditis elegans* by bleach-rate-based image segmentation. *Traffic.*, 11 (4): 440–454.
319. Nesterov, E. E., Skoch, J., Hyman, B. T., Klunk, W. E., Bacskai, B. J., Swager, T. M. (2005): In vivo optical imaging of amyloid aggregates in brain: design of fluorescent markers. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 44 (34): 5452–5456.
320. Peccati, F., Hernando, J., Blancafort, L., Solans-Monfort, X., Sodupe, M. (2015): Disaggregation-induced fluorescence enhancement of NIAD-4 for the optical imaging of amyloid- β fibrils. *Phys Chem Chem Phys.*, 17 (30): 19718–19725.
321. Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72: 248–254.
322. Crawford, L. J., Walker, B., Ovaa, H., Chauhan, D., Anderson, K. C., Morris, T. C., Irvine, A. E. (2006): Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLCOCHO, PS-341, and MG-132. *Cancer Res.*, 66 (12): 6379–6386.
323. Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29 (9): 2002–2007.
324. Regitz, C., Wenzel, U. (2014): Amyloid-beta (A β 1-42)-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is reduced by restricted cholesterol supply. *Neurosci Lett*, 576: 93–96.
325. Fischer, M., Regitz, C., Kull, R., Boll, M., Wenzel, U. (2013): Vitellogenins increase stress resistance of *Caenorhabditis elegans* after *Photorhabdus luminescens* infection depending on the steroid-signaling pathway. *Microbes Infect.*, 15 (8-9): 569–578.
326. Plant, L. D., Boyle, J. P., Smith, I. F., Peers, C., Pearson, H. A. (2003): The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci*, 23 (13): 5531–5535.
327. Takahashi, R. H., Milner, T. A., Li, F., Nam, E. E., Edgar, M. A., Yamaguchi, H., Beal, M. F., Xu, H., Greengard, P., Gouras, G. K. (2002): Intraneuronal Alzheimer A β 42

- Accumulates in Multivesicular Bodies and Is Associated with Synaptic Pathology. *Am J Pathol.*, 161 (5): 1869–1879.
328. Manczak, M., Anekonda, T. S., Henson, E., Park, B. S., Quinn, J., Reddy, P. H. (2006): Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet.*, 15 (9): 1437–1449.
329. Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Bisgaier, C. L., Essenburg, A. D., Lampert, H. C., Drumm, D., Roher, A. E. (1998): Elevated Low-Density Lipoprotein in Alzheimer's Disease Correlates with Brain A β 1-42 Levels, 252 (3): 711–715.
330. Ramírez, C., Sierra, S., Tercero, I., Vázquez, J. A., Pineda, A., Manrique, T., Burgos, J. S. (2011): ApoB100/LDLR $^{-/-}$ hypercholesterolaemic mice as a model for mild cognitive impairment and neuronal damage. *PloS One.*, 6 (7): e22712.
331. Löffler, T., Flunkert, S., Havas, D., Sántha, M., Hutter-Paier, B., Steyrer, E., Windisch, M. (2013): Impact of ApoB-100 expression on cognition and brain pathology in wild-type and hAPPsl mice. *Neurobiol Aging.*, 34 (10): 2379–2388.
332. Löffler, T., Schweinzer, C., Flunkert, S., Sántha, M., Windisch, M., Steyrer, E., Hutter-Paier, B. (2016): Brain cortical cholesterol metabolism is highly affected by human APP overexpression in mice. *Mol Cell Neurosci.*, 74: 34–41.
333. Bereczki, E., Bernát, G., Csont, T., Ferdinandy, P., Scheich, H., Sántha, M. (2008): Overexpression of human apolipoprotein B-100 induces severe neurodegeneration in transgenic mice. *J Proteom Res.*, 7 (6): 2246–2252.
334. Ghribi, O., Larsen, B., Schrag, M., Herman, M. M. (2006): High cholesterol content in neurons increases BACE, beta-amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. *Exp Neurol.*, 200 (2): 460–467.
335. Simons, M., Keller, P., Strooper, B. de, Beyreuther, K., Dotti, C. G., Simons, K. (1998): Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95 (11): 6460–6464.
336. Schneider, A., Schulz-Schaeffer, W., Hartmann, T., Schulz, J. B., Simons, M. (2006): Cholesterol depletion reduces aggregation of amyloid-beta peptide in hippocampal neurons. *Neurobiol Dis.*, 23 (3): 573–577.
337. Rushworth, J. V., Hooper, N. M. (2010): Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid- β Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes. *Int J Alzheimers Dis.*, 2011: 603052.

