

PROFESSUR FÜR MOLEKULARE ERNÄHRUNGSFORSCHUNG



**Das Aggresom als molekulare Zielstruktur
präventiver Wirkungen des Polyphenols
Quercetin im Rahmen Glucose-induzierter
Schädigungen im Nematoden
*Caenorhabditis elegans***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich

Biologie und Chemie

an der

Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Mehtap Civelek

April 2019

„Das Geheimnis aller Erfinder ist, nichts für unmöglich anzusehen.“

Justus Freiherr von Liebig (1803 - 1873)

1. Gutachter:

Prof. Dr. Uwe Wenzel
Professur für Molekulare Ernährungsforschung
Interdisziplinäres Forschungszentrum
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 26-32
35392 Gießen

2. Gutachter:

Prof. Dr. Reinhard Lakes-Harlan
Professur für Integrative Sinnesphysiologie
Carl-Vogt-Haus
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 38
35392 Gießen

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xii
Abkürzungsverzeichnis	xiv
1 Einleitung	1
1.1 Proteostase.....	1
1.1.1 Die <i>unfolded protein response</i>	1
1.1.1.1 <i>Unfolded protein response</i> der Mitochondrien.....	2
1.1.1.2 <i>Unfolded protein response</i> des endoplasmatischen Retikulums.....	2
1.1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System.....	4
1.1.3 Das Aggresom.....	5
1.1.3.1 Allgemeines.....	5
1.1.3.2 Bildung von Aggresomen.....	6
1.1.3.3 Elimination von Aggresomen.....	8
1.1.4 Autophagie.....	8
1.1.5 Mitophagie als selektive Form der Autophagie.....	11
1.1.5.1 Fusion und Fission von Mitochondrien.....	11
1.1.5.2 Rezeptor-vermittelte Mitophagie.....	14
1.1.5.3 Die PINK1/Parkin-vermittelte Mitophagie.....	15
1.2 Glucosetoxizität.....	16
1.2.1 Glucosemetabolismus.....	16
1.2.2 Bildung von AGEs.....	17
1.2.3 Glucosetoxizität und Mitophagie.....	18
1.3 Quercetin.....	19
1.3.1 Vorkommen und Eigenschaften.....	19
1.3.2 Verminderung der Glucosetoxizität durch Quercetin.....	20
1.3.3 Bioverfügbarkeit.....	21

1.4	<i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus	22
1.4.1	Allgemeines	22
1.4.1.1	Anatomie und Physiologie	23
1.4.1.2	Der Lebenszyklus	25
1.4.1.3	Embryogenese	25
1.4.1.4	Larvenstadien (L1-L4).....	26
1.4.2	<i>C. elegans</i> als Modellorganismus zur Untersuchung Glucose-induzierter Schädigungen	27
1.4.3	Das Proteostase-Netzwerk in <i>C. elegans</i>	28
1.4.3.1	Die <i>unfolded protein response</i>	28
1.4.3.2	Das Ubiquitin-Proteasom-System	29
1.4.3.3	Das Aggresom	31
1.4.3.4	Autophagie in <i>C. elegans</i>	31
1.4.3.5	Mitophagie in <i>C. elegans</i>	32
2	Zielsetzung	34
3	Methoden	35
3.1	Kultivierung von <i>C. elegans</i>	35
3.1.1	Herstellung von NGM-Agarplatten	35
3.1.2	Herstellung der <i>E. coli</i> OP50 Kultur	36
3.1.3	Synchronisation von <i>C. elegans</i>	36
3.1.4	Kultivierung der synchronisierten Nematoden in NGM-Flüssigmedium	37
3.1.5	Einfrieren von <i>C. elegans</i>	37
3.2	Inkubation von <i>C. elegans</i> mit den Effektoren Glucose und Quercetin.....	38
3.3	RNA-Interferenz in <i>C. elegans</i>	38
3.4	Bestimmung der Hitzestress-Resistenz	41
3.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	42
3.5.1	Expressionsanalyse mit GFP-Reportergenem	42
3.5.2	Untersuchung der Autophagie in <i>C. elegans</i>	43
3.5.3	Quantifizierung von Lysosomen mit LysoTracker® Red	43

3.5.4	Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrien mit MitoTracker® Red CM-H ₂ XRos	44
3.5.5	Auswertung der Fluoreszenz	44
3.6	Biochemische Methoden	45
3.6.1	Proteinextraktion	45
3.6.2	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford.....	45
3.6.3	Analyse von polyubiquitinierten Proteinen.....	46
3.6.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
3.6.3.2	Western Blot.....	48
3.6.3.3	Ponceau S- und Coomassie-Färbung	48
3.6.3.4	Immunodetektion von K48- und K63-verknüpften Polyubiquitinketten	49
3.6.3.5	Chemilumineszenz-Reaktion	49
3.6.3.6	Strippen	50
3.6.3.7	Immunodetektion von β -Aktin	50
3.6.4	Messung der spezifischen Proteasomaktivität	50
3.6.5	Detektion aggregierter Proteine mit dem ProteoStat® Protein <i>aggregation</i> assay.....	51
3.7	Molekularbiologische Methoden.....	52
3.7.1	Herstellung von RNAi-Klonen	52
3.7.2	Lyse der Nematoden.....	52
3.7.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	52
3.7.4	Agarose-Gelelektrophorese	53
3.7.5	Ligation des PCR-Amplifikats in den pCR2.1-TOPO®Vektor	54
3.7.6	Transformation der Plasmid-DNA in <i>E.coli NovaBlue Giga Singles</i> ™	55
3.7.7	Aufreinigung der Plasmid-DNA	56
3.7.8	Doppelverdau mittels <i>XhoI</i> und <i>HindIII</i>	57
3.7.9	Extraktion der DNA aus dem Agarosegel	57
3.7.10	Ligation des Inserts in den L4440-Vektor	58

3.8	Statistische Auswertung	59
4	Ergebnisse.....	60
4.1	Die Bedeutung von Aggresom-relevanten Genen für die Hitzestress-Resistenz von <i>mev-1</i>	61
4.1.1	Die Verkürzung der Überlebenszeit unter RNAi von <i>ubql-1</i> oder <i>dnc-1</i> wird durch Glucoseexposition in Ab- oder Anwesenheit von Quercetin nicht weiter beeinflusst.....	61
4.1.2	Der Knockdown von <i>sqst-1</i> hat keinen Einfluss auf die Überlebenszeit von <i>mev-1</i> bei 37 °C	62
4.2	Der Einfluss von Aggresom-relevanten Genen auf die Proteinaggregation	63
4.2.1	Das funktionelle Fehlen von <i>ubql-1</i> und <i>dnc-1</i> erhöht die Proteinaggregation und verhindert die Reduktion der Proteinaggregation durch Quercetin in Glucose-exponierten Nematoden	63
4.2.2	Unter <i>sqst-1</i> RNAi bleibt die Proteinaggregation unverändert	64
4.3	Der Einfluss von Aggresom-relevanten Genen auf die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität	65
4.3.1	Der Knockdown von <i>ubql-1</i> und <i>dnc-1</i> verringert die spezifische Proteasomaktivität	65
4.3.2	Das Fehlen des Aggresom-relevanten Gens <i>sqst-1</i> führt zu einer Erhöhung der spezifischen Proteasomaktivität	65
4.4	Der Einfluss von Aggresom-relevanten Genen auf die UPR ^{ER}	66
4.4.1	RNAi Aggresom-relevanter Gene führt zu gesteigertem ER-Stress.....	66
4.4.2	Die Rolle von <i>hsp-4</i> bei der Aufrechterhaltung der Überlebenszeit in funktioneller Abwesenheit von <i>sqst-1</i>	70
4.4.3	Auch <i>pek-1</i> ist kein Kompensationsfaktor einer <i>sqst-1</i> RNAi.....	70
4.5	Der Knockdown von <i>sqst-1</i> aktiviert das Proteasom	71
4.6	Die Bedeutung von Mitophagie-relevanten Genen für die Stressresistenz	73
4.6.1	Der Knockdown von Mitophagie-relevanten Genen verringert die Hitzestress-Resistenz von <i>mev-1</i>	73

4.6.2	Unter RNAi von Mitophagie-relevanten Genen nimmt die Autophagie und die Bildung von Lysosomen ab.....	74
4.6.3	Das Fehlen von Mitophagie-relevanten Genen steigert die ROS-Produktion und die Proteinaggregation.....	77
4.6.4	Der Knockdown von Mitophagie-relevanten Genen resultiert in einer Senkung der spezifischen Proteasomaktivität.....	79
4.6.5	Eine Störung des PINK-1/PDR-1-Signalwegs unter <i>pdr-1</i> RNAi wird durch die Rezeptor-vermittelte Mitophagie kompensiert.....	80
4.7	Der Knockdown von Aggresom-relevanten Genen reduziert die Bildung von Lysosomen.....	81
5	Diskussion.....	83
5.1	Glucosetoxizität und deren Verhinderung durch Quercetin.....	84
5.2	Die Bedeutung des Aggresoms für die Stressresistenz.....	86
5.2.1	Die Elimination von Proteinaggregaten über das Aggresom stellt eine wichtige Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Lebensspanne dar, wobei <i>dnc-1</i> und <i>ubql-1</i> zwei Zielgene von Glucose und Quercetin darstellen.....	86
5.2.2	Das Aggresom-relevante Gen <i>sqst-1</i> ist kein Zielgen von Glucose und Quercetin.....	89
5.3	Der Einfluss von Mitophagie auf die Proteostase in <i>C. elegans</i>	93
5.3.1	Der funktionelle Verlust Mitophagie-relevanter Gene reduziert die Stressresistenz.....	93
5.3.2	Das funktionelle Fehlen von <i>fzo-1</i> verhindert die Fusion von Mitochondrien und deren Elimination über Autophagosomen.....	94
5.3.3	Die Hemmung der mitochondrialen Fission führt zur Akkumulation von geschädigten Mitochondrien.....	95
5.3.4	GLB-1 ist für die Lebensspanne und die Mitophagie in <i>mev-1</i> essentiell.....	97
5.3.5	PGAM-5 wird zum Schutz vor geschädigten Mitochondrien und ROS benötigt.....	98
5.3.6	Das Fehlen von DCT-1 in <i>mev-1</i> führt zu einer Reduktion der Rezeptor-vermittelten Mitophagie und der Lebensspanne.....	99

5.3.7	Der funktionelle Verlust des Mitophagie-relevanten Gens <i>pdr-1</i> wird durch andere Gene kompensiert	100
6	Zusammenfassung	104
7	Summary	106
8	Literatur	108
9	Appendix: Material	165
9.1	Nematodenstämme	165
9.2	Bakterienstämme	165
9.3	RNAi-Klone	166
9.4	Verbrauchsmaterialien mit Hersteller	167
9.5	Geräte	168
9.6	Chemikalien und Reagenzien	170
9.7	Puffer und Lösungen	173
9.8	Medien	183
9.9	Enzyme und Antikörper	185
9.10	Kits	186
9.11	Oligonukleotide	187
9.12	Vektoren	187
9.13	Software	188
	Danksagung	189
	Eidesstattliche Erklärung	190

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Überblick über die Proteinhomöostase	7
Abbildung 1.2 Mitochondriale Dynamik	13
Abbildung 1.3 Strukturformel des Polyphenols Quercetin.....	19
Abbildung 1.4 Anatomie des Hermaphroditen von <i>C. elegans</i>	25
Abbildung 1.5 Lebenszyklus von <i>C. elegans</i>	26
Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der RNA-Interferenz	39
Abbildung 3.2 Typischer Verlauf der Fluoreszenz unter Hitzestress-Bedingungen	42
Abbildung 3.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung des Inserts	54
Abbildung 3.4 Ligation des <i>sqst-1</i> -Inserts in den L4440-Vektor	58
Abbildung 3.5 Genkarte des <i>dnc-1</i> - bzw. <i>sqst-1</i> -RNAi-Plasmids.....	59
Abbildung 4.1 Quercetin führt zur Prävention der Glucose-induzierten Verkürzung der Überlebenszeit von <i>mev-1</i> unter Hitzestress bei 37 °C.....	60
Abbildung 4.2 Unter <i>ubql-1</i> RNAi lebt <i>mev-1</i> kürzer, wobei Quercetin die Lebensspanne nicht mehr verlängert	61
Abbildung 4.3 Der Knockdown von <i>dnc-1</i> mittels RNAi-Methode verringert die Hitzestress-Resistenz von <i>mev-1</i> , worauf Quercetin jedoch keinen Einfluss hat	62
Abbildung 4.4 Unter <i>sqst-1</i> RNAi ist die Lebensspanne von <i>mev-1</i> im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert.....	63
Abbildung 4.5 Unter <i>ubql-1</i> RNAi und <i>dnc-1</i> RNAi ist die Proteinaggregation in <i>mev-1</i> im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht	64
Abbildung 4.6 Unter <i>sqst-1</i> RNAi wird die Proteinaggregation in <i>mev-1</i> nicht beeinflusst....	64
Abbildung 4.7 Der Knockdown von <i>ubql-1</i> und <i>dnc-1</i> führt zu einer Abnahme der spezifischen Proteasomaktivität.....	65
Abbildung 4.8 Das Fehlen von <i>sqst-1</i> resultiert in einer kompensatorischen Erhöhung der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasomaktivität	66
Abbildung 4.9 Unter RNAi der Aggresom-relevanten Gene <i>ubql-1</i> , <i>dnc-1</i> und <i>sqst-1</i> nimmt die <i>hsp-4</i> -Expression zu.....	69

Abbildung 4.10 Die Doppel-RNAi von <i>sqst-1</i> und <i>hsp-4</i> führt nicht zu einer Verkürzung der Überlebenszeit bei 37 °C	70
Abbildung 4.11 Der Knockdown von <i>sqst-1</i> und <i>pek-1</i> hat keinen Einfluss auf die Hitzestress-Resistenz von <i>mev-1</i>	71
Abbildung 4.12 Die Effekte der Doppel-RNAi von <i>sqst-1</i> und <i>ubq-1</i> auf die spezifische Proteasomaktivität sowie die Hitzestress-Resistenz von <i>mev-1</i>	72
Abbildung 4.13 K48-verknüpfte Polyubiquitinketten vs. K63-verknüpfte Polyubiquitinketten unter <i>sqst-1</i> RNAi in der <i>mev-1</i> -Mutante	72
Abbildung 4.14 Der Knockdown von Mitophagie-relevanten Genen führt zu einer Abnahme der Hitzestress-Resistenz von <i>mev-1</i> bei 37 °C.....	74
Abbildung 4.15 Unter RNAi von Mitophagie-relevanten Genen sinkt die Autophagie-Aktivität in BC12921	75
Abbildung 4.16 Die Bildung von Lysosomen nimmt nach dem Knockdown von Mitophagie-relevanten Genen ab.....	76
Abbildung 4.17 Unter RNAi von Mitophagie-relevanten Genen ist die mitochondriale ROS-Produktion in <i>mev-1</i> erhöht.....	77
Abbildung 4.18 Der Knockdown von Mitophagie-relevanten Genen steigert die Menge aggregierter Proteine in Lösung.....	78
Abbildung 4.19 Die spezifische Proteasomaktivität nimmt nach dem Knockdown von Mitophagie-relevanten Genen in <i>mev-1</i> ab	79
Abbildung 4.20 Unter Doppel-RNAi von <i>pdr-1</i> und <i>dct-1</i> sinkt die Hitzestress-Resistenz von <i>mev-1</i> bei 37 °C.....	80
Abbildung 4.21 Der Einfluss von Aggresom-relevanten Genen auf die Autophagie-Aktivität und die Lysosomenbildung	82
Abbildung 5.1 Effekte von Quercetin auf die Proteinelimination über das Aggresom	92
Abbildung 5.2 In Abwesenheit von Mitophagie-relevanten Genen nimmt die Autophagie ab	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Zusammensetzung der 8,5 %igen Trenngele	47
Tabelle 3.2 Zusammensetzung der 5 %igen Sammelgele.....	47
Tabelle 3.3 Phasen der PCR	53
Tabelle 9.1 Nematodenstämme.....	165
Tabelle 9.2 Bakterienstämme	165
Tabelle 9.3 RNAi-Klone.....	166
Tabelle 9.4 Verbrauchsmaterialien mit Hersteller	167
Tabelle 9.5 Geräte und Laborhilfsmittel.....	168
Tabelle 9.6 Chemikalien und Reagenzien	170
Tabelle 9.7 Stammlösungen	173
Tabelle 9.8 Bleichlösung	175
Tabelle 9.9 Einfrierpuffer A	175
Tabelle 9.10 Einfrierpuffer B	175
Tabelle 9.11 Ethanol-Tween®20	176
Tabelle 9.12 M9-Puffer.....	176
Tabelle 9.13 M9-Tween®20.....	176
Tabelle 9.14 NaCl-Pepton.....	177
Tabelle 9.15 Levamisol	177
Tabelle 9.16 3x Lämmli-Puffer	177
Tabelle 9.17 Blotpuffer nach Towbin	178
Tabelle 9.18 10x Laufpuffer	178
Tabelle 9.19 10x PBST-Puffer	178
Tabelle 9.20 <i>Enhanced Chemoluminescence</i> (ECL)-Lösung	179
Tabelle 9.21 Blockpuffer	179
Tabelle 9.22 Ponceau S.....	180