338. Viennois, E., Pommier, A. J., Mouzat, K., Oumeddour, A., El Hajjaji, F. Z., Dufour, J., Caira, F., Volle, D. H., Baron, S., Lobaccaro, J. M. (2011): Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin Ther Targets*, 15 (2): 219–232.
339. Fitz, N. F., Cronican, A., Pham, T., Fogg, A., Fauq, A. H., Chapman, R., Lefterov, I., Koldamova, R. (2010): Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice. *J Neurosci.*, 30 (20): 6862–6872.
340. Schlögl, M., Holick, M. F. (2014): Vitamin D and neurocognitive function. *Clin Interv Aging.*, 9: 559–568.
341. Durk, M. R., Han, K., Chow, E. C., Ahrens, R., Henderson, J. T., Fraser, P. E., Pang, K. S. (2014): 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 reduces cerebral amyloid- β accumulation and improves cognition in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.*, 34 (21): 7091–7101.
342. Yu, J., Gattoni-Celli, M., Zhu, H., Bhat, N. R., Sambamurti, K., Gattoni-Celli, S., Kindy, M. S. (2011): Vitamin D3-enriched diet correlates with a decrease of amyloid plaques in the brain of A β PP transgenic mice. *J Alzheimers Dis.*, 25 (2): 295–307.
343. Hsin, H., Kenyon, C. (1999): Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature*, 399 (6734): 362–366.
344. Dowell, P., Otto, T. C., Adi, S., Lane, M. D. (2003): Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Foxo1 signaling pathways. *J Biol Chem*, 278 (46): 45485–45491.
345. Matyash, V., Entchev, E. V., Mende, F., Wilsch-Bräuninger, M., Thiele, C., Schmidt, A. W., Knölker, H. J., Ward, S., Kurzchalia, T. V. (2004): Sterol-derived hormone(s) controls entry into diapause in *Caenorhabditis elegans* by consecutive activation of DAF-12 and DAF-16. *PLoS Biol.*, 2 (10): e280.
346. Gerisch, B., Rottiers, V., Li, D., Motola, D. L., Cummins, C. L., Lehrach, H., Mangelndorf, D. J., Antebi, A. (2007): A bile acid-like steroid modulates *Caenorhabditis elegans* lifespan through nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104 (12): 5014–5019.
347. Dumas, K. J., Guo, C., Shih, H. J., Hu, P. J. (2013): Influence of steroid hormone signaling on life span control by *Caenorhabditis elegans* insulin-like signaling. *G3 (Bethesda)*, 3 (5): 841–850.

348. Berman, J. R., Kenyon, C. (2006): Germ-cell loss extends *C. elegans* life span through regulation of DAF-16 by kri-1 and lipophilic-hormone signaling. *Cell*, 124 (5): 1055–1068.
349. Zhang, Y., Xu, J., Puscau, C., Kim, Y., Wang, X., Alam, H., Hu, P. J. (2008): *C. elegans* EAK-3 inhibits dauer arrest via nonautonomous regulation of nuclear DAF-16/FoxO activity. *Dev Biol.*, 315 (2): 290–302.
350. Ihara, A., Uno, M., Miyatake, K., Honjoh, S., Nishida, E. (2017): Cholesterol regulates DAF-16 nuclear localization and fasting-induced longevity in *C. elegans*. *Exp Gerontol.*, 87 (Pt A): 40–47.
351. Mark, K. A., Dumas, K. J., Bhaumik, D., Schilling, B., Davis, S., Oron, T. R., Sorensen, D. J., Lucanic, M., Brem, R. B., Melov, S., Ramanathan, A., Gibson, B. W., Lithgow, G. J. (2016): Vitamin D Promotes Protein Homeostasis and Longevity via the Stress Response Pathway Genes *skn-1*, *ire-1*, and *xbp-1*. *Cell Rep.*, 17 (5): 1227–1237.
352. Messing, J., Heuberger, R., Schisa, J. (2013): Effect of Vitamin D₃ on Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Aging Sci.*, 6 (3): 220–224.
353. Regitz, C., Fitzenberger, E., Mahn, F. L., Dußling, L. M., Wenzel, U. (2016): Resveratrol reduces amyloid-beta (A β _{1–42})-induced paralysis through targeting proteostasis in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. *Eur J Nutr.*, 55 (2): 741–747.
354. Regitz, C., Dußling, L. M., Wenzel, U. (2014): Amyloid-beta (A β _{1–42})-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is inhibited by the polyphenol quercetin through activation of protein degradation pathways. *Mol Nutr Food Res.*, 58 (10): 1931–1940.
355. Jia, K., Thomas, C., Akbar, M., Sun, Q., Adams-Huet, B., Gilpin, C., Levine, B. (2009): Autophagy genes protect against *Salmonella typhimurium* infection and mediate insulin signaling-regulated pathogen resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106 (34): 14564–14569.
356. Tóth, M. L., Sigmond, T., Borsos, E., Barna, J., Erdélyi, P., Takács-Vellai, K., Orosz, L., Kovács, A. L., Csikós, G., Sass, M., Vellai, T. (2008): Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy*, 4 (3): 330–338.
357. Cohen, E., Bieschke, J., Perciavalle, R. M., Kelly, J. W., Dillin, A. (2006): Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science.*, 313 (5793): 1604–1610.
358. Heneka, M. T., Reyes-Irisarri, E., Hüll, M., Kummer, M. P. (2011): Impact and Therapeutic Potential of PPARs in Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol.*, 9 (4): 643–650.

359. Corbett, G. T., Gonzalez, F. J., Pahan, K. (2015): Activation of peroxisome proliferator-activated receptor α stimulates ADAM10-mediated proteolysis of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 112 (27): 8445–8450.
360. Roy, A., Jana, M., Kundu, M., Corbett, G. T., Rangaswamy, S. B., Mishra, R. K., Luan, C. H., Gonzalez, F. J., Pahan, K. (2015): HMG-CoA Reductase Inhibitors Bind to PPAR α to Upregulate Neurotrophin Expression in the Brain and Improve Memory in Mice. *Cell Metab.*, 22 (2): 253–265.
361. Lee, K., Goh, G. Y., Wong, M. A., Klassen, T. L., Taubert, S. (2016): Gain-of-function alleles in *Caenorhabditis elegans* nuclear hormone receptor *nhr-49* are functionally distinct. *PloS One.*, 11 (9): e0162708.
362. Goudeau, J., Bellemin, S., Toselli-Mollereau, E., Shamalnasab, M., Chen, Y., Aguilaniu, H. (2011): Fatty acid desaturation links germ cell loss to longevity through NHR-80/HNF4 in *C. elegans*. *PLoS Biol.*, 9 (3): e1000599.
363. Brock, T. J., Browse, J., Watts, J. L. (2006): Genetic regulation of unsaturated fatty acid composition in *C. elegans*. *PLoS Genet.*, 2 (7): e108.
364. Horikawa, M., Sakamoto, K. (2009): Fatty-acid metabolism is involved in stress-resistance mechanisms of *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 390 (4): 1402–1407.
365. Ratnappan, R., Ward, J. D., Yamamoto, K. R., Ghazi, A. (2016): Nuclear hormone receptors as mediators of metabolic adaptability following reproductive perturbations. *Worm*, 5 (1): e1151609.
366. Takiff, H. E., Chen, S. M., Court, D. L. (1989): Genetic analysis of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 171 (5): 2581–2590.
367. Fraser, A. G., Kamath, R. S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., Ahringer, J. (2000): Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, 408 (6810): 325–330.
368. Rual, J.-F., Ceron, J., Koreth, J., Hao, T., Nicot, A.-S., Hirozane-Kishikawa, T., Vandenhaute, J., Orkin, S. H., Hill, D. E., van den Heuvel, S., Vidal, M. (2004): Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome Res.*, 14 (10B): 2162–2168.

9 ANHANG: MATERIAL

9.1 Verbrauchsmaterialien

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet, welche von Bemis Company Inc. (Oshkosh, USA), Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, D), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D), Gilson International B.V. (Bad Camberg, D), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D), Hakle-Kimberly Deutschland GmbH (Koblenz, D), Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, D), Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrecht, D), neoLab Migge GmbH (Heidelberg, D), Schott AG (Mainz, D), UNIGLOVES Arzt- und Klinikbedarf Handelsgesellschaft mbH (Troisdorf-Spich, D), VWR International GmbH (Darmstadt, D), Zellstoffvertriebs GmbH & Co. KG (Troisdorf, D) bezogen wurden.

Tabelle 9.1: Verbrauchsmaterialien mit Angabe des Herstellers

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Bechergläser	Schott
Deckel für 96 Well Mikrotiterplatten	Brand
Deckgläser (24 x 50 mm)	Carl Roth
Edelstahlskalpell	Carl Roth
Erlenmeyerkolben	Schott
Impföse	Carl Roth
Keramik-Kügelchen (1,4 mm)	VWR
Kimtech® Wettask Wischtücher	Hakle-Kimberly
Laborflaschen mit Schraubverschluss (50, 100, 250, 500 und 1000 ml)	Schott AG
Messkolben	Brand
Messzylinder	Hirschmann Laborgeräte
Micro Packaging Vials™ (2 ml) and Closures	VWR
Mikroplatte, schwarz, half-area, µClear® (96 Well)	Greiner Bio-One
Mikrotiterplatten (96 Well)	Greiner Bio-One
Multiwellplatten (24 well)	Greiner Bio-One
Nitrilhandschuhe	Unigloves
Objektträger (76 x 26 mm), mit Mattrand	Carl Roth
Parafilm® M	Bemis