Tabelle 9.23 Coomassie-Färbelösung.....	180
Tabelle 9.24 Entfärbelösung.....	180
Tabelle 9.25 Lysepuffer I.....	181
Tabelle 9.26 10x TBS-Puffer.....	181
Tabelle 9.27 Proteasomaktivitätspuffer	181
Tabelle 9.28 Lysepuffer II.....	182
Tabelle 9.29 50x TAE-Puffer.....	182
Tabelle 9.30 DEPC-H ₂ O.....	183
Tabelle 9.31 MgCl ₂ /CaCl ₂ -Lösung	183
Tabelle 9.32 2x YT-Agar	183
Tabelle 9.33 2x YT-Medium	184
Tabelle 9.34 NGM-Agar	184
Tabelle 9.35 NGM-Flüssigmedium	185
Tabelle 9.36 Enzyme	185
Tabelle 9.37 Antikörper	186
Tabelle 9.38 Kits.....	186
Tabelle 9.39 Oligonukleotide	187
Tabelle 9.40 Vektoren	187
Tabelle 9.41 Software	188

Abkürzungsverzeichnis

AAA+	<i>ATPases associated with various cellular activities</i>
AB	<i>assay buffer</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	<i>advanced glycation endproduct</i>
AGO2	Argonauten-Protein
AKT	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	<i>5'-AMP activated protein kinase</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP-1	<i>activator protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	<i>antioxidant response elements</i>
ASK1	<i>apoptosis signaling kinase</i>
ATF	<i>activating transcription factor</i>
ATFS-1	<i>activating transcription factor associated with stress</i>
ATG	<i>autophagy-related</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAG1	<i>BCL2-associated anthogene</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma</i>
BEC-1	<i>beclin (human autophagy) homolog</i>
bidest.	bidestilliert
BiP	<i>immunoglobulin heavy chain binding protein</i>
bZIP	<i>basic leucine zipper</i>
BNIP3/BNIP3L	<i>BCL2 and adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3/BNIP3-like</i>

BSA	bovines Serumalbumin
BUZ	<i>binder of ubiquitin zinc finger</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
CHOP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-homologous protein</i>
ClpP	<i>caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit</i>
CMA	<i>chaperone mediated autophagy</i>
CML	N ϵ -Carboxymethyllysin
Cvt	<i>cytoplasm-to-vacuole targeting</i>
DCT-1	<i>DAF-16/FOXO controlled, germline tumor affecting</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNC-1	<i>dynactin complex component</i>
Drp1/DRP-1	<i>dynamain-related protein</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
DUB	deubiquitinierendes Enzym
DVE-1	<i>DVE (defective proventriculus in Drosophila) homolog</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
EAT-3	<i>eating: abnormal pharyngeal pumping</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescent</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EggPrep</i>	<i>egg preparation</i>

eIF2	<i>eukaryotic translational initiation factor</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ER α	Estrogenrezeptor- α
ERAD	ER-assoziierte Proteindegradation
ERSE	<i>ER stress-response element</i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complexes required for transport</i>
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid
FIS1/FIS-1	<i>fission1/S. cerevisiae FIS1-related</i>
FOXO	<i>forkhead box O</i>
Fzo1/FZO-1	<i>fuzzy onions 1/FZO (Fzo mitochondrial fusion protein) related</i>
GADD34	<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCN-2	<i>general control non-repressed</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLB	<i>globin related</i>
GLUT	Glucosetransporter
GRP78	<i>glucose regulated protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HbA _{1c}	glykiertes Hämoglobin
HDAC6	<i>histone deacetylase</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Herp	<i>homocystein-induced ER protein</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSE	<i>heat shock element</i>

HSF	<i>heat shock factor</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
HSR	<i>heat stress response</i>
HTRA2	<i>high-temperature requirement protein A2</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRE1	<i>inositol-requiring enzyme</i>
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LAMP2A	<i>lysosome-associated membrane protein type 2A</i>
LC3	<i>light chain</i>
LIR	<i>LC3 interacting region</i>
LPH	Lactase-Phlorizin-Hydrolase
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
<i>mcs</i>	<i>multiple cloning site</i>
MEKK1	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
<i>mev-1</i>	<i>abnormal methyl viologen sensitivity</i>
MGO	Methylglyoxal
Mff	<i>mitochondrial fission factor</i>
Mfn	Mitofusin
MiD	<i>mitochondrial dynamics</i>
MLST8	<i>mammalian LST8/G-protein β-subunit like protein</i>
MPP	<i>mitochondria processing peptidase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP2	<i>multi-drug resistance protein</i>
MTOC	<i>microtubule organization center</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>

mTORC1	<i>mammalian target of rapamycin complex</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
MVB	<i>multivesicular body</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NCBI	<i>national center for biotechnology</i>
NF- κ B	<i>nuclear transcription factor-κB</i>
NGM	<i>nematode growth medium</i>
Nrf2	<i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-related factor</i>
O ₂	Sauerstoff
p62	<i>Sequestosome</i>
PARP	<i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>
PB1	<i>Phox/Bem1p domain</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
<i>pbs</i>	<i>proteasome beta subunit</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDR-1	<i>parkinson's disease related</i>
PEK-1	<i>human PERK kinase homolog</i>
PERK	<i>pancreatic ER eIF2α kinase</i>
PGAM-5	<i>phosphoglycerate mutase homolog</i>
PI/PI3P	Phosphatidylinositol/Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PINK-1	<i>PINK (PTEN-induced kinase) homolog</i>
PLIC-1	<i>protein linking IAP to the cytoskeleton</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raptor	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>
RIDD	<i>IRE1-dependent decay of mRNAs</i>

RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>revolutions per minute</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Rpn	<i>regulatory particle non-ATPase</i>
Rpt	<i>regulatory particle triphosphatase</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SGLT-1	<i>sodium dependent glucose cotransporter</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SKN-1	<i>skinhead</i>
SQST-1	<i>sequestosome related</i>
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i>
Suc-LLVY-AMC	N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin
SW-PCR	<i>single worm PCR</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIM23	<i>translocase of the inner membrane</i>
T _m	Schmelztemperatur
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i>
TRBP	<i>trans-activating response RNA-binding protein</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC2	<i>tuberous sclerosis complex</i>
UBA	<i>ubiquitin-associated domain</i>
UBL	<i>ubiquitin-like domain</i>
UBL-5	<i>ubiquitin-like family</i>

UBQ	<i>ubiquitin</i>
UBQL-1	<i>ubiquilin</i>
ULK1	<i>Unc-51 like autophagy activating kinase</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UPRE	<i>UPR element</i>
UPR ^{ER}	<i>unfolded protein response des ERs</i>
UPR ^{mt}	<i>unfolded protein response der Mitochondrien</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VPS34	<i>vacuolar protein sorting</i>
WDR-23	<i>WD Repeat protein</i>
XBP-1	<i>x-box-binding protein</i>

1 Einleitung

1.1 Proteostase

Mit der durchschnittlichen Lebenserwartung hat auch die Häufigkeit altersbedingter Erkrankungen in den letzten Jahren weltweit zugenommen [1, 2]. Hierbei spielt u.a. die Proteostase eine wichtige Rolle [3]. Diese beschreibt die zelluläre Proteinhomöostase, die sich aus Proteinaufbau und Proteinabbau zusammensetzt [4]. Maßgeblich wird der Proteinabbau über die Proteinqualitätskontrolle reguliert [5]. Somit bestimmt die Proteostase die zelluläre Funktionalität von Proteinen und damit letztendlich auch die Lebensdauer von Zellen und Organismen [6–8]. Jedoch können die dreidimensionale Struktur und dementsprechend auch die hiervon abhängigen Funktionen der Proteine durch endogene und exogene Stressoren wie Hitze, Schwermetalle sowie metabolischen oder oxidativen Stress beeinträchtigt werden [9–11]. Die hierbei entstehenden fehlgefalteten Proteine können, wenn sie nicht eliminiert werden, akkumulieren und cytotoxische Aggregate bilden [10, 12]. So ist eine Gemeinsamkeit vieler Erkrankungen des Alterns, wie Diabetes mellitus oder Morbus Alzheimer, die Störung der Proteostase [13, 14]. Zur Aufrechterhaltung der Integrität des Proteoms existieren im Organismus verschiedene Mechanismen, die miteinander interagieren und gemeinsam das sogenannte Proteostase-Netzwerk bilden [15, 16]. Letzteres besteht hauptsächlich aus den molekularen Chaperonen, die in die Reparatur bzw. Rückfaltung von fehlgefalteten Proteinen sowie in den proteolytischen Systemen involviert sind, die die Degradation der falsch- oder fehlgefalteten Proteine bewirken [14].

1.1.1 Die *unfolded protein response*

Die *unfolded protein response* (UPR) ist eine Antwort bzw. Reaktion auf zellulären Stress, der durch fehl- oder ungefaltete Proteine ausgelöst wird [17]. Die verschiedenen Signalwege finden im endoplasmatischen Retikulum (ER), in den Mitochondrien (mt) und im Cytosol statt, wobei im letzteren Kompartiment die sogenannte *heat stress response* (HSR) aktiviert wird [17]. Dies weist darauf hin, dass die Proteine im Cytosol besonders sensibel gegenüber Hitzestress sind [9]. Stressbedingungen wie Hitze, Infektionen oder oxidativer Stress induzieren die Expression der sogenannten Hitzeschockproteine (HSPs; *heat shock proteins*) [18, 19]. Hierbei handelt es sich um Chaperone, welche die (Rück-) Faltung der Proteine fördern und durch die Verhinderung von irreversiblen Aggregationen vor Zellschäden schützen [18, 20]. Kommt es zur Akkumulation von ungefalteten Proteinen im Cytosol, so transloziert der Hitzeschockfaktor 1 (HSF; *heat shock factor*), der unter normalen Bedingungen in monomerer, inaktiver Form an HSP70 sowie HSP90 gebunden ist, nach der Trimerisierung in den Zellkern [17]. Hier interagiert HSF-1 durch die *HSP gene promoter*

regions mit den *heat shock elements* (HSEs) und bewirkt die Transkription von HSPs [19]. Dieser Signalweg kann durch elektrophile Chemikalien oder Isothiocyanate aktiviert werden, da diese HSP70 und HSP90 modifizieren und deren Bindung zu HSF-1 beeinträchtigen können [18]. In den Mitochondrien kommt es durch die Überlastung der Kapazitäten der Proteinqualitätskontrolle zu einer Aktivierung protektiver Gene, die an der Wiederherstellung der mitochondrialen Homöostase beteiligt sind [17]. Die UPR^{ER} wird durch transmembranale Sensoren eingeleitet, welche die Zunahme von ungefalteten Proteinen detektieren [21].

1.1.1.1 **Unfolded protein response der Mitochondrien**

Störungen bzw. der Knockdown von Genen der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle bewirken die Aktivierung der mitochondrialen UPR (UPR^{mt}) [17]. So führt die Entstehung von ungefalteten Proteinen in der mitochondrialen Matrix von Säugetieren zu einer Aktivierung von HSP60 sowie der ATP-abhängigen Protease ClpP (*caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit*), welche die mitochondriale Proteinhomöostase fördern [22, 23]. Für ihre Expression wird jedoch CHOP (*CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-homologous protein*) benötigt, das durch mitochondrialen Stress induziert wird [23]. Im Nukleus bildet CHOP mit dem anderen Transkriptionsfaktor C/EBP β (*CCAAT/enhancer binding protein β*) ein Heterodimer und fördert die Synthese von Chaperonen [17, 22]. Bei der Aktivierung von CHOP spielt die Kinase JNK2 (*c-Jun N-terminal kinase 2*) eine Rolle. Diese wird durch mitochondrialen Stress phosphoryliert und aktiviert den Transkriptionsfaktor c-Jun, der an die AP-1 (*activator protein 1*)-Bindungsstellen in der Promotorregion von CHOP und C/EBP β bindet [17, 22, 24]. Die Akkumulation von ungefalteten Proteinen im Intermembranraum bewirkt eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Phosphorylierung der Proteinkinase B (AKT), die wiederum über die Aktivierung des Estrogenrezeptors- α (ER α) die Expression u.a. der mitochondrialen Serinprotease HTRA2 (*high-temperature requirement protein A2*) fördert [17]. Diese ist für die Elimination von Proteinen im Intermembranraum der Mitochondrien verantwortlich [17, 25].

1.1.1.2 **Unfolded protein response des endoplasmatischen Retikulums**

Durch die Zunahme von ungefalteten Proteinen im ER-Lumen, die beispielsweise durch virale Infektionen, inflammatorische Zytokine, Hypoxie oder eine Fehlregulation des Calciumstoffwechsels entstehen können, wird ER-Stress ausgelöst [26–28]. Da eine Störung der Proteinstruktur eine Gefahr für die Zellfunktionen darstellt, werden im Organismus bestimmte Abwehrmechanismen aktiviert [29]. Zur Vermeidung von Störungen findet im ER eine Translationshemmung, die Aktivierung der Transkription molekularer Chaperone sowie

der Abbau von Proteinen über die ER-assoziierte Proteindegradation (ERAD) statt [28]. Letztere beschreibt die Elimination von falsch gefalteten Proteinen, die nach dem Transport ins Cytosol und der darauffolgenden Ubiquitinierung durch das Proteasom abgebaut werden [30]. An der korrekten Faltung von Proteinen hingegen sind die molekularen Chaperone beteiligt, wobei GRP78 (*glucose regulated protein 78*), was auch als BiP (*immunoglobulin heavy chain binding protein*) bezeichnet wird, für die UPR^{ER} eine besondere Rolle spielt [31, 32]. Es bindet nicht nur an ungefaltete Proteine, sondern auch an bestimmte ER-Stress-Sensoren, deren Aktivierung durch die Dissoziation von GRP78/BiP unter ER-Stress erfolgt [32]. Initiiert wird die UPR^{ER} durch *inositol-requiring kinase* (IRE1), *pancreatic ER eIF2 α kinase* (PERK) und *activating transcription factor 6* (ATF6) [26].

Die Endoribonuklease-Aktivität der IRE1 bewirkt das Spleißen der mRNA des XBP1 (*X-box binding protein 1*) [32]. Durch die Leserasterverschiebung erfolgt die Generierung eines Transkriptionsfaktors mit einer *basic leucine zipper* (bZIP)-Domäne, der neben der Expression von ER-Chaperonen oder ERAD-Substanzen auch die Phospholipidsynthese fördert [28, 33]. Als Bindungsorte für diesen Transkriptionsfaktor dienen das *UPR element* (UPRE) sowie die *ER stress-response elements* I und II (ERSE-I/ ERSE-II), die sich in der Promotorregion entsprechender Zielgene befinden [33]. Daneben ist IRE1 auch in der Lage, andere im ER lokalisierte mRNAs abzubauen, um die Proteinsynthese und somit den ER-Stress zu verringern, was als *IRE1-dependent decay of mRNAs* (RIDD) zusammengefasst wird [33, 34].