Pasteurpipetten (mit & ohne Wattestopfen, 150 mm)	Carl Roth
PCR Tube with attached Feat Caps (0,2 ml)	VWR
Petrischalen (35x10 mm, 92x16 mm)	Sarstedt
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen <i>low retention</i> (10, 200, 1000 µl)	Sarstedt
Platindraht	neoLab
Reagiergefäße (1,5, 2 ml)	Sarstedt
Reagiergefäße Protein LB (1,5 ml)	Sarstedt
Rotilabo® Verschlussfilm für Mikrotiterplatten	Carl Roth
Rotilabo® Aluminiumfolie	Carl Roth
Rotilabo® Cryoboxen aus Karton	Carl Roth
Rotilabo® Einmalküvetten, Halbmikro (1,5 ml) und Mikro (70µl)	Carl Roth
Rotor Gene Tubes für Rotor Gene-Q Real-time PCR Cycler (0,1 ml)	Qiagen
Seriendosieraufsatz Distrip (125, 1250, 12500 µl)	Gilson
Serologische Pipetten (2, 5, 10 und 25 ml)	Sarstedt
Spatel, L-Form	VWR
Vernichtungsbeutel (Autoklav)	Sarstedt
Zahnstocher	Carl Roth
Zellkulturröhrchen (14 ml)	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Sarstedt
Zetform® Einwegtücher	ZVG

9.2 Geräte

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 9.2: Geräte unter Angabe des Herstellers

Gerät	Hersteller
Analysen-Präzisionswaage	Kern & Sohn (Balingen, D)
Autoklav Systec DB23	Systec (Linden, D)
BioPhotometer plus	Eppendorf (Hamburg, D)

Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene® Labware (Langenselbold, D)
Fluoreszenzmikroskop AMG EVOS fl Color	AMG (Bothell, USA)
Fluoroskan Ascent FL	Labsystems (Bornheim, D)
Gasprofi 1 micro	WLD-TEC (Göttingen, D)
Homogenisator, Precellys® 24-Dual	VWR (Darmstadt, D)
Inkubator	WTB Binder GmbH (Tuttlingen, D)
Kaltlichtquelle KL200	Schott AG (Mainz, D)
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr-Hausgeräte (Ochsenhausen, D)
Kühlzentrifuge Universal 320R	Hettich (Bäch, CH)
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank HS 12/2	Heraeus (Hanau, D)
Mikroliter Zentrifuge Mikro 120	Hettich (Bäch, CH)
Mikrowelle	Cinex (Ascheberg, D)
Moticam 2500 USB 2.0	Bayersdörfer (Saarbrücken-Eschringen, D)
Perfect Blue™ Mini S Gelsystem	VWR (Darmstadt, D)
Petrischalenabfüller Mediajet	Integra Biosciences (Biebertal, D)
pH-Meter pH 211	HANNA Instruments (Vöhringen, D)
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, D)
Rotilabo® Kurzzeitmesser	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Rotor Gene-Q Real-time PCR Cycler	Qiagen (Hilden, D)
Schüttler Promax 2020	Heidolph Instruments (Schwabach, D)
Schüttler Unimax 1010 mit Inkubator 1000	Heidolph Instruments (Schwabach, D)
Schüttler Unimax 2010	Heidolph Instruments (Schwabach, D)
Seriendosierer DISTRIMAN®	Gilson (Bad Camberg, D)
Stereomikroskop	BMS (Capelle a/d Ijssel, NL)
Sterilisator UT20	Fisher Scientific (Schwerte, D)
Thermocycler Veriti® 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Thermostatschrank Lovibond	Tintometer (Dortmund, D)
Tischzentrifuge Universal 320	Hettich (Bäch, CH)
Trockenschrank	Heraeus (Hanau, D)
Überkopfschüttler Intelli-Mixer	neoLab (Heidelberg, D)

Ultraschallbad Sonorex Super	Bandelin electronic (Berlin, D)
Ultratiefkühlschrank HFU 400TV	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, D)
Vakuumpumpe Laboport	neoLab (Heidelberg, D)
Vakuumpumpe Vacusafe	Integra Biosciences (Biebertal, D)
Vakuumpumpe Vacusip	Integra Biosciences (Biebertal, D)
Vario-Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000µl)	Gilson (Bad Camberg, D)
VisiBlue™ Transilluminator	UVP (Cambridge, UK)
Vortex Schüttler REAX control	Heidolph Instruments (Schwabach, D)
Vortex Schüttler RS-VA 10	Phoenix Instrument (Garbsen, D)
Wasseraufbereitungssystem Synergy	Merck (Darmstadt, D)
Wasserbad 020 T	LAUDA (Lauda-Königshofen, D)
Wasserbad Aqualine AL5	LAUDA (Lauda-Königshofen, D)

9.3 Chemikalien und Reagenzien

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sowie deren Hersteller aufgelistet.

Tabelle 9.3: Chemikalien mit Angabe von Herstellern und Bestellnummern

Chemikalie	Hersteller	Bestellnr.
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth	6908.2
2x YT-Medium	Carl Roth	X966.2
Adenosin-5-triphosphat Dinatriumsalz (ATP)	Carl Roth	HN35.2
Agar Agar, Kobe I	Carl Roth	5210.2
Agarose NEEO	Carl Roth	2267.4
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma-Aldrich	A2153
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth	K029.1
β-Mercaptoethanol	Carl Roth	4227.3
Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat	Bio-Rad	500-0006
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ · 2 H ₂ O)	Carl Roth	5239.2
Carbenicillin Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich	C1389
Cholecalciferol	Santa Cruz Biotechnology	sc-205630

Cholesterol	Sigma-Aldrich	C8667
Dehydroergosterol	Sigma-Aldrich	E2634
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich	D5758
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth	4720.2
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth	P030.1
DNA-Beladungspuffer (6x)	Fermentas	R0619
Essigsäure	Carl Roth	7332.1
Ethanol > 99,5%	Carl Roth	5054.3
Ethanol, vergällt 70%	Carl Roth	T913.3
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth	CN06.1
Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas	SM0321
Glycerin	Carl Roth	3783.1
Glycin	Carl Roth	3908.2
IGEPAL® CA-630	Fluka	56741
Isopropanol (2-Propanol, 99,8%)	Carl Roth	6752.3
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth	2316.4
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth	6781.1
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth	3904.1
Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth	6751.1
Kanamycinsulfat	Carl Roth	T832.1
Levamisol-Hydrochlorid	Sigma Aldrich	31742
Lysotracker® Red DND-99	Thermo Fisher	L7528
Magnesiumchlorid Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth	2189.2
Magnesiumsulfat Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth	P027.2
MG-132	Calbiochem (Merck)	474790
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth	9105.3
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth	3957.1
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth	6771.1
Natriumhypochlorit-Lösung (NaClO in H_2O , 12 % Cl)	Carl Roth	9062.3

NIAD-4	Cayman Chemical	18520
Nystatin-Suspension	Sigma-Aldrich	N1638
Paraformaldehyd	Fluka	76240
Pepton aus Casein	Merck	1.11931.1000
N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin (Suc-LLVY-AMC)	Sigma-Aldrich	S6510
SYBR® Safe	Life Technologies	S33102
Tetracyclin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich	T7660
TRIS-Hydrochlorid (TRIS-HCL)	Carl Roth	9090.3
Triton-X 100	Carl Roth	3051.3
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich	P1379

9.4 Puffer und Lösungen

In diesem Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen mit der Angabe von Konzentration, den einzelnen Bestandteilen und entsprechenden Mengenangaben sowie dem jeweiligen Lösungsmittel aufgeführt.

Tabelle 9.4: Stammlösungen

Stammlösung	Konzentration	Lösungsmittel
Ampicillin ¹	100 mg/ml	Ethanol (50 %)
CaCl ₂ ²	100 mM	H ₂ O bidest.
Carbenicillin ¹	25 mg/ml	Ethanol (50 %)
Cholecalciferol ¹	100 mM	Ethanol:Tween®20 (92:8 v/v)
Cholesterol ¹	5 mg/ml	Ethanol (99,8 %)
Dehydroergosterol ¹	10 mM	Ethanol:Tween®20 (92:8 v/v)
EDTA ³	0,5 M	H ₂ O bidest.
IPTG ¹	1 M	Ethanol (50 %)
Kanamycin ²	25 mg/ml	H ₂ O bidest.
KCl ³	50 mM	H ₂ O bidest.
KH ₂ PO ₄ ²	1 M	H ₂ O bidest.
Levamisol ²	2 mM	M9-Puffer
LysoTracker® Red DND-99 ¹	1 mM	DMSO

MG-132 ¹	1 mM	DMSO
MgCl ₂ ²	2,5 mM	H ₂ O bidest.
MgSO ₄ ²	0,1 M	H ₂ O bidest
MgSO ₄ ²	1 M	H ₂ O bidest.
NaOH ³	5 N	H ₂ O bidest
NIAD-4 ¹	10 mM	DMSO
Proteinkinase K ¹	20 mg/ml	H ₂ O bidest
Suc-LLVY-AMC ¹	14 mM	DMSO
Tetracyclin ¹	25 mg/ml	Ethanol (50 %)
TRIS pH 8,3 ³	10 mM	H ₂ O bidest

Die Lagerung erfolgte bei -20°C¹, bei 4°C² oder bei RT³.

Tabelle 9.5: Bleichlösung

Bleichlösung	
NaClO (12% Cl)	0,5 ml
NaOH (5 N)	0,5 ml
H ₂ O bidest.	0,5 ml

Die Bleichlösung wurde für jeden *EggPrep* frisch angesetzt.

Tabelle 9.6: DEPC-Wasser

DEPC-Wasser	
DEPC	1 ml
H ₂ O bidest.	ad 1 l
→ autoklavieren	

Für die Herstellung von nukleasefreiem Wasser wurde DEPC verwendet, das der Inaktivierung von Nukleasen dient. Die Lagerung erfolgte bei RT.