Wie IRE1 stellt PERK auch ein Typ I-Transmembranprotein dar, das eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne aufweist, deren Autophosphorylierung nach der GRP78/BiP-Dissoziation die Aktivierung von ER-Stress-Sensoren auslöst [26, 31, 33]. PERK phosphoryliert dann die α -Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF2 α (*eukaryotic initiation factor 2 α*) an Serin 51 und hemmt damit generell die mRNA Translation [26, 27]. Die Hemmung dieses Prozesses kann in β -Zellen zu einem diabetischen Phänotyp aufgrund einer fehlerhaften Translation und Faltung des Proinsulins führen [33]. Einige UPR-relevante Gene, wie z.B. ATF4 (*activating transcription factor 4*), können jedoch durch die Phosphorylierung von eIF2 α auch verstärkt translatiert werden [26, 33]. ATF4 stellt einen Transkriptionsfaktor der Klasse bZIP dar, der die Expression von ER-Chaperonen wie GRP78/BiP und von Genen des Aminosäure-Stoffwechsels und der Autophagie fördert [33, 35]. Des Weiteren kann ATF4 auch den Transkriptionsfaktor CHOP stimulieren, der die ER-Stress-induzierte Apoptose initiiert [33]. Dies scheint insbesondere dann wichtig zu sein, wenn es durch Mechanismen der UPR^{ER} nicht gelingt, die ungefalteten bzw. falsch gefalteten Proteine zu eliminieren [33, 36]. Auch wird durch CHOP das *growth arrest and DNA damage-inducible protein-34* (GADD34), eine regulatorische Untereinheit der

Proteinphosphatase 1c (PP1c), induziert, was die Dephosphorylierung von eIF2 α bewirkt [26, 27]. Dadurch wird die Proteinsynthese schließlich wiederhergestellt [26].

Im Gegensatz zu IRE1 und PERK handelt es sich bei ATF6 um ein Typ II-Transmembranprotein, das neben einer C-terminalen, Stress-wahrnehmenden Domäne auch eine N-terminale bZIP-Transaktivierungsdomäne besitzt [33, 37]. Während ATF6 unter basalen Bedingungen an GRP78/BiP gebunden ist, verlässt der ER-Sensor nach der Akkumulation von ungefalteten Proteinen und der Dissoziation von GRP78/BiP das ER und gelangt in den Golgi-Apparat [33]. Hier wird ATF6 durch die *site 1* und *site 2* Proteasen in seine funktionelle Form, ATF6 p50, gespalten [33, 35]. So wird die N-terminale Transaktivierungsdomäne von der Membran ins Cytoplasma freigesetzt [35, 37]. Dieses Fragment transloziert in den Nukleus, um als ein Homodimer die Transkription von UPR-Zielgenen, wie z.B. GRP78/BiP, nach der Bindung an die ERSE zu aktivieren [27, 33, 37]. Auch kann ATF6 mit XBP1 unter ER-Stress ein Heterodimer bilden und die Expression von ERAD-Komponenten induzieren [33].

1.1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

In Säugetierzellen wird der Großteil (etwa 80-90 %) der intrazellulären Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut, das zum Schutz der Zelle vor falsch- oder fehlgefalteten Proteinen dient [38]. Durch Ubiquitinierung kommt es zunächst zur spezifischen Markierung der abzubauenen Substrate [39]. Hierzu erfolgt die kovalente Bindung eines hochkonservierten, aus 76 Aminosäuren bestehenden Polypeptids namens Ubiquitin bzw. von Ubiquitinketten an die Zielproteine im Rahmen einer Kaskade von enzymatischen Reaktionen, an denen drei verschiedene Klassen von Enzymen beteiligt sind [39, 40]. Hierbei kann der Carboxy-Terminus (C-Terminus) von Ubiquitin an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes oder an den Amino-Terminus (N-Terminus) des Substratproteins angehängt werden, wodurch eine Isopeptidbindung entsteht [41, 42]. Im ersten Schritt der Ubiquitinierung wird in Abhängigkeit von ATP durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 der C-terminale Glycinrest eines Ubiquitinmoleküls aktiviert [39]. Auch bildet E1 zwischen dem katalytischen Cystein- und dem Ubiquitinmolekül eine Thiolesterbindung, wobei das Enzym mit einem zweiten Ubiquitinmolekül beladen wird, welches adenyliert wird [43]. So entsteht letztendlich ein ternärer Komplex aus kovalent gebundenem Thiolester und dicht gebundenem Ubiquitin-Adenylat-Intermediat [44]. Darauf folgend wird das aktivierte Ubiquitin auf das Cysteinmolekül des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 übertragen, wodurch ein E2-Ubiquitin-Thiolesterintermediat entsteht [39, 45]. Im dritten Schritt kommt es mithilfe der Ubiquitin-Ligase E3 zur Übertragung von Ubiquitin auf einen Lysinrest (K) des Zielproteins [39]. Bei der Übertragung

eines Ubiquitinmoleküls wird von einer Monoubiquitinierung gesprochen, wobei an Ubiquitin auch noch weitere Ubiquitinmoleküle angebracht werden können, was dann zu einer Polyubiquitinierung führt [46]. Letztere ist nicht zu verwechseln mit der Multiubiquitinierung, welche die Ubiquitinierung an verschiedenen Stellen beschreibt [46]. Für die Anknüpfung von Ubiquitin stehen sieben mögliche Lysinreste zur Verfügung (K6, K11, K27, K29, K33, K48 oder K63), wobei K48- bzw. K63-verknüpfte Polyubiquitinketten am häufigsten auftreten [46, 47]. Während die K63-Polyubiquitinierung bei nicht-proteasomalem Proteinabbau eine Rolle spielt, wie z.B. bei Inflammationen, DNA-Reparaturmechanismen oder Stressantwort, gilt die K48-Polyubiquitinierung als ein Signal für proteasomalen Abbau [38, 47]. Für die Degradation der Proteine ist das 2000 kDa schwere, ATP-abhängige 26S-Proteasom verantwortlich, das aus dem zentralen 20S-Kern sowie zwei 19S regulatorischen Partikeln besteht [38, 48]. Das 19S-Proteasom kann in zwei Untergruppen eingeteilt werden, den Basis- sowie den Deckel-Komplex [49]. Letzterer besteht aus mindestens neun Nicht-ATPase-Untereinheiten (*regulatory particle non-ATPase*; Rpn) und ist primär für die Deubiquitinierung der Proteine mithilfe von deubiquitinierenden Enzymen (DUBs) und das Recycling des Ubiquitinmoleküls zuständig [48, 50]. Im Gegensatz dazu bewirkt der u.a. aus sechs AAA-ATPasen (*regulatory particle triphosphatase*; Rpt) aufgebaute Basis-Komplex die Rezeptor-vermittelte Erkennung von ubiquitinierten Proteinen, die Substrat-Entfaltung und die Öffnung des α -Ringes bzw. des sogenannten „Tores“ zum 20S-Proteasom [48, 50, 51]. Hierdurch erfolgt die Translokation der abzubauenen Moleküle ins katalytische Zentrum [50]. Dieses weist eine zylinderförmige Struktur auf, die aus zwei inneren α - sowie aus zwei äußeren β -Ringern aufgebaut ist, die jeweils aus sieben α - bzw. β -Untereinheiten bestehen [48]. Proteolytisch wirksam sind nur die β -Untereinheiten [52]. So zeigen die β 1-, β 2- und die β 5-Untereinheit eine Caspase-ähnliche, Trypsin-ähnliche und eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität, die für die hydrolytische Spaltung von C-terminalen Peptidbindungen saurer, basischer und hydrophober Aminosäuren in Oligopeptide verantwortlich ist [48].

1.1.3 Das Aggresom

1.1.3.1 Allgemeines

Bei einer Störung, Überlastung oder Hemmung des Proteasoms kommt es zu einer Akkumulation bzw. Aggregation von falsch- oder fehlgefalteten Proteinen [53, 54]. Diese sammeln sich in Einschlusskörperchen, den sogenannten Aggresomen [53, 55, 56]. So dient die Aggresombildung zum Schutz vor der Akkumulation cytotoxischer Proteinaggregate durch deren Speicherung und Elimination [56–58]. Überlastungen des Aggresoms und die damit zunehmende Proteinaggregation sind mit dem Altern bzw. mit vielen altersbedingten Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer oder Diabetes mellitus Typ 2, assoziiert [53, 59].

1.1.3.2 Bildung von Aggresomen

Bei der Bildung von Aggresomen spielen Adaptorproteine eine wichtige Rolle [57, 60]. Mutationen spezifischer Adaptorproteine werden mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Parkinson in Verbindung gebracht [57]. Die Adaptorproteine haben die Funktion, die fehlgefalteten bzw. polyubiquitinierten Proteine zu binden [57, 60]. Ein bekannter Vertreter dieser Gruppe ist die Histondeacetylase 6 (HDAC6) [57]. Dieses cytoplasmatische Enzym weist neben zwei funktionell unabhängigen Deacetylasedomänen auch eine Dyneinmotor-Bindungsdomäne und eine C-terminale Zinkfinger-Ubiquitinbindungsdomäne (BUZ; *binder of ubiquitin zinc finger*) auf [57, 61]. Gebunden werden sowohl Mono- als auch Polyubiquitinketten, wobei K63-verknüpfte Polyubiquitinketten präferiert werden [60]. Als weiteres Adaptorprotein gilt PLIC-1 (*protein linking IAP to the cytoskeleton*) bzw. Ubiquilin-1 [57]. Es besteht aus einer N-terminalen Ubiquitin-ähnlichen (*ubiquitin-like*; UBL) sowie einer C-terminalen Ubiquitin-assoziierten Domäne (*ubiquitin-associated*; UBA) [57, 62]. Letztere dient zur Bindung von mono- oder polyubiquitinierten Proteinen, während die UBL mit der 19S-Untereinheit des 26S-Proteasoms interagiert und den proteasomalen Abbau von u.a. neurodegenerativen Proteinen wie Presenilin-1 fördert [62–64]. Bei einer Störung der proteasomalen Degradation kann aber das ubiquitär exprimierte Adaptorprotein Ubiquilin-1 auch die Aggresombildung fördern [63]. Weiterhin besitzt das Adaptorprotein Sequestosom-1 (SQSTM1) eine N-terminale Domäne (Phox/Bem1p (PB1) *domain*), die mit dem Proteasom interagiert, wodurch der Abbau von Proteinen durch das UPS gefördert wird [65, 66]. So weist das auch als p62 bezeichnete Protein noch eine C-terminale UBA auf, mit der es bevorzugt an K63-verknüpfte polyubiquitinierte sowie aggregierte Proteine bindet und die Bildung von Aggresomen fördert [66–70]. Hierfür interagiert es ebenfalls mit Dynein, einem für die Motilität verantwortlichen Motorprotein aus der AAA+-Superfamilie (*ATPases associated with various cellular activities*) [71, 72]. Demzufolge binden die Adaptorproteine, wie p62 oder HDAC6, neben den fehlgefalteten Proteinen auch an den cytoplasmatischen Dyneinmotorkomplex (Abbildung 1.1) [57, 72]. Dieser ermöglicht den retrograden Transport fehlgefalteter Proteine entlang der Mikrotubuli zum MTOC (*microtubule organization center*) [57, 73]. Die hierfür benötigte Energie entsteht bei der Hydrolyse von ATP durch die Motordomäne [57]. Letztere stellt einen Bestandteil des homodimeren Proteins Dynein bzw. von dessen zwei schweren Ketten dar, die an die Mikrotubuli binden und durch die Interaktion mit intermediären sowie leichten Ketten einen Komplex zur Substratbindung bilden [72, 74]. Hierbei spielt der essentielle Cofaktor von Dynein bzw. Dynactin (DCTN) auch eine wichtige Rolle [75], indem er mit p150^{Glued}, einer seiner Untereinheiten, über die intermediäre Kette mit Dynein interagiert und einen zusätzlichen Kontakt zu den Mikrotubuli gewährleistet [57, 74]. So bilden die aggregierten Proteine nach ihrem Transport in die Nähe

des Zellkerns letztendlich das sogenannte Aggresom (Abbildung 1.1) [55, 56, 76]. Als weitere für dessen Formation benötigte Proteine gelten die Enzyme Parkin sowie Ataxin-3, die die Ubiquitinierung bzw. Deubiquitinierung von Proteinen katalysieren und mit ihren Mutationen die Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen beeinflussen [57, 60, 77]. Bei seiner ersten Entdeckung wurde das Aggresom als eine perizentrioläre, membranlose Struktur beschrieben, die von einem Käfig aus Vimentin umgeben ist [53]. Spätere Untersuchungen zeigten, dass diese Einschlusskörperchen auch ohne das erwähnte Intermediärfilament auftreten können und dieses nicht essentiell für ihre Deposition oder Stabilität ist [78]. Zu den Aggresomen werden neben den Bestandteilen des UPS auch Chaperone wie Hsp70 oder Hsp27 rekrutiert [79]. Auch kann die Bildung von Aggresomen durch zelluläre Signalwege, an denen die MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) oder MEKK1 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) beteiligt sind, aktiviert werden [78].

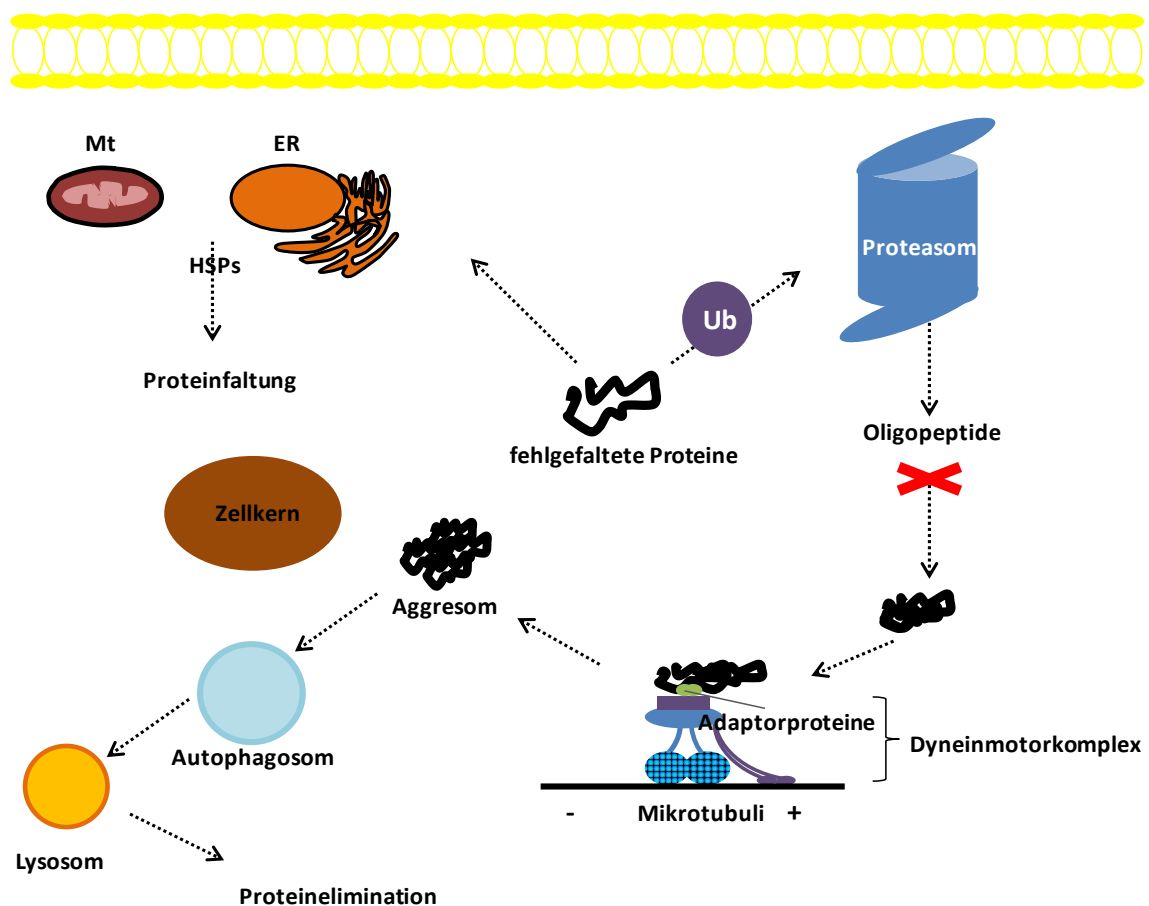


Abbildung 1.1 Überblick über die Proteinhomeostase

Fehlfaltete Proteine werden durch Hitzeschockproteine (HSPs) rückgefaltet, die im Mitochondrium (Mt) bzw. im endoplasmatischen Retikulum (ER) aktiviert werden. Der Großteil der Proteine wird nach der Ubiquitinierung (Ub) über das Proteasom abgebaut, wobei dessen Störung mit einer Bildung von Aggresomen einhergeht. Diese werden von Autophagosomen aufgenommen, die mit Lysosomen fusionieren, in denen die Proteine hydrolytisch abgebaut werden. Modifiziert nach [57, 80, 81].

1.1.3.3 Elimination von Aggresomen

Die Elimination von Aggresomen erfolgt durch Makroautophagie bzw. die Aufnahme durch Autophagosomen (Abbildung 1.1) [57, 73, 78]. Diese verschmelzen mit Lysosomen, in denen der Abbau der Proteine durch saure Hydrolasen stattfindet [78]. Somit stellt der Aggresom-Autophagie-Weg neben den molekularen Chaperonen und dem UPS ein drittes Abwehrsystem dar [57]. Auch sind die bereits erwähnten Adaptorproteine an der Elimination von Aggresomen beteiligt. Demnach interagiert p62 über eine LC3 (*light chain 3*)-interagierende Region (LIR; *LC3 interacting region*) mit autophagosomalen Proteinen LC3 sowie GABARAP (*gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*) und bewirkt die Aufnahme von ubiquitinierten Proteinen [82]. Das Enzym HDAC6 hingegen fördert durch seine Deacetylierungsfunktion die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen [83, 84]. Laut Studien besteht zwischen der Bildung von Aggresomen und dem Zellüberleben eine enge Korrelation [79], wobei die Hemmung ihrer Formation cytotoxisch wirkt [85]. Im Folgenden werden die Autophagie und insbesondere die für die vorliegende Arbeit relevante Mitophagie näher beschrieben.

1.1.4 Autophagie

Die Autophagie beschreibt den Prozess der Verdauung von zelleigenem, cytoplasmatischem Material durch Lysosomen [86, 87]. Hierzu zählen Cytosol, Organellen oder auch Proteinaggregate [88]. So spielt die Autophagie bei zahlreichen Entwicklungsprozessen eine Rolle, wie z.B. bei der Sporulation von Hefezellen, bei der Puppenbildung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* oder beim Übergang in die Dauerphase von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) [89]. Die drei häufigsten Formen der Autophagie stellen Makroautophagie, Mikroautophagie sowie die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) dar [89, 90]. Diese können weiterhin in zwei Formen eingeteilt werden: die selektive und die nicht-selektive Autophagie [91].

Die CMA bewirkt die Translokation von einzelnen Proteinen aus dem Cytosol ins lysosomale Lumen mithilfe von molekularen Chaperonen [90, 92]. Wie die Makroautophagie wird auch die CMA unter Stressbedingungen, wie Nährstoffmangel, maximal aktiviert, wobei dieser Prozess in vier Schritten erfolgt [90, 93]. Zunächst findet nach der Erkennung der Proteine ihr Transport zum Lysosom statt [90, 93, 94]. Hierfür bindet das Chaperon Hsc70 (*heat shock cognate protein of 70 kDa*) mit einigen Co-Chaperonen, wie z.B. HSP90 oder BAG1 (*BCL2-associated anthogene 1*) an die Substrate, die ein Erkennungsmotiv bzw. ein Pentapeptid (KFERQ) in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen [87, 93]. Die Aufnahme der Substrate in die Lysosomen wird nach der Entfaltung mittels Chaperonen durch den

Rezeptor LAMP2A (*lysosome-associated membrane protein type 2A*) gefördert [87, 93, 94]. Nach der Translokation durch die lysosomale Membran erfolgt die Degradation der Substrate mithilfe von Proteasen [94]. Im Vergleich zur Makroautophagie wird die CMA bei länger andauerndem Nahrungsmittelmangel aktiviert [87]. Im Vordergrund steht hierbei der Abbau von falsch gefalteten, geschädigten, oxidierten cytosolischen Proteinen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen [93, 95].

Die Mikroautophagie ist charakterisiert durch die direkte Einstülpung der lysosomalen Membran, die zur Entstehung von Vesikeln führt, in denen die zu degradierenden cytosolischen Proteine eingeschlossen werden [90, 96]. Diese gelangen nach dem Abschnüren ins lysosomale Lumen und werden abgebaut [90, 97, 98]. Durch Studien an Hefezellen ist bekannt, dass ATG (*autophagy-related*)-Proteine an diesem Prozess beteiligt sind, wobei neben löslichen Proteinen auch ganze Organellen (wie z.B. Peroxisomen oder der Nukleus) über die Mikroautophagie selektiv eliminiert werden können [90, 99, 100]. Bei der selektiven Elimination von cytosolischen Proteinen spielen auch die Endosomen eine wichtige Rolle [101]. Diese nehmen u.a. Proteine mit einem Erkennungsmotiv (KFERQ) auf und bilden sogenannte multivesikuläre Körper (*multivesicular bodies*; MVBs) [102, 103]. An deren Entstehung bzw. der Einstülpung der Endosomenmembran sind u.a. auch die ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*)-Komplexe beteiligt [100, 102, 103]. Letztendlich fusionieren die MVBs, die auch als späte Endosomen bezeichnet werden, mit Lysosomen, in denen der Proteinabbau stattfindet [100, 104].

Die initiale Antwort der Zellen auf Nährstoffmangel ist die Aktivierung der Makroautophagie, die durch den Abbau von zellulären Komponenten essentielle Makromoleküle liefert [87]. Hierbei kommt es zunächst zur *de novo*-Synthese einer Isolationsmembran bzw. einer halbmondförmigen Doppelmembran, die auch als Phagophor bezeichnet wird [105, 106]. Während seines Wachstums nimmt dieses einen Teil des Cytoplasmas, Proteine, geschädigte Organellen oder invasive Mikroben auf, wodurch Vesikel namens Autophagosomen entstehen [101, 106, 107]. Für die Genese der Isolationsmembran können verschiedene zelluläre Strukturen wie das ER, die äußere Mitochondrienmembran oder die Plasmamembran dienen [108]. Diese fusionieren mit den Lysosomen, wodurch Autolysosomen (sekundäre Lysosomen) entstehen, in denen die Degradation von eingeschlossenen Substraten erfolgt [92, 106]. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) weist ein ähnliches System bzw. den *cytoplasm-to-vacuole targeting* (Cvt)-Signalweg auf, der jedoch nur unter nährstoffreichen Bedingungen aktiviert wird, wobei die Vakuolen als Lysosomen fungieren [104, 109]. Die verschiedenen Schritte der Makroautophagie werden durch die ATG-Proteine organisiert [87]. Somit werden für die Bildung von Autophagosomen eine Reihe von verschiedenen Proteinen benötigt, die sich in verschiedene Funktionseinheiten unterteilen lassen [110]. Hierzu zählt u.a. der ATG1/*Unc-51*

like autophagy activating kinase 1 (ULK1)-Komplex [105, 110]. ULK1 stellt das Homolog zum ATG1-Gen von *S. cerevisiae* dar [110]. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist der ULK1-Komplex, bestehend u.a. aus ATG13 sowie ATG101, an mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) gebunden [104, 108]. Letzterer ist zusammengesetzt aus der Serin/Threonin-Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*) und MLST8 (*mammalian LST8/G-protein β -subunit like protein*) [110, 111]. Dieser Komplex bewirkt die Phosphorylierung von ULK1 und ATG13, wodurch die Hemmung der Autophagie erfolgt [104, 109, 110, 112, 113]. Kontrolliert wird die Aktivität von mTORC1 durch die *5'-AMP activated protein kinase* (AMPK), die, wie der Name verrät, durch das erniedrigte ATP/AMP-Verhältnis bzw. die Akkumulation von AMP (Adenosinmonophosphat), bedingt durch Energiemangel, induziert wird [108]. Die AMPK ist in der Lage, mTORC1 durch die Phosphorylierung von seinem negativen *tuberous sclerosis complex 2* (TSC2) bzw. seinem positiven Regulator Rheb (*RAS-homologue enriched in brain*) zu inhibieren [114]. Auch wird der mTORC1-Komplex direkt inhibiert, indem mTOR, ULK1 und Raptor durch AMPK phosphoryliert werden [108, 110, 111, 113]. Demnach resultiert die Hemmung von mTORC1 in der Induktion der Autophagie [115]. Im Vergleich zu mTOR wird ULK1 durch die Phosphorylierungsreaktion aktiviert und phosphoryliert ihrerseits Beclin-1 bzw. einen Komponenten des Klasse III Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase-Komplexes [106, 116, 117]. Dieser Komplex, der neben Beclin-1 aus den Kinasen PI3KC3/VPS34 (*vacuolar protein sorting 34*) und PIK3R4/VPS15 zusammengesetzt ist, spielt bei der Keimbildung der Isolationsmembran eine wichtige Rolle [104, 118]. Hierbei stellt VPS34 die katalytische Untereinheit dar, die für die Produktion von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) aus Phosphatidylinositol (PI) verantwortlich ist, wobei PI3P in Endosomen, Peroxisomen, Phagosomen oder Omegasomen vorkommt [119]. Bei Beclin-1 hingegen handelt es sich um ein in Säugetierzellen vorkommendes Protein, das als essentiell für die Initiation der Autophagie gilt [104, 120, 121]. Als ein Adaptorprotein bindet es nicht nur an Autophagie-relevante Proteine, sondern dient auch zur Rekrutierung von Proteinen, die an der Modulation von VPS34 beteiligt sind [122]. In Abwesenheit von Autophagie-Stimuli liegt Beclin-1 unter physiologischen Bedingungen gebunden an das antiapoptotische Protein BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) inaktiv in der Zelle vor, wodurch die Interaktion mit VPS34 und somit die Makroautophagie verhindert wird [104, 123, 124]. Gefolgt wird die Keimbildung von der Expansion bzw. Elongation der Isolationsmembran [104, 118]. An diesem Prozess sind zwei Ubiquitin-ähnliche Proteinkonjugationssysteme beteiligt [118, 125]. Beim ersten System wird ATG12 durch ein E1-ähnliches Enzym (ATG7) aktiviert und durch ein E2-ähnliches Enzym (ATG10) auf ATG5 übertragen [108, 125]. Das ATG12-ATG5-Konjugat verbindet sich mit ATG16L (*ATG16-like*) und der entstandene Komplex bindet nach der Dimerisierung an die äußere Phagophorenmembran [108]. Nach der Rekrutierung von LC3, was neben

GABARAP und GATE16 (*Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*) zum ATG8 in der Hefe homolog ist, werden die obigen ATG-Proteine wieder ins Cytoplasma freigesetzt [110, 118, 126]. Beim zweiten Konjugationssystem wird LC3 durch die Protease ATG4 prozessiert, wodurch LC3-I entsteht [104, 118, 127]. Nach der Aktivierung mittels ATG7 erfolgt die Konjugation mit dem Phospholipid Phosphatidylethanolamin mithilfe des E2-ähnlichen Enzyms ATG3 [104, 108, 118]. Das hierbei gebildete membrangebundene Lipoprotein LC3-II gilt als ein Marker für Autophagosomen [108, 128]. Mit der Reifung schließen sich die Autophagosomen und verschmelzen mit Lysosomen, was in der Bildung von Autolysosomen resultiert [104, 108]. An der Fusion der beiden Organellen sind erneut neben HDAC6 auch die SNAREs (*soluble NSF attachment protein receptors*) beteiligt [84, 108]. Letztendlich erfolgt in den Lysosomen die Degradation der Proteine durch saure Hydrolasen [129].

Je nach der Art der abgebauten cytosolischen Komponenten (wie z.B. Mitochondrien oder ER) werden verschiedene Formen der selektiven Degradation durch Makroautophagie (wie z.B. Mitophagie oder ER-Phagie) unterschieden [90]. Da die Mitophagie einen wichtigen Bestandteil der vorliegenden Arbeit darstellt, wird diese im weiteren Verlauf der Arbeit näher beschrieben.

1.1.5 Mitophagie als selektive Form der Autophagie

1.1.5.1 Fusion und Fission von Mitochondrien

In den Mitochondrien erfolgt die ATP-Produktion im Rahmen der Atmungskette [130]. Letztere besteht aus vier multimerischen Komplexen (I-IV), die zusammen Elektronen auf molekularen Sauerstoff (O_2) übertragen, wobei Wasser (H_2O) gebildet wird [130, 131]. Hierbei stammen die Elektronen von den Reduktionsäquivalenten NADH (Nicotinamidadenindinukleotid) oder $FADH_2$ (Flavinadenindinukleotid) [131]. Die von den Reduktionsäquivalenten verbleibenden Protonen werden in Form des in die Matrix gerichteten Protonengradienten durch den Komplex V bzw. die F_0F_1 -ATPase (ATP-Synthase) genutzt, um ATP zu generieren [130, 131]. Neben der Gewinnung von Energie werden in den Mitochondrien auch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS), hauptsächlich an Komplex I und III, als Nebenprodukt durch Elektronenübertragung auf O_2 gebildet [130]. Ungefähr 90 % der im Organismus produzierten ROS haben ihren Ursprung in den Mitochondrien, wobei in diesen Organellen in erster Linie die Bildung des Superoxidradikals ($O_2^{\cdot-}$) stattfindet [130, 132]. Während sie in geringen Maßen positive Effekte aufweisen und u.a. zelluläre Signalkaskaden regulieren, können ROS in hohen Konzentrationen durch die Auslösung von oxidativem Stress pathogen wirken [133, 134]. Physiologische Spiegel an ROS werden durch das Gleichgewicht zwischen ihrer Produktion

und ihrem Abfangen aufrechterhalten [135]. Zum Letzteren tragen neben nutritiven Antioxidantien, wie Flavonoiden, auch antioxidative Enzyme wie die Superoxiddismutase bei [136]. Oxidativer Stress hingegen entsteht, wenn sich das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien in Richtung der Ersteren verlagert [137]. So können ROS unmittelbar zu einer oxidativen Schädigung von mitochondrialen Proteinen, von Lipiden, der mitochondrialen DNA (mtDNA) oder insgesamt zu einer mitochondrialen Fehlfunktion führen [130, 132, 134]. Diese Schäden lösen Mutationen des mitochondrialen Genoms aus und sind mit dem Altern sowie neurologischen oder endokrinologischen Erkrankungen assoziiert, was darauf hinweist, dass gesunde Mitochondrien und deren Qualitätskontrolle eine essentielle Bedeutung für den Organismus haben [130, 138, 139]. Einer dieser Mechanismen, die UPR^{mt}, wurde bereits vorgestellt (Kap. 1.1.1.1). Im Folgenden wird auf weitere für die vorliegende Arbeit relevante Mechanismen der mitochondrialen Proteostase eingegangen.