Tabelle 9.7: Einfrierpuffer A

Einfrierpuffer A	
K ₂ HPO ₄	8,7 g
KH ₂ PO ₄	6,8 g

NaCl	2,9 g
H ₂ O bidest.	ad 500 ml
→ pH 5,95	
→ autoklavieren	

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Tabelle 9.8: Einfrierpuffer B

Einfrierpuffer B	
Einfrier-Puffer A	700 ml
Glycin	300 ml

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Tabelle 9.9: Ethanol:Tween®20

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

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Tabelle 9.10: Fixierungslösung

Fixierungslösung	
Paraformaldehyd	2 g
PBS für Wurmfarbung	50 ml
→ pH 7,4 einstellen	

Die Lagerung erfolgte bei RT.

Tabelle 9.11: Lyse-Puffer I

Lyse-Puffer I	
HEPES (pH 7,4)	12 g
NaCl	9 g
EDTA	1,5 g
DTT	0,3 g

H ₂ O bidest.	ad 1 l
--------------------------	--------

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Tabelle 9.12: Lyse-Puffer II

Lyse-Puffer II (Wurm-Lyse-Puffer für die SW-PCR)	
TRIS (pH 8,3, 10 mM)	0,121 g
KCl	0,3725 g
MgCl ₂	50,825 g
IGEPAL	450 µl
Tween®20	450 µl
Gelatine	100 µl
H ₂ O bidest.	ad 100 ml
→ autoklavieren	
Proteinase K (25 mg/ml)	5 µl

Die Lagerung des Puffers erfolgte bei RT. Die Zugabe von 5 µl Proteinase K-Stammlösung (bei -20°C gelagert) zu 995 µl Puffer erfolgte direkt vor dem Gebrauch.

Tabelle 9.13: M9-Puffer

M9-Puffer	
KH ₂ PO ₄	1,5 g
Na ₂ HPO ₄	3 g
NaCl	2,5 g
H ₂ O bidest	ad 500 ml
→ autoklavieren, abkühlen auf 60°C, anschließende Zugabe von	
MgSO ₄ (1M)	1 ml

Die Lagerung erfolgte bei RT.

Tabelle 9.14: M9:Tween®-Puffer

M9:Tween®-Puffer	
M9-Puffer	495 ml
Tween20®	5 ml

Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 9.15: NaCl-Pepton

NaCl-Pepton	
NaCl	1,5 g
Pepton	1,25 g
H ₂ O bidest.	ad 500 ml
→ autoklavieren	

Die Lagerung erfolgte bei RT.

Tabelle 9.16: PBS für Wurmfärbung

PBS für Wurmfärbung	
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O bidest.	ad 1 l
→ pH 7,4 einstellen	
→ autoklavieren	

Die Lagerung erfolgte bei RT.

Tabelle 9.17: Permeabilisierungspuffer

Permeabilisierungspuffer	
TRIS (125 mM)	760,5 mg
Triton-X 100	0,5 ml
β-Mercaptoethanol	2,5 ml
H ₂ O bidest.	ad 50 ml
→ pH 7,4 einstellen	

Tabelle 9.18: Proteasomaktivitäts-Messpuffer

Proteasomaktivitäts-Messpuffer	
HEPES (pH 7,4)	12 g

NaCl	9 g
EDTA	1,5 g
ATP	2,8 g
H ₂ O bidest.	ad 1 l

Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Tabelle 9.19: 10x TBS-Puffer

10x TBS-Puffer	
NaCl	8,77 g
TRIS	6,06 g
H ₂ O bidest.	ad 100 ml

→ pH 7,5

Der Puffer war bei RT lagerfähig. Vor Gebrauch erfolgte eine 1:10 Verdünnung mit H₂O bidest.

Tabelle 9.20: 50x TAE-Puffer

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

Der Puffer war bei RT lagerfähig. Vor Gebrauch erfolgte eine 1:50 Verdünnung mit H₂O bidest.

9.5 Medien

Tabelle 9.21: NGM-Agar

NGM (<i>Nematode Growth Medium</i>)-Agar	
Agar	6,8 g
Pepton	1 g
NaCl	1,2 g
H ₂ O bidest.	380 ml
→ autoklavieren, abkühlen auf 60°C	
CaCl ₂ (0,1 M)	0,4 ml

Carbenicillin (25 mg/ml)	0,4 ml
Cholesterol (5 mg/ml)	0,4 ml
KH ₂ PO ₄ (1 M, pH 6,0))	10 ml
MgSO ₄ (0,1 M)	0,4 ml
Nystatin-Suspension (10.000 U)	10 ml

Die Kultivierung von *C. elegans* erfolgte auf NGM-Agarplatten. Nach dem Gießen erfolgte die Lagerung der Agar-Platten bei Raumtemperatur.