Eine Fehlfunktion von Mitochondrien, die als ein Kennzeichen des Alterns gilt [140], stellt, wie oben bereits geschildert, eine Gemeinsamkeit von verschiedenen Erkrankungen wie neurodegenerativen Störungen, Krebs oder Diabetes dar [141, 142]. Zur Aufrechterhaltung ihres gesunden Zustands zeigen Mitochondrien ein dynamisches Verhalten und treten nicht als isolierte Organellen auf, sondern bilden ein Netzwerk [143, 144]. Durch die Änderung ihrer Form können sie je nach zellulären Bedingungen, wie Energiestatus oder Stress [145], entweder als fragmentierte, kleine oder als tubuläre, elongierte Mitochondrien auftreten [146]. Abgesehen vom Transport oder Abbau [143] durchlaufen sie pro Stunde 5 mal Fusions- und Fissionsprozesse, durch die diese Organellen ihre Morphologie bzw. ihre Funktionen anpassen, um zelluläre Anforderungen zu erfüllen [147]. Dies bedeutet, dass die Mitochondrien miteinander verschmelzen (Fusion) oder sich in eine oder mehrere voneinander unabhängige Organellen teilen (Fission) und somit ständig ihre Form, Größe oder Position ändern (Abbildung 1.2) [148].

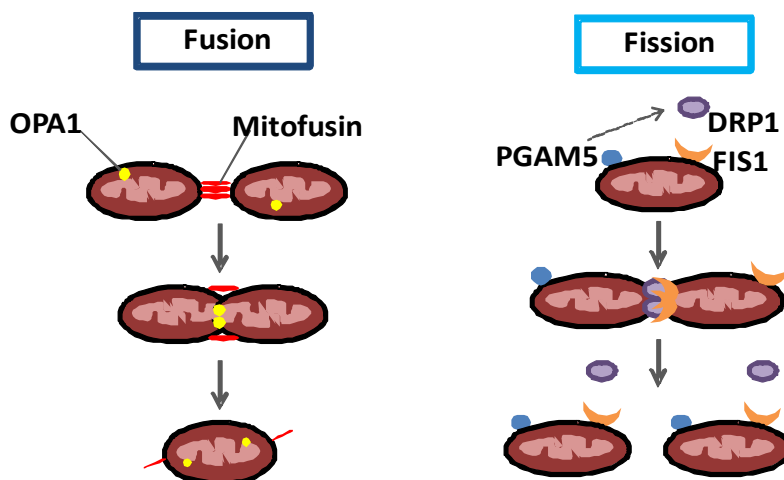


Abbildung 1.2 Mitochondriale Dynamik

Fusions- und Fissionsprozesse fördern die Elimination von geschädigten Mitochondrien. Modifiziert nach [149].

Des Weiteren wird durch die mitochondriale Fusion der Austausch von internen mitochondrialen Proteinen ermöglicht, während die Fission die Elimination von geschädigten Mitochondrien, wie solche mit einem reduzierten Membranpotential, fördert [150]. Beide Prozesse ermöglichen jedoch durch die Aussortierung von geschädigten Mitochondrien deren Degradation [151]. Dass Mutationen von an Fusions- und Fissionsprozessen beteiligten Proteinen mit der Entstehung von verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen einhergehen, zeigt die Bedeutung beider Prozesse für die Zellgesundheit [152].

Für die mitochondriale Fusion sind die Dynamin-ähnlichen GTPasen Mitofusine Mfn (in Säugetierzellen) und *fuzzy onions 1* (Fzo1 in Hefezellen) der äußeren Mitochondrienmembran unentbehrlich (Abbildung 1.2) [148, 153, 154]. Des Weiteren wird die im Intermembranraum lokalisierte GTPase OPA1 (*optic atrophy 1*) benötigt, die ein Homolog zu Mgm1 in der Hefe darstellt [153]. Während Mfn1/Mfn2 und Fzo1 die Fusion der äußeren Mitochondrienmembran steuern, ist OPA1 für die Fusion der inneren Mitochondrienmembran verantwortlich (Abbildung 1.2) [154, 155]. Demnach bewirkt die Fusion das Recycling des Mitochondrieninhaltes oder auch die Umverteilung der Proteinbestandteile und Metabolite [156]. Auch die Fission wird durch GTPasen der Dynamin-Familie reguliert [153, 156]. Hierbei spielt das mitochondriale Außenmembranprotein Fis1 (*fission 1*) eine wichtige Rolle, da es durch die Interaktion mit Drp1 (*dynamain-related protein 1*) die Fission auslöst (Abbildung 1.2) [148]. Bei Drp1 handelt es sich um ein cytosolisches Protein, welches u.a. durch Fis1 zur mitochondrialen Oberfläche rekrutiert wird [156, 157]. Des Weiteren fördert auch die Phosphatase PGAM5 (*phosphoglycerate mutase family member 5*) Mitophagie

durch die Dephosphorylierung bzw. Rekrutierung von Drp1 (Abbildung 1.2) [149, 158, 159]. Abgesehen von Fis1 interagiert Drp1 mit anderen Rezeptoren der Mitochondrienaußenmembran, wie Mff (*mitochondrial fission factor*) oder MiD49/MiD51 (*mitochondrial dynamics*), und gilt somit als ein zentraler Bestandteil der mitochondrialen Fragmentierung [148, 157, 160]. Nach der Fission weist das eine Tochtermitochondrium ein intaktes und das andere ein depolarisiertes Membranpotential auf, wobei Letzteres nicht mehr mit anderen Organellen fusioniert und bevorzugt durch Mitophagie abgebaut wird [161].

Das Wort Mitophagie setzt sich zusammen aus „Mitochondrien“ und „Autophagie“ und beschreibt die selektive Degradation von Mitochondrien durch Autophagosomen [162, 163]. Demzufolge sind sowohl mitochondriale als auch autophagosomale Proteine an diesem Prozess beteiligt [163]. Jedoch können sich die Mechanismen oder auch die daran beteiligten Proteine je nach Organismus unterscheiden [164]. Auch ist die Mitophagie-Rate nicht in jedem Gewebe identisch, sondern in Organen wie im Herz höher [163]. Als Induktor der Mitophagie gelten moderat angestiegene ROS-Konzentrationen, welche zelluläre Stressresistenz verstärken und über hormetische Prozesse vor Krankheiten schützen können [2]. Somit stellt die Mitophagie den Hauptmechanismus für die mitochondriale Qualitätskontrolle dar [165]. Eine Störung dieses Prozesses geht mit physiologischem Altern sowie altersbedingten Erkrankungen einher [2]. Hauptsächlich kann die Mitophagie in zwei Gruppen eingeteilt werden [163, 166], die in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

1.1.5.2 Rezeptor-vermittelte Mitophagie

Bei der Rezeptor-vermittelten Mitophagie in Säugetierzellen spielen die proapoptischen, mitochondrialen Außenmembranproteine BNIP3 (*BCL2 and adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3*) und BNIP3L (*BNIP3-like*), auch bekannt als NIX (*NIP3-like protein X*), eine wichtige Rolle [163, 167, 168]. BH3-only Proteine, zu denen auch BNIP3 und NIX gehören, werden durch intrazellulären Stress aktiviert [169]. Sowohl BNIP3 als auch NIX weisen eine hoch konservierte LC3-interagierende Region (LIR) auf, welche die Bindung an LC3 und GABARAP ermöglicht [163]. Demnach findet so die Aufnahme von Mitochondrien durch Autophagosomen statt [170]. Zur transkriptionellen Aktivierung von BNIP3 und NIX dienen der durch Hypoxie induzierte Transkriptionsfaktor HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*) sowie der unter Hunger aktivierte Transkriptionsfaktor FOXO3 (*forkhead box O3*) [163, 171]. Hierbei stellen der Skelettmuskel, die Leber sowie das Herz den Syntheseort für BNIP3 dar, wobei die Testes oder die hämatopoetischen Gewebe für die Bildung von NIX verantwortlich sind [163]. Nach seiner Expression fördert BNIP3 ebenfalls die Translokation von Drp1 zu den Mitochondrien, wodurch Fissionsprozesse und somit auch die Mitophagie

induziert werden [172]. Weiterhin können NIX und BNIP3 durch die Aktivierung von BECLIN1 den Abbau von Mitochondrien auslösen [163]. Auch stellt FUNDC1 (*FUN14 Domain Containing 1*) ein weiteres mitochondriales Außenmembranprotein dar, das bei Säugetieren die Mitophagie reguliert [163, 173]. Unter normalen zellulären Bedingungen wird dieser Rezeptor durch Kinasen inhibiert [163]. Jedoch wird bei mitochondrialer Depolarisation und Hypoxie der FUNDC1-Rezeptor durch PGAM5 dephosphoryliert und aktiviert [163]. So interagiert dieser Mitophagie-Rezeptor mithilfe seiner LIR-Domäne mit dem autophagosomalen Protein LC3 und ermöglicht den Abbau von Mitochondrien [173].

1.1.5.3 Die PINK1/Parkin-vermittelte Mitophagie

Die PINK1/Parkin-vermittelte Mitophagie wird durch depolarisierte Mitochondrien aktiviert [163]. Wie der Name schon andeutet, spielen bei diesem Signalweg die Serin/Threonin-Kinase PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) sowie die cytosolische E3-Ubiquitin-Ligase Parkin, die bei Parkinson mutiert vorliegt [174], eine wichtige Rolle [175]. Transportiert wird PINK1 in gesunden Mitochondrien durch die Translokasen TOM (*translocase of the outer membrane*) und TIM23 (*translocase of the inner membrane 23*) in die innere Mitochondrienmembran, was in Abhängigkeit vom Membranpotential erfolgt [176]. Sowohl für den Transport als auch für die Verankerung in die Membran wird die N-terminale mitochondriale Zielsequenz (*mitochondrial targeting sequence*; MTS) von PINK1 benötigt, die durch die Peptidase MPP (*mitochondria processing peptidase*) abgebaut wird [163, 175]. Daneben findet auch die Degradation der Transmembrandomäne dieser Kinase durch die Protease PARL (*presenilin associated rhomboid-like protease*) statt [163, 176]. Das restliche Fragment hingegen gelangt von der inneren Mitochondrienmembran ins Cytoplasma, wo es durch das Proteasom abgebaut wird [163]. Im Gegensatz dazu kann in geschädigten Mitochondrien mit einem gestörten Membranpotential, das z.B. durch ROS induzierbar ist [177], PINK1 nicht mehr in die Innenmembran transportiert werden und verbleibt daher in der äußeren Mitochondrienmembran [163, 176]. Hier akkumuliert PINK1 und phosphoryliert nicht nur sich selbst (Autophosphorylierung), sondern auch die Ubiquitinketten der Membranproteine und bewirkt somit die Rekrutierung sowie die Aktivierung von Parkin durch Phosphorylierung seiner UBL-Domäne [163, 175, 176]. Nach seiner Translokation katalysiert die E3-Ubiquitin-Ligase die Ubiquitinierung von Proteinen der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch die Bildung von Autophagosomen bzw. die Mitophagie erhöht wird [163]. Zu den Substraten von Parkin zählen u.a. auch Mfn1/2 oder der Ionenkanal VDAC1 (*voltage-dependent anion-selective channel 1*), wobei die Mitofusine durch das Proteasom eliminiert werden und die hierdurch inhibierte Fusion Mitophagie auslöst [88, 163, 177]. Weiterhin bewirkt die K63-Polyubiquitinierung durch Parkin die

Rekrutierung von p62, welches über die Interaktion mit LC3-II die Aufnahme von Mitochondrien durch die Phagozytose ermöglicht (Kap. 1.1.3.3) [178].

1.2 Glucosetoxizität

1.2.1 Glucosemetabolismus

Das Monosaccharid Glucose gilt als der wichtigste Vertreter der Nahrungskohlenhydrate, weshalb Blutglucose zu den wesentlichen Energielieferanten des Organismus zählt [179, 180]. Jedoch kann eine andauernde exzessive Aufnahme von Kohlenhydraten bei einem überwiegend sitzenden Lebensstil zu stark erhöhten Blutzuckerkonzentrationen und letztendlich zu metabolischen Störungen wie Diabetes mellitus Typ 2 führen [179]. Während der normale Nüchternblutglucosespiegel beim Menschen $< 6,1$ mmol/l (< 110 mg/dl) beträgt, liegen bei Diabetes mellitus Nüchternwerte von ≥ 7 mmol/l (126 mg/dl) vor [181, 182]. Übersteigt der Blutglucosespiegel Konzentrationen von 10 mmol/l (180 mg/dl), so gelangt Glucose in den Urin und wird ausgeschieden [183, 184]. Dieser Zustand verleiht Diabetes mellitus auch seinen Namen [185]. Hauptsächlich existieren zwei Formen dieser Erkrankung. Im Gegensatz zu Diabetes mellitus Typ 1, bei dem Autoimmunreaktionen zu einer Zerstörung von Insulin-sezernierenden β -Zellen und einem absoluten Insulinmangel führen, ist Diabetes mellitus Typ 2 zumindest initial durch eine Insulinresistenz charakterisiert [183, 186, 187]. Eine chronische Insulinresistenz kann zu einer Dysfunktion und letztendlich zu einem Zelltod von β -Zellen führen [188, 189]. Die aufgrund von chronischer Hyperglykämie entstehenden Spätfolgen lassen sich unter dem Begriff Glucosetoxizität zusammenfassen und hauptsächlich in mikrovaskuläre (Retinopathie, Nephropathie oder Neuropathie) sowie makrovaskuläre Komplikationen (Schlaganfall, koronare Herzerkrankung oder periphere arterielle Verschlusskrankheit) einteilen [190–192]. Bei beiden spielt oxidativer Stress eine Schlüsselrolle [193]. Aufgrund der erhöhten Glucosekonzentrationen kommt es zu einer erhöhten Metabolisierung bzw. zu Glykolyse im Cytosol, die wiederum in einer vermehrten Produktion von NADH und Pyruvat resultiert [193–195]. Letzteres wird nach dem Transport in die Mitochondrien im Citratzyklus neben CO_2 und H_2O in NADH sowie FADH_2 umgewandelt, welche für die ATP-Produktion im Rahmen der Atmungskette als Elektronendonatoren fungieren [194]. Diese erzeugen durch den erhöhten Protonenfluss in den Intermembranraum ein hohes Membranpotential, das die Hemmung des Komplex III bewirkt [193, 194]. Dadurch werden die akkumulierten Elektronen durch Coenzym Q auf molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch Superoxidradikale entstehen [193]. Diese führen zur Schädigung von Makromolekülen, wie z.B. Lipiden, Proteinen bzw. der DNA [137]. So resultiert die Hyperglykämie-bedingte ROS-Produktion nicht nur in einer Akkumulation von Proteinen, sondern auch in einer Störung der Proteostase [196]. Des Weiteren wird

durch die Entstehung von DNA-Schäden das DNA-Reparaturenzym PARP-1 (*poly(ADP-ribose) polymerase 1*) induziert, das die Aktivität der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) hemmt, die ein Schlüsselenzym der Glykolyse darstellt [193, 194, 197]. Bedingt durch die Inhibierung der GAPDH kommt es zur Akkumulation von diversen Metaboliten der Glykolyse, die vier Signalwege einleiten, welche an der Pathogenese der diabetischen Spätfolgen beteiligt sind [193, 194]. Hierzu zählen der Polyolstoffwechsel, der Hexosamin-Biosyntheseweg, die Aktivierung der Proteinkinase C und die Bildung von *advanced glycation endproducts* (AGEs) [198]. Die Bildung von AGEs ist unmittelbar abhängig von der Glucosekonzentration sowie der Produktion von ROS und führt zwangsläufig zu strukturellen Veränderungen von Proteinen mit nachfolgenden Funktionseinbußen [199, 200], worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

1.2.2 Bildung von AGEs

AGEs entstehen durch die nichtenzymatische, kovalente Bindung der Aldehydgruppen von reduzierenden Zuckern an die freien Aminogruppen von Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren [201–203]. Über die reversible Bildung der Schiff'schen Base werden durch eine irreversible Amadori-Umlagerung stabile Ketoamine gebildet [203, 204]. Nach verschiedenen strukturellen Veränderungen im Rahmen von Dehydrierungs- oder Oxidationsreaktionen entstehen schließlich die als AGEs bezeichneten heterogenen chemischen Verbindungen [204]. Entdeckt wurde dieser Prozess im Jahr 1912 vom Chemiker Louis Camille Maillard [205]. Doch nicht nur bei der Lebensmittelherstellung ist diese Bräunungs- bzw. Maillardreaktion zu beobachten [205]. Spätere Untersuchungen zeigten, dass AGEs auch im Organismus unter physiologischen Bedingungen entstehen können [202, 205]. Des Weiteren ist *in vivo* durch die Lipidperoxidation oder Autoxidation von Glucose die Bildung von Dicarbonylverbindungen, wie Glyoxal oder Methylglyoxal (MGO), möglich [206]. Als ein wichtiger AGE-Vorläufer ist MGO in der Lage, durch die Reaktion mit verschiedenen Aminosäureresten, wie Arginin, Lysin oder Cystein, Proteine zu modifizieren [206, 207]. Die hierbei gebildeten Addukte führen beispielsweise zur Abnahme der proteasomalen Degradation oder wirken toxisch auf die DNA [206–208]. Daneben kann MGO auch Addukte mit Insulin bilden, was eine Insulinresistenz zur Folge hat [209]. Ein häufiger Vertreter der AGEs ist auch das Molekül N ϵ -Carboxymethyllysin (CML), das im Alter oder insbesondere bei Diabetes vermehrt produziert wird [201, 210]. Das glykierte Hämoglobin (HbA_{1c}) ist ein bekanntes Amadori-Produkt, das als ein wichtiger Langzeit-Indikator des durchschnittlichen Blutzuckerspiegels der letzten 2-3 Monate genutzt wird und mit dem Risiko für das Auftreten von Diabetes-Spätfolgen korreliert [201, 211–213]. Demnach werden die durch AGEs modifizierten Proteine u.a. durch die Gewebsschädigung

für die Beteiligung an der Pathogenese der Makro- und Mikroangiopathien bei den Patienten verantwortlich gemacht [201, 214, 215]. Neben der Beeinflussung der Struktur und der Funktion von Proteinen führen die Glykierungs- bzw. Glykoxidationsprodukte zur Quervernetzung von extrazellulären Eiweißmolekülen wie z.B. Kollagen, wodurch die Pathogenese von vaskulären Erkrankungen begünstigt wird [210, 216]. Daneben spielt auch der *receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE) bei den schädigenden Effekten durch die AGEs eine wichtige Rolle [216]. So kommt es durch seine Stimulation zur Auslösung von verschiedenen proinflammatorischen Mechanismen [202, 216–218]. Letztere werden durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) aktiviert [219, 220]. Dieser transloziert nach der Phosphorylierung bzw. Degradation seines Inhibitors I κ B α in den Zellkern und führt zur Bildung von proinflammatorischen Genen oder ROS, wodurch Entzündungsprozesse gefördert werden [219, 221].

1.2.3 Glucosetoxizität und Mitophagie

Mitochondrien zählen zu den Kompartimenten, in denen der Abbau von Glucose erfolgt [222]. Unter hyperglykämischen Bedingungen gelten diese Organellen als die Hauptquelle von ROS, wobei sie auch von deren Angriffen besonders betroffen sind [223]. So führt Hyperglykämie durch die erhöhte ROS-Produktion zur Auslösung von oxidativem Stress sowie zu einer verstärkten Bildung von mutierter mtDNA [222, 224]. Des Weiteren bewirkt Hyperglykämie eine vermehrte Aktivierung der mitochondrialen Fission [223, 224]. So findet unter pathogenen Bedingungen, wie z.B. bei Diabetes mellitus, neben der exzessiven Fission auch eine Störung der Mitophagie statt, wodurch eine gesteigerte mitochondriale Fragmentierung, ROS-Produktion sowie eine Akkumulation von geschädigten Mitochondrien auftritt [223]. Daneben wurde auch berichtet, dass bei Typ 2-Diabetikern erhöhte HbA_{1c}-Werte mit gesteigerter mitochondrialer Dysfunktion einhergehen und eine erhöhte Expression von p62 auf eine gestörte Mitophagie hinweist [222]. Während niedrige ROS-Spiegel Mitophagie aktivieren können, wird oxidativer Stress, der durch Hyperglykämie verursacht wird, für die Störung der Autophagie und die β -Zell-Dysfunktion bei Diabetes mellitus Typ 2 verantwortlich gemacht [222]. Auf molekularer Ebene spielt bei der Hyperglykämie-bedingten Autophagie-Hemmung bei Diabetes die Inaktivierung der AMPK bzw. die Aktivierung von mTOR eine wichtige Rolle [225]. Zu den Folgen der gestörten Autophagie gehört auch die Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen in β -Zellen [222]. Von einer gestörten Mitophagie sind, u.a. unter hyperglykämischen Bedingungen, insbesondere die Nierenzellen betroffen, die reich an Mitochondrien sind, weshalb eine

Förderung der Mitophagie diabetische Folgeerkrankungen positiv beeinflussen könnte [226, 227].

1.3 Quercetin

1.3.1 Vorkommen und Eigenschaften

Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon) gehört zu den häufigsten und bestuntersuchten Vertretern der Flavonoide bzw. zur Untergruppe der Flavonole (Abbildung 1.3). Das in der Pflanzenwelt weit verbreitete Polyphenol kommt in Tee oder Obst- und Gemüsesorten wie Buschbohnen, Brokkoli und Äpfeln (insbesondere in der Schale [228]) hauptsächlich in Form von wasserlöslichen sowie chemisch stabilen Glykosiden vor [229–231]. Zwiebeln stellen jedoch mit einem Gehalt von ungefähr 0,2-0,4 mg/g die wichtigste Quercetin-Quelle dar [232, 233]. In Deutschland liegt die Quercetin-Aufnahme bei ungefähr 10 mg pro Tag, wobei sie bei westlicher Ernährung zwischen 0-30 mg pro Tag beträgt [228, 234].

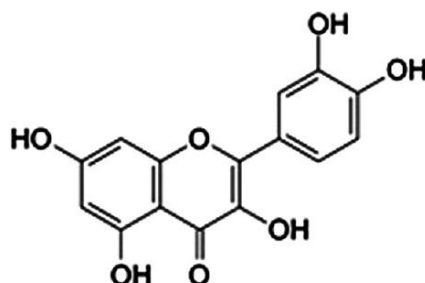


Abbildung 1.3 Strukturformel des Polyphenols Quercetin [235]

Viele günstige physiologische Eigenschaften dieses Polyphenols wurden bisher aufgrund von *in vitro*- sowie *in vivo*-Studien berichtet. Demnach erhöht Quercetin die genomische Stabilität in Ratten und aktiviert antioxidative Enzyme oder wirkt selbst als Radikalfänger [230]. Hierbei spielt die Struktur von Quercetin eine wichtige Rolle (Abbildung 1.3). So verleiht die *o*-Dihydroxystruktur im B-Ring der Radikalform eine höhere Stabilität und trägt zur elektronischen Delokalisation bei, wobei die antioxidative Kapazität durch die Hydroxylgruppen zusätzlich verstärkt wird (Abbildung 1.3) [230, 236–238]. Doch nicht nur die strukturellen Vorteile sind für die antioxidativen Eigenschaften von Quercetin verantwortlich. In *C. elegans* kam es durch die Behandlung mit diesem Polyphenol zu einer gesteigerten Translokation von DAF-16 (*abnormal dauer formation*), dem Homolog von FOXO, was nach seiner Translokation zu einer gesteigerten Expression von Stressantwortgenen führt [239, 240]. Dementsprechend erreicht Quercetin seine antioxidativen Eigenschaften auch durch

die Expression antioxidativer Enzyme wie der Katalase und der Superoxiddismutase [241]. Auch konnte durch das Polyphenol in Abhängigkeit von verschiedenen Genen die Lebensspanne von *C. elegans* verlängert werden [242].

Daneben waren durch Quercetin die Beeinflussung von Schlüsselgenen wie die des Glykolipid-Stoffwechsels sowie die Senkung des systolischen Blutdrucks oder des Serumcholesterols bei kardiovaskulären Risikopatienten und Gesunden zu beobachten [243]. Durch Auslösung von Apoptose und/oder Zellzyklusarrest zeigte Quercetin antikanzerogenes Potential bei verschiedenen Krebsarten wie Prostata-, Zervikal-, Lungen-, Brust- und Kolonkrebs [244]. Als molekulare Zielstruktur bzgl. chemopräventiver Wirkungen ist u.a. das Tumorsuppressorgen p53 zu nennen, dessen Expression durch Quercetin gesteigert [245] bzw. sein Abbau verhindert wird [246]. Weiterhin kam es durch die Behandlung mit Quercetin *in vivo* u.a. durch die Verminderung der Expression von Adhäsionsmolekülen (wie VCAM und E-Selektin) zu antiinflammatorischen Effekten [247]. Als ein weiteres antiinflammatorisches Zielgen dieses Polyphenols ist auch Sirtuin-1 (SIRT1) zu nennen, das verstärkt exprimiert wird [248]. Auch über antihypertensive sowie vasorelaxierende Eigenschaften kann Quercetin die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen günstig beeinflussen [249, 250].

1.3.2 Verminderung der Glucosetoxizität durch Quercetin

Neben den in Kap. 1.3.1 erwähnten günstigen Effekten von Quercetin wurden in verschiedenen *in vitro*- sowie *in vivo*-Studien Wirkungen beobachtet, die sich bei Glucosetoxizität als positiv erweisen könnten. So ist Quercetin in der Lage, die Bildung von AGEs durch die Bindung von Methylglyoxal und Glyoxal zu verhindern [206]. Auch kam es zu einer Inhibierung der Glykierung von Proteinen wie Kollagen oder der DNA [206, 251]. Daneben induzierte Quercetin in einem Diabetes-Mausmodell eine Verringerung der Hyperglykämie im nüchternen sowie postprandialen Zustand [252]. Hierfür könnte die Hemmung des SGLT1 (*sodium dependent glucose cotransporter 1*) oder von Disaccharidasen verantwortlich sein [252, 253]. Des Weiteren wurde durch die Aktivierung der Proteinkinase AMPK durch Quercetin die Translokation und Expression des Insulin-abhängigen Glucosetransporters GLUT4 in Skelettmuskelzellen erhöht [254]. Jedoch hat die Aktivierung der AMPK auch einen anderen Vorteil bei Hyperglykämie. Demnach führt diese Proteinkinase durch die Hemmung von inflammatorischen Prozessen zu einer Verbesserung der Insulinresistenz [255]. Weiterhin konnte in den Studien der Arbeitsgruppe Wenzel gezeigt werden, dass in Nematoden, die gegebenüber 10 mM Glucose exponiert wurden, Quercetin Glucose-bedingte Schädigungen durch die Beeinflussung des Proteastase-Netzwerkes verhindert [256].

1.3.3 Bioverfügbarkeit

Die in den bereits genannten Pflanzen (Kap. 1.3.1) vorkommenden Quercetin-Glykoside bestehen aus einem Aglykon, das durch eine β -glykosidische Bindung an Zuckerreste wie Galactose (Hyperosid oder Hyperid), Glucose (Isoquercitrin), Rhamnose (Quercitrin) oder Rutinose (Rutin) gebunden ist [257]. Die Bioverfügbarkeit des Quercetin-Aglykons ist sehr gering [258]. In Kombination mit Fetten konnte sie jedoch gesteigert werden, was vermutlich darauf beruht, dass die lipophile Struktur besser löslich ist und die Aglykone durch passive Diffusion die Enterozyten passieren [228, 234, 259]. Die Absorption von Quercetin-Glykosiden hängt von der Glykosidgruppe des Moleküls ab [228]. Für Quercetin-Glucoside, wie Quercetin-3-O-Glucosid, wird davon ausgegangen, dass der Transport bzw. die Absorption über den intestinalen Natrium-abhängigen Glucosetransporter SGLT1 erfolgt, der in hohen Mengen in der apikalen Bürstensaummembran des Dünndarms vorkommt [228, 260–262]. Vor der intestinalen Absorption erfolgt jedoch die Deglykosylierung durch das luminal Enzym Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH), eine β -Glucosidase, wobei das freigesetzte Aglykon, wie oben bereits erwähnt, die Enterozyten passiv diffundiert [228, 262–264]. Im Anschluss an die Absorption kommt es zur Glucuronidierung, Methylierung und/oder Sulfatierung von Quercetin im Rahmen der Phase II der Biotransformation in Dünndarm, Leber, Kolon und den Nieren [228, 264], wobei hauptsächlich Quercetin-3-O- β -d-Glucuronide im Blutplasma vorkommen [265]. Für die Aufnahme der Quercetin-Konjugate in die Hepatozyten wird der basolaterale Transporter *organic anion transporter* (OAT) bzw. *organic anion transporting polypeptide* (OATP) benötigt [266]. Die Ausscheidung ins Darmlumen oder von der Leber in die Galle erfolgt über *multi-drug resistance protein 2* (MRP2) [264, 266]. Des Weiteren werden die Quercetin-Derivate, die nicht im Darm absorbiert werden, wie z.B. Quercetin-Rutinoside, nach der Prozessierung durch die mikrobielle β -Glucosidase im Kolon aufgenommen [263, 267]. Quercetin besitzt eine relativ lange Eliminationshalbwertszeit (ca. 17-28 h) [232, 268]. Auch wenn noch keine eindeutigen quantitativen Angaben bzgl. der Bioverfügbarkeit von Quercetin existieren, wurde berichtet, dass die orale Zufuhr einer Einzeldosis von 100 mg zu einer Serumkonzentration von 0,8 μ M führt [269, 270]. Daneben stieg durch die zweiwöchige Aufnahme von 50, 100 oder 150 mg pro Tag dieses Flavonols die Plasma-Quercetinkonzentration auf 145 nmol/l, 217 nmol/l sowie 380 nmol/l [269]. Endogene oder exogene Faktoren können auch die Bioverfügbarkeit von Quercetin beeinflussen [263, 271, 272]. Spekuliert wird u.a. über den Einfluss des Alters, des Geschlechts oder auch des endogenen Vitamin C-Status auf die Quercetin-Bioverfügbarkeit [263]. Letztere kann jedoch *in vivo* durch die Lebensmittelmatrix oder die gleichzeitige Zufuhr von Fetten gesteigert werden [228, 259, 263].