Tabelle 9.22: Flüssig-NGM

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

Das NGM wurde für jeden Versuch unter sterilen Bedingungen frisch angesetzt. Das eingesetzte Antibiotikum war abhängig von der Versuchsart; für RNAi-Versuche wurde für die Inaktivierung von *E. coli* HT115 als Antibiotikum statt Carbenicillin verwendet.

Tabelle 9.23: 2x YT-Agar

2x YT-Agar	
2x YT-Medium	12,4 g
Agar	6 g
H ₂ O bidest.	ad 400 ml
→ autoklavieren, abkühlen auf 60°C	
<i>Für die Kultivierung von HT115 zusätzlich:</i>	
Ampicillin (100 mg/ml)	400 µl
Tetracyclin (12,5 mg/ml)	400 µl

Die Kultivierung von *E. coli* OP50 und HT115 erfolgte auf den 2x YT-Agarplatten. Nach dem Gießen, welches unter sterilen Bedingungen erfolgte, konnten die Platten bei 4°C gelagert werden.

Tabelle 9.24: 2x YT-Medium

2x YT-Medium	
2x YT-Medium	15,5 g
H ₂ O bidest.	ad 500 ml
→ pH 7,0	
→ autoklavieren	

Flüssiges 2x YT-Medium diente der Flüssigkultivierung von *E. coli* OP50 und HT115. Nach der Autoklavierung erfolgte die Lagerung des Mediums bei RT.

9.6 *C. elegans* Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *C. elegans*-Stämme wurden vom *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) der University of Minnesota (Minneapolis, USA) bezogen. In der Tabelle 9.25 sind die verwendeten Stämme mit dem jeweiligen Genotyp aufgeführt.

Tabelle 9.25: *C. elegans* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
N2	Wildtyp	[237]
CF1553	<i>muIs84 [(pAD76) sod-3p::<i>GFP</i> + <i>rol-6(su1006)]</i></i>	[315]
CL2006	<i>dvIs2 [pCLI2(<i>unc-54/human Abeta peptide 1-42 minigene</i>) + <i>pRF4</i>]</i>	[258]
TJ356	<i>zIs356 [daf-16p::<i>daf-16a/b::GFP</i> + <i>rol-6(su1006)]</i></i>	[268]

9.7 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden die *Escherichia coli* (*E. coli*) - Bakterienstämme OP50 und HT115 verwendet, die in der Tabelle 9.26 mit dem jeweiligen Genotyp aufgeführt werden. Der *E. coli* OP50 Stamm wurde vom CGC (Minneapolis, USA) bezogen. Der *E. coli* HT115 Stamm wurde von *Source BioScience LifeSciences* (Nottingham, UK) bereitgestellt.

Tabelle 9.26: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> OP50	ura-	[237]
<i>E. coli</i> HT115	<i>F-</i> , <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> , <i>IN(rrnD-rrnE)1</i> , <i>lambda-</i> , <i>rnc14::Tn10(DE3 lysogen: lavUV5 promoter -T7 polymerase)</i>	[366]

9.8 RNAi-Klone

Die in dieser Arbeit verwendeten RNAi-Klone stammen aus den RNAi-Bibliotheken von Ahinger [367], der *C. elegans RNAi Library*, und von Vidal [368], der *C. elegans ORFeome v1.1 library*. Sie sind in Tabelle 9.27 aufgeführt.

Tabelle 9.27: RNAi-Klone

Bezeichnung	Cosmid	Beschreibung
<i>daf-9</i>	T13C5.1	<i>abnormal dauer formation</i>
<i>daf-12</i>	F11A1.3	<i>abnormal dauer formation</i>
<i>daf-16</i>	R13H8.1	<i>abnormal dauer formation</i>
<i>daf-36</i>	C12D8.5	<i>abnormal dauer formation</i>
<i>ech-1</i>	C29F3.1	<i>enoyl-CoA hydratase</i>
<i>nhr-8</i>	F33D4.1	<i>nuclear hormone receptor family</i>
<i>nhr-49</i>	K10C3.6	<i>nuclear hormone receptor family</i>
<i>nhr-66</i>	T09A12.4	<i>nuclear hormone receptor family</i>
<i>nhr-80</i>	H10E21.3	<i>nuclear hormone receptor family</i>
<i>vit-6</i>	K07H8.6	<i>VITellogenin structural genes (yolk protein genes)</i>
<i>zmp-2</i>	H19M22.3	<i>Zinc MetalloProtease</i>

9.9 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 9.28 zusammen mit dem Hersteller sowie der Bestellnummer angegeben.