1.4 *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

1.4.1 Allgemeines

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) ist ein 1 mm großer, frei im Boden lebender Rundwurm bzw. Nematode, der sich von Mikroorganismen ernährt [273, 274]. Sein Name setzt sich zusammen aus dem Griechischen (*caeno* = neu, *rhabditis* = stabähnlich) sowie dem Lateinischen (*elegans* = elegant) und deutet auf die Familie der Würmer hin (Rhabditidae) [275, 276]. Erstmals wurde der Wildtyp N2 im Jahr 1956 aus einem Pilzkompost in England isoliert [273]. Sydney Brenner gelang es Jahre später diesen Fadenwurm im Labor unter Verwendung von nicht-pathogenen *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien als Nahrungsquelle zu kultivieren und als einen Modellorganismus zu etablieren [273, 277]. Seither stellt *C. elegans* einen wichtigen Bestandteil verschiedener Forschungsbereiche der Biologie dar, wie z.B. Altersforschung oder Genetik [273]. Zu 60–80 % besitzt das vollständig sequenzierte Genom von *C. elegans* Homologien zu menschlichen Genen [278, 279]. Dies betrifft auch krankheitsrelevante Gene beim Menschen [280]. So wurden in *C. elegans* wichtige Erkenntnisse bzgl. verschiedener Erkrankungen gewonnen, wie die Entdeckung des ersten Präsenilin-Proteins bei Alzheimer oder von DAF-16/FOXO bei Diabetes mellitus Typ 2 [281]. Das zweigeschlechtliche Vorkommen der Nematoden stellt einen weiteren Vorteil in der Forschung dar. Demnach sind die selbstbefruchtenden Hermaphroditen in der Lage, durch die Erzeugung von 300-1000 Nachkommen homozygote Mutationen ohne Paarung aufrechtzuerhalten [278]. Im Gegensatz dazu werden die selten vorkommenden (0,1–0,2 %) Männchen hauptsächlich für Kreuzungsexperimente verwendet [278, 282]. Die einfachen und kostengünstigen Kulturbedingungen auf Agarplatten oder in Flüssigmedium machen *C. elegans* ebenfalls zu einem beliebten Modellorganismus [278]. So können aufgrund der kurzen Generationszeit von drei Tagen bei 20 °C *in vivo*-Experimente in kurzer Zeit durchgeführt werden [277, 278, 282]. Außerdem bietet die Möglichkeit des Einfrierens die langzeitige Aufbewahrung sowie die Wiederverwendung der Nematoden je nach Bedarf [278]. Des Weiteren ermöglicht der transparente Körper die Beobachtung von zellulären Prozessen, wie z.B. die Mitose in Echtzeit, oder den Einsatz von Reporter genen, die zur Markierung von Zellen in lebenden Organismen und zur Untersuchung der Expression von bestimmten Genen dienen [276, 278]. Auch können durch mutierte Stämme, die einfach zu erwerben oder zu generieren sind, genetisch-bedingte physiologische oder verhaltensbezogene Veränderungen untersucht werden [276]. Letztendlich gilt als ein weiterer Vorteil für die Forschung das gezielte und einfache Ausschalten von Genen durch die Methode der RNA-Interferenz, die zur Ermittlung verschiedener Genfunktionen beiträgt [278, 283].

1.4.1.1 Anatomie und Physiologie

Wie oben bereits angedeutet, weist *C. elegans* Geschlechtsdimorphismus auf und kommt sowohl als Hermaphrodit als auch als Männchen vor [278]. Unterscheiden lassen sich die beiden Geschlechter u.a. durch ihre Körperform. Während die Hermaphroditen einen kegelförmigen Schwanz aufweisen (Abbildung 1.4), besitzen die kleineren und dünneren Männchen einen fächerförmigen Schwanz [278, 284]. Eine Gemeinsamkeit ist jedoch die unsegmentierte und zylindrische Körperform, die aus einer inneren und einer äußeren Röhre besteht [285]. Getrennt sind die beiden voneinander durch eine mit Flüssigkeit gefüllte Körperhöhle, die nicht wie das Coelom der Vertebraten vollständig mit mesodermalen Zellen ausgekleidet ist und deshalb auch als Pseudocoelom bezeichnet wird [286, 287]. Dieses ist u.a. für den interzellulären Nährstofftransport sowie den hydrostatischen Druck verantwortlich, der zur Körperform oder der Motilität beiträgt [286–288]. Des Weiteren besteht die äußere Röhre bzw. die Körperwand aus der Kutikula, der Hypodermis, den exkretorischen Systemen, den Neuronen sowie den longitudinalen Muskeln, wobei die innere Röhre den Pharynx, den Intestinaltrakt und bei den adulten Würmern die Keimdrüsen beinhaltet (Abbildung 1.4) [285, 286]. Während die Flüssigkeit des Pseudocoelums im Inneren des Nematoden als ein Hydroskelett fungiert, dient die Kutikula als ein Exoskelett, das auch für die Körperform und die Motilität des Nematoden sorgt [287, 289]. Die überwiegend aus Kollagen bestehende mehrschichtige Kutikula wird durch die darunterliegende Hypodermis und die Saumzellen gebildet [286, 290, 291]. Auch sind die Hauptöffnungen von *C. elegans* (Anus, exkretorische Pore, Vulva und Pharynx) von der Kutikula umgeben [291].

C. elegans besitzt 959 somatische Zellen [278]. Das Nervensystem von *C. elegans* besteht aus 302 Neuronen, die durch Synapsen miteinander verbunden sind und in dem sogenannten Nervenring, dem primitiven Gehirn, der Nematoden zusammenkommen [278, 292]. Hauptsächlich sind sie für die Innervierung der Muskelfasern der Körperwand verantwortlich, wobei sich die meisten Nervenzellkörper zu Ganglien gruppieren [278, 293]. Neben den einfachen Verhaltensweisen wie Fortbewegung, Nahrungssuche/-aufnahme oder Defäkation, können die Würmer auch zwischen Futterquellen oder Temperaturen unterscheiden [293]. So bietet der Modellorganismus die Möglichkeit, Verhaltensweisen der Nematoden gegenüber bestimmten Geruchsstoffen, Futterquellen und unerwünschten Chemikalien zu untersuchen [278, 294].

Der Pharynx besitzt ein eigenes Nerven- und Muskelsystem sowie ein eigenes Epithel [285]. In den pharyngealen Neuronen sind Neuropeptide sowie Neurotransmitter, wie z.B. Glutamat oder Serotonin, enthalten [295]. Die pharyngealen Muskeln lassen sich in drei funktionelle Gruppen einteilen: den Corpus, den Isthmus und den terminalen Bulbus [295]. So werden

Bakterien durch die Pumpaktivität aufgenommen und im Isthmus akkumuliert, woraufhin der Transport der Nahrung durch peristaltische Bewegungen in den terminalen Bulbus erfolgt, in dem das Zermahlen stattfindet [296]. Beteiligt an diesen Prozessen ist u.a. Serotonin, das wie andere Neurotransmitter oder Neuropeptide in den pharyngealen Neuronen enthalten ist [295, 296]. Verbunden ist das Lumen des Pharynx mit dem intestinalen Lumen über das pharyngeal-intestinale Ventil (Abbildung 1.4) [297]. Hierdurch gelangt der Nahrungsbrei in den Darm der Nematoden, wo dann schließlich neben der Verdauung auch die Synthese oder Speicherung von Makromolekülen stattfindet [297, 298]. Letztere schließen Kohlenhydrate in Form von Glykogen sowie Fette in Form von Triglyceriden ein [299, 300]. Ähnlich wie bei Menschen besteht auch das Intestinum von *C. elegans* aus polarisierten epithelialen Zellen, die auf der apikalen Seite mit Mikrovilli ausgestattet sind [301]. Letztendlich wird der Darminhalt über das Rektum bzw. den Anus ausgeschieden [285]. Abgesehen von der Verwertung von Nährstoffen dient der Darm des Nematoden auch als Abwehrsystem gegenüber Pathogenen. Auch wenn *C. elegans* keine zirkulierenden Immunzellen bzw. kein adaptives Immunsystem aufweist, sind die epithelialen Zellen bzw. die Enterozyten in der Lage, auf pathogene Mikroorganismen zu reagieren [302, 303]. Demnach spielt der Darm des Nematoden bei der angeborenen Immunabwehr, an der u.a. der FOXO-Transkriptionsfaktor beteiligt ist, eine wichtige Rolle [302].

Aufgebaut ist das Fortpflanzungssystem des Nematoden aus der somatischen Gonade, der Keimbahn sowie dem Eiablageapparat, den der Uterus, die Vulva, die Muskeln und die Neuronen bilden (Abbildung 1.4) [285]. Die somatische Gonade hingegen besteht u.a. aus der Gonadenscheide oder der Spermathek und formt zusammen mit der Keimbahn zwei symmetrische U-förmige Gonadenarme [304]. Diese sind jeweils mit dem zentralen Uterus über die Spermathek verbunden, in der die reifen Oocyten durch Spermien befruchtet werden, wobei Letztere auch von den Männchen stammen können [285, 304]. Die Gameten der Hermaphroditen weisen nur eine limitierte Spermienproduktion auf [305]. Pro Fertilisation produzieren Hermaphroditen, die zwei X-Chromosomen aufweisen (XX), ungefähr 300 Embryos [278, 304]. Nach der Befruchtung gelangen die Eier in den Uterus und von hier aus über die Vulva in die Außenwelt [285, 304]. Im Vergleich zu den Hermaphroditen besitzen die Männchen mehr somatische Zellkerne, während ihr Fortpflanzungssystem aus der somatischen Gonade, der lediglich Spermien-produzierenden Keimbahn und den dazugehörigen Muskeln oder Nerven besteht [305]. Hierbei bildet die männliche Gonade einen J-förmigen Arm, der über das Proctodaeum mit der Öffnung der Kloake (Anus) verbunden ist [285, 305]. Letztendlich entstehen die Männchen (X0) durch die Fusion von Gameten, denen ein X-Chromosom fehlt (Genotyp 0), mit solchen, die eines enthalten [278, 305].

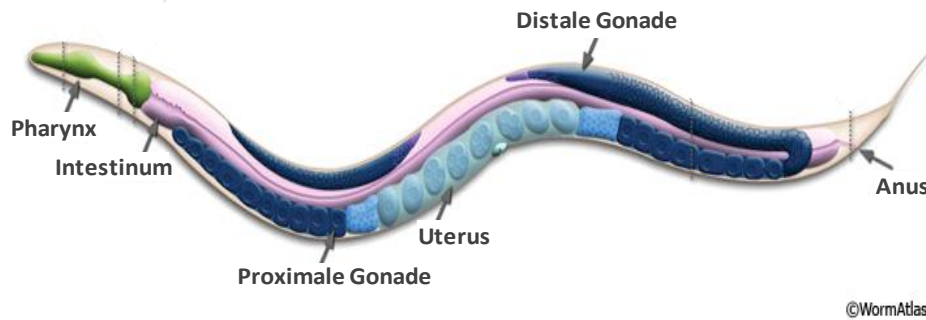


Abbildung 1.4 Anatomie des Hermaphroditen von *C. elegans*

Modifiziert nach [285].

1.4.1.2 Der Lebenszyklus

Mit der Entwicklung des Embryos beginnt auch der Lebenszyklus von *C. elegans*. Dieser lässt sich in verschiedene Abschnitte, das Embryonalstadium, die vier Larvenstadien (L1-L4) und das adulte Stadium, gliedern [285].

1.4.1.3 Embryogenese

Unabhängig davon, ob das Spermium aus der Spermathek des Hermaphroditen oder aus der Paarung mit Männchen stammt, erfolgt die Bildung des Embryos im selbstbefruchtenden Nematoden [278]. Hierbei ist die Embryogenese, die bei Raumtemperatur in ca. 14 Stunden erfolgt, durch zwei Schritte gekennzeichnet, die Proliferation und die Organogenese/Morphogenese [285, 306]. Die erstgenannte Phase beschreibt die Bildung von ungefähr 550 undifferenzierten Zellen durch Zellteilung und umfasst zwei Abschnitte, wobei im Ersteren bzw. in den ersten 150 Minuten im Uterus die Bildung der Zygote sowie die Generierung von embryonalen Gründerzellen stattfindet [285]. Mit dem Erreichen von 28-30 Zellen wird der Embryo über die Vulva an die Umgebung abgegeben, weshalb es außerhalb des Hermaphroditen zur Vollendung der Embryogenese kommt [278]. Im zweiten Schritt kommt es bis zum Beginn der Organogenese zu Zellteilungsereignissen und der Gastrulation (Abbildung 1.5) [285]. Letztere beschreibt den Prozess der Positionierung der Keimblätter im Embryo [307]. Am Ende der Proliferation handelt es sich hierbei um ein in drei Keimregionen organisiertes zelluläres Sphäroid, wozu das Ektoderm, das Mesoderm und das Endoderm gehören [285]. Diese sind für die Bildung verschiedener Gewebe verantwortlich. So entstehen aus dem Ektoderm die Hypodermis oder die Neuronen, wobei das Mesoderm Muskeln und den Pharynx generiert und das Endoderm neben der Keimbahn auch den Darm [285]. Im Gegensatz dazu beschreibt die Morphogenese/Organogenese die

Entwicklung von reifen Organen durch die regulierte Änderung der Gewebsform [308]. Der Embryo bildet somit in dieser Phase differenzierte Gewebe bzw. Organe aus und ändert seinen Körperplan auch nicht mehr während der postembryonalen Entwicklung [285].

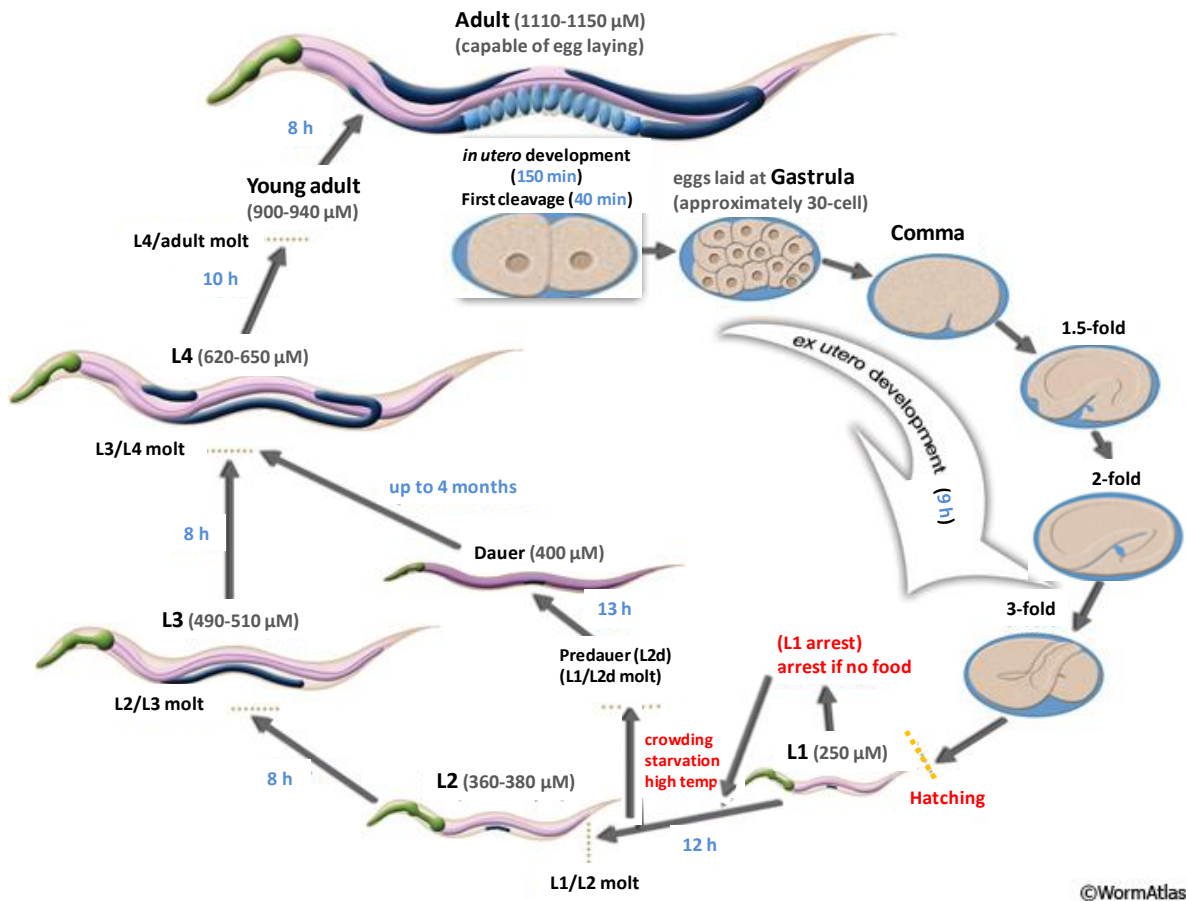


Abbildung 1.5 Lebenszyklus von *C. elegans*

Angaben in blau: Verweildauer im jeweiligen Stadium; Angaben in dunkelgrau: ungefähre Größe des Nematoden im jeweiligen Stadium. Modifiziert nach [285].