Tabelle 9.28: Kits

Kit	Hersteller	Bestellnummer
Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit, 1-Step	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)	600825
KAPA2G Fast Hot Start PCR Kit	Peqlab (Darmstadt, D)	07-KK5530-03
Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, with dsDNase	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, D)	K1681
peqGold Plasmid Miniprep Kit I	VWR (Darmstadt, D)	12-6943-01
Roti®-Prep RNA MINI	Carl Roth (Karlsruhe, D)	8485.2

9.10 Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind der Tabelle 9.29 aufgeführt. Sie wurden mit Hilfe des *National Center for Biotechnology (NCBI) Primer Designing Tools* entwickelt und von *biomers.net GmbH (Ulm, D)* hergestellt. In der Tabelle sind neben den Sequenzen die Schmelztemperaturen (T_m ; engl. *melting temperature*) der verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

Tabelle 9.29: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	T_m (°C)
ech-1-fw-939-2	AGC TGA GGC TAA GGC ATT TGG	55
ech-1-r-1095-2	TGC TCC CAT GAA TCC AGC TC	55
18S rRNA-fw	ATG GTT GCA AAG CTG AAA CT	53,2
18S rRNA-rev	TCC CGT GTT GAG TCA AAT TA	53,2

T_m : *melting temperature*

9.11 Software

In der Tabelle 9.30 wird die in dieser Arbeit genutzte Software aufgelistet.

Tabelle 9.30: Verwendete Software mit Angabe des Herstellers.

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS6 Extended	Adobe Systems Incorporated (San Jose, USA)
Ascent Software for Fluoroskan 2.6	Thermo Labsystems (Bornheim, D)
GraphPad Prism 5.03	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)
ImageJ 1.51p	National Institutes of Health (Bethesda, USA)
Microsoft Office 2013/2016	Microsoft Deutschland GmbH (München, D)
Motic Images Plus 2.0 ML	Beyersdörfer (Saarbrücken-Eschringen, D)
Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2 (Build 4)	Qiagen (Hilden, D)

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Der größte Dank geht an Prof. Dr. Uwe Wenzel für die Ermöglichung meiner Promotion, die Überlassung dieses spannenden Themas sowie Bereitstellung der ausgezeichneten Forschungsmöglichkeiten. Darüber hinaus danke ich ihm für die konstruktiven Gespräche und die zahlreichen Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. Dr. Gunter Eckert möchte ich mich für die Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die schöne gemeinsame Zeit bedanken, die mich nachhaltig geprägt hat und an die ich immer gern zurückdenke. Angefangen mit Dr. Dorothé Jenni Eisermann, die mich als Master-Studentin mit *C. elegans* bekannt gemacht hat und mit der die Arbeit im Büro besonders am „Gummi-Dienstag“ nie langweilig wurde. Dr. Elena Fitzenberger danke ich für die fachliche Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit, das immer offene Ohr sowie die ermutigenden Gespräche. Auch bei Mehtap Civelek möchte ich für die gemeinsame Promotionszeit bedanken, in der wir gemeinsam Höhen und Tiefen des Laboralltags erleben durften.

Ein großer Dank gilt auch meinen Studenten, die mir neben Ergebnissen auch viele schöne und lustige Momente am Institut geschenkt haben. Vielen Dank an Tommy Schmiedl, Dr. Oliver Schieweck, Benjamin Dilberger, Fabian Schmitt, Julia Setzer, Franz Ewendt, Katharina Appel, Benita Salomon und Carla Greßies. Für die technische Unterstützung und die vielen nützlichen Tipps im Labor möchte ich mich bei Eva Czynski, Therese Kubetzki-Bauer und Angelika Balzer bedanken. Weiterhin möchte ich mich bei Elli Berger und Alexander Berninger für die gemeinsame Zeit am Institut bedanken.

Bei Prof. Dr. Klaus Eder möchte ich mich für die Ermöglichung der qPCR-Messungen in seinen Laboren bedanken. Ebenso danke ich Dr. Denise Geßner für die Einarbeitung in die Methodik und Sandra Meyer für die Hilfe bei der Umsetzung.

Bei Anika, Hanna und Uta möchte ich mich dafür bedanken, dass sie meine Launen seit Beginn unserer gemeinsamen Studienzzeit aufgefangen haben und immer wieder aufmunternde Worte für mich übrig hatten, die mich kontinuierlich in meinem Vorhaben bestärkten.

Einen wichtigen Anteil an dieser Arbeit trägt meine Familie, die mich trotz der großen Distanz jederzeit unterstützt hat und mir Mut sowie Zuversicht zugesprochen hat. Danke Mama und danke Papa, für all die Mühen, die ihr in mich investiert habt. Und danke Lisa für die Ausbesserung aller Komma- und Rechtschreibfehler, deinen Zuspruch und dein immer Dasein – am Ende des Tunnels kommt immer irgendwann ein Licht...;)

Zu guter Letzt danke ich meinem Freund Simon für seine unendliche Unterstützung, seine positive Art und vor allen Dingen seine Geduld, die er mir während stressiger Phasen gegenüber aufgebracht hat. Zusammen schaffen wir einfach alles!

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

**Erklärung gemäß der Promotionsordnung des Fachbereichs 09
vom 07. Juli 2004 § 17 (2)**

„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.“

Ort, Datum

Unterschrift