1.4.1.4 Larvenstadien (L1-L4)

Nach dem Schlüpfen eines Nematoden aus dem Ei durchläuft er vier Larvenstadien (Abbildung 1.5) [285]. Diese werden durch das Vorhandensein von Nahrung beeinflusst. So können die L1-Larven bei Futterknappheit für mehrere Tage ihre Entwicklung stoppen [278, 285]. Letztere wird jedoch fortgesetzt, sobald wieder Nahrung verfügbar ist [278]. Wie am Ende jedes Larvenstadiums erfolgt auch in L1 eine Häutung, wobei eine neue, für das jeweilige Stadium spezifische Kutikula synthetisiert wird (Abbildung 1.5) [285]. Daneben kommt es auch u.a. zur Entwicklung der Geschlechtsmerkmale, wie der Vulva bei Hermaphroditen oder des fächerförmigen Schwanzes bei Männchen, weshalb schon jung-adulte Würmer eine Reproduktionsfähigkeit aufweisen [278]. Einige Zellteilungsereignisse

finden auch in L2 statt, wobei die Nematoden am Ende dieser Phase wegen ungünstiger Umweltbedingungen, wie Nahrungsknappheit oder Hitze, in ein Dauerstadium übertreten können (Abbildung 1.5) [285]. Hierbei handelt es sich um einen Zustand, in dem die sogenannten „Dauer-Larven“ eine hohe Stressresistenz aufweisen und sowohl ihre Morphologie als auch ihr Verhalten an ihr Umfeld anpassen (Abbildung 1.5) [278, 309]. Demnach zeigen die in der Dauer-Phase nicht alternden Nematoden neben ihrer unveränderten Lebensspanne noch eine reduzierte Nahrungsaufnahme, bedingt durch reduzierte pharyngeale Pumpaktivität, Bewegungsmangel oder auch metabolische Veränderungen [285, 309]. Diese schließen u.a. eine erhöhte Aktivität von antioxidativen Enzymen ein [309]. Jedoch sind die Würmer bei verbesserten Umweltbedingungen, wie Nahrungsangebot, in der Lage, direkt ins L4-Stadium überzutreten und ihre Entwicklung fortzusetzen (Abbildung 1.5) [278]. Hier erfolgt schließlich die Vollendung der Gonadogenese und die anatomischen Unterschiede zwischen Männchen und Hermaphroditen werden sichtbar [278, 285]. Letztere legen ihre ersten Eier bei 22-25 °C ca. 50 Stunden nach dem Schlüpfen, wobei durch Selbstbefruchtung ca. 300 Nachkommen entstehen und diese Zahl durch Paarung auf 1200-1400 steigen kann [285].

1.4.2 *C. elegans* als Modellorganismus zur Untersuchung Glucose-induzierter Schädigungen

Aufgrund des Vorhandenseins eines einfachen Insulinrezeptor-Systems (*daf-2*) ist *C. elegans* zur Untersuchung der Effekte von normalen bzw. pathologischen Glucosekonzentrationen auf molekulare Zellvorgänge besonders gut geeignet [310]. Demnach wurden die Nematoden in zahlreichen Studien zur Untersuchung der Überlebenszeit in Anwesenheit von Glucose eingesetzt [256, 310, 311]. Wildtyp-Würmer zeigten nach der Inkubation mit Glucose aufgrund der erhöhten ROS-Produktion und der vermehrten Bildung von AGEs eine verringerte Überlebenszeit [310]. Zum Teil wird für die Glucose-bedingte Verkürzung der Überlebenszeit auch die Aktivierung des Insulin/IGF-1-Signalweges verantwortlich gemacht, der zu einer Hemmung von DAF-16 führt [310–313].

Weiterhin kann der Stamm TK22 als passender Modellorganismus zur Erforschung diabetischer Zustände verwendet werden [314, 315]. Diese schließen die erhöhte ROS-Produktion sowie die hierdurch auftretenden zu Komplikationen führenden Proteinschäden ein [316]. Bei TK22 [*mev-1 (kn1)III*] handelt es sich um einen Mutanten, der einen Defekt im *abnormal methyl viologen sensitivity (mev-1)*-Gen aufweist, das für das Ortholog der Cytochrom b560-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase kodiert, die im Komplex II (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase) der mitochondrialen Atmungskette vorkommt [317, 318]. Dieser Enzymkomplex katalysiert den Transport von Elektronen von Succinat auf

Ubichinon [318]. Durch die Mutation kommt es zu einer erhöhten Produktion von ROS in Form von Superoxid-Anionen, deren Konzentration unter normalen Bedingungen an Komplex I und III, in *mev-1*-Nematoden jedoch an Komplex II im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist [318–320]. Auch exprimieren die Mutanten im Gegensatz zu N2-Nematoden halb so viel Superoxiddismutase, wodurch es zusätzlich zu einer Hypersensitivität gegenüber dem ROS-generierenden Herbizid Methylviologen (Paraquat) kommt, wonach der Stamm benannt ist [321–323]. Des Weiteren weisen die *mev-1*-Würmer auch geringere Spiegel des antioxidativ wirksamen ROS-scavengers Glutathion auf, was die Superoxid-Anion-Produktion nochmals steigert [319]. Als Folge der *mev-1*-Mutation kommt es zu einer Hypersensibilität gegen ROS, einer verringerten Hitzestress-Resistenz, einem früherem Vorkommen von Alterungsmerkmalen wie Proteincarbonylen sowie einer um 30 % verringerten Lebensspanne [318, 321, 324]. Zusammengefasst stellt die vermehrte Produktion von ROS ein Merkmal von Diabetes aber auch von Alterungsprozessen dar, weshalb *mev-1* für beide Forschungsfelder einen interessanten Modellorganismus darstellt [315, 325, 326].

1.4.3 Das Proteostase-Netzwerk in *C. elegans*

Wie bereits erwähnt, stellt die Regulation der Proteostase das Fundament zur Verhinderung der Proteinaggregation dar [327]. Durch verschiedene Studien an *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass durch Alterungsprozesse, wie bei Menschen, aufgrund der reduzierten Proteostase die Proteinaggregation zunimmt [12, 327–329]. So kann beispielsweise die Anhäufung von Proteinen neurodegenerative Erkrankungen auslösen [53, 329].

1.4.3.1 Die *unfolded protein response*

Bei einer Überlastung der Kapazität der mitochondrialen Proteine, bedingt durch die Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen, wird die UPR^{mt} in *C. elegans* aktiviert [17, 330]. Die Protease CLPP-1 ist für die Degradation der Proteine in kurzkettige Peptide verantwortlich, die mithilfe des *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporters HAF-1 aus der Matrix in den Intermembranraum transportiert werden und von hier aus in das Cytoplasma diffundieren [17, 22]. Dadurch kommt es zur Translokation von ATFS-1 (*activating transcription factor associated with stress 1*) in den Zellkern, wo dieser Transkriptionsfaktor mit einem Proteinkomplex aus UBL-5 (*ubiquitin-like family 5*) und DVE-1 (*DVE (defective proventriculus in Drosophila) homolog 1*) interagiert und die Expression von mitochondrialen Chaperonen wie HSP-60 induziert [17, 331]. Daneben können auch ROS die GCN-2 (*general control non-repressed 2*)-Kinase aktivieren, was zur Phosphorylierung von eIF2 α und somit zur Hemmung der Translation führt [17]. Unter physiologischen Bedingungen

hingegen erfolgt der Abbau von ATFS-1 durch die Protease Lon in der Mitochondrienmatrix [17, 332]. Kodiert wird der Schlüsselregulator der UPR^{ER}, GRP78/BiP, durch zwei Gene in *C. elegans*, *hsp-3* und *hsp-4* [333, 334]. Diese beeinflussen in den Nematoden wie in Säugetierzellen den Aktivitätsstatus der drei Transmembranproteine IRE-1 (*ribonuclease inositol-requiring protein-1*), PEK-1 (*PERK kinase homologue PEK-1*) sowie ATF-6 [335–337]. IRE-1 weist sowohl eine Kinase- als auch eine Endonuklease-Domäne auf [338, 339]. Letztere wird durch ER-Stress aktiviert, wodurch von der *xbp-1* (*X-box Binding Protein homolog 1*)-mRNA (*messenger RNA*) ein Intron durch Splicing entfernt wird und so die für den Transkriptionsfaktor XBP-1 kodierende mRNA entsteht [335, 340]. XBP-1 induziert die Bildung von Chaperonen sowie ERAD-Bestandteilen, welche die Faltung oder Degradation im ER fördern [335]. Eine Störung dieses IRE-1/XBP-1-Signalweges zusammen mit einer Mutation im ATF-6- oder PEK-1-Signalweg wirkt tödlich bei den Larven [336]. Zu den Zielgenen von *xbp-1* zählen u.a. auch die Chaperone *hsp-3* und *hsp-4* [339, 341, 342]. Daneben führt ER-Stress in *C. elegans* auch zu einer erhöhten Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α durch PEK-1 [343], wodurch generell die Translation abnimmt [26, 337]. Gleichzeitig nimmt jedoch die Bildung des Transkriptionsfaktors ATF-5 zu, der homolog zu ATF4 ist, und bei der Regulation der Stressantwort von *C. elegans* eine wichtige Rolle spielt [344, 345]. Des Weiteren wird durch die Akkumulation von ungefalteten Proteinen ATF-6 aktiviert [342]. Nach der Prozessierung durch die S2-Protease gelangt dieser Transkriptionsfaktor in den Nukleus, um die Expression von UPR-Genen zu aktivieren [342, 346]. Durch den Knockdown von UPR^{ER}- bzw. UPR^{mt}-relevanten Genen kam es zu einer Verkürzung der Überlebenszeit der Nematoden, was auch nach der Behandlung der Würmer mit Glucose beobachtet wurde [314]. Auch wurde beim funktionellen Fehlen von Genen wie *xbp-1* oder *hsp-6* der lebensverkürzende Effekt von Glucose verhindert [314]. Des Weiteren löste Hyperglykämie durch die erhöhte Expression von CHOP ER-Stress aus [347]. So spielt die Hyperglykämie-bedingte Störung der ER-Homöostase auch bei Diabetes mellitus durch die Beeinflussung von pathogenen Mechanismen und deren Folgen, wie z.B. β -Zellverlust, eine wichtige Rolle [347, 348].

1.4.3.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das im Cytoplasma und Nukleus eukaryotischer Zellen vorkommende Proteasom gilt auch in *C. elegans* als ein wichtiger Bestandteil der Proteostase [349–352]. Durch die Ähnlichkeiten in der Struktur und im Abbauprozess mit dem humanen UPS eignen sich die Nematoden zur näheren Untersuchung der proteolytischen Mechanismen auf molekularer Ebene [351, 353]. So beginnt in *C. elegans* die Degradation von Proteinen über das 26S-Proteasom auch mit der in drei Schritten ablaufenden Ubiquitinierungsreaktion [353]. Diese startet in den

Nematoden ebenfalls mit der Adenylierung und der Übertragung des Ubiquitinmoleküls auf das E1-Enzym, welches in den Nematoden lediglich durch *uba-1* (*UBA (human ubiquitin) related 1*) kodiert wird [354]. Für Ubiquitin hingegen gibt es in *C. elegans* zwei Loci, die als *ubq-1* und *ubq-2* abgekürzt werden, wobei der für die vorliegende Arbeit relevante *ubq-1*-Locus für ein Polypeptid kodiert, das posttranslational durch Hydrolasen in einzelne Ubiquitin-Peptide gespalten wird [351, 353]. Im zweiten Reaktionsschritt der Ubiquitinierung erfolgt die Anknüpfung des aktivierten Ubiquitinmoleküls an das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2, für das 22 homologe Gene in *C. elegans* existieren und als *ubc* (*ubiquitin conjugating enzyme*) abgekürzt werden [353]. Diese weisen zur Aufnahme von Ubiquitin neben einem UBC (*ubiquitin-conjugating catalytic fold*)-Motiv auch einen katalytischen Cystein-Rest auf [354]. Wie bei Menschen sind bei den Nematoden auch Hunderte von E3-Enzymen bzw. Ubiquitin-Ligasen vorhanden, deren Funktion, wie der Name auch verrät, darin besteht, das Ubiquitinmolekül mit dem Zielsubstrat zu verknüpfen [351, 353, 354]. In *C. elegans* ist nur ein E4-Enzym, *ufd-2* (*ubiquitin fusion degradation (yeast UFD homolog) 2*), nachzuweisen, das zur Verlängerung der Ubiquitinketten dient, wobei auch hier K48-verknüpfte Proteine hauptsächlich über das Proteasom abgebaut werden [354]. Die gegenteilige Reaktion, die Deubiquitinierung, wird in den Nematoden wie in den Menschen durch DUBs katalysiert, die durch die Entfernung der Ubiquitinmoleküle den Eintritt der Substrate ins Proteasom ermöglichen [351, 354]. Das 26S-Proteasom besteht in *C. elegans* ebenfalls aus der zylinderförmigen 20S- und den beiden 19S-Untereinheiten, die beide Enden des katalytischen Kerns bedecken [351]. Aufgebaut ist das 20S-Proteasom aus zwei α - und β -Ringen mit je sieben Untereinheiten [351, 355]. Diese bestehen jeweils zum einen aus den *proteasome alpha subunits* (*pas-1-pas-7*), die für die sieben α -Untereinheiten kodieren, und zum anderen aus den *proteasome beta subunits* (*pbs-1-pbs-7*), die Orthologe zu den humanen β -Untereinheiten darstellen [355]. Wie in Säugetierzellen bilden die α -Untereinheiten das Tor zum 20S-Kern, während die für die Proteolyse verantwortlichen β -Untereinheiten ebenfalls eine Caspase-ähnliche ($\beta 1$), Trypsin-ähnliche ($\beta 2$) sowie eine Chymotrypsin-ähnliche ($\beta 5$) Aktivität besitzen [351]. Weiterhin gilt auch das 19S regulatorische Partikel als eine Gemeinsamkeit von Säugetieren und Würmern. So besteht dieser Komplex aus der Basis und dem Deckel, und ist für die Erkennung, Deubiquitinierung sowie Translokation der Proteinsubstrate verantwortlich [48, 351]. Zur Regulation der Proteasomaktivität spielt die 19S-Untereinheit in den Nematoden auch eine wichtige Rolle [351]. Beispielsweise führt eine Überexpression von *rpn-6*, einem Bestandteil des Deckel-Komplexes, in *C. elegans* zu einer erhöhten proteasomalen Aktivität und einer Verlängerung der Lebensspanne unter mildem Hitzestress bei 25 °C [351, 356]. Da das Proteasom selbst aus Proteinen besteht, gilt es auch als einer der Angriffspunkte unter hyperglykämischen Bedingungen, wie z.B. bei Diabetes mellitus [208, 256, 314]. So kann es durch erhöhte

Blutglucosekonzentrationen aufgrund der vermehrten Bildung von AGEs zu strukturellen Veränderungen der Bestandteile des UPS kommen, was mit Funktionseinbußen des Proteasoms einhergeht [208].

1.4.3.3 Das Aggresom

In einem Diabetes-Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass es durch Hyperglykämie insbesondere in β -Zellen zur Bildung von Aggresomen aus ubiquitinierten Proteinen kommt [357]. Weiterhin führten hohe Glucosekonzentrationen *in vitro* neben einer Senkung der Proteasomaktivität auch zu Glykogen-haltigen Aggresom-ähnlichen Strukturen [358]. Bislang liegen kaum Studien zur Bedeutung von Aggresomen in *C. elegans* vor. Allerdings existieren zu den in Kap. 1.1.3 beschriebenen, an der Bildung und Elimination beteiligten Proteinen, homologe Gene im Genom der Nematoden. Hierzu zählen u.a. *dnc-1* (*dynactin complex component 1*), *sqst-1* (*sequestosome related 1*) sowie *ubql-1* (*ubiquilin 1*) [57, 359–361].

1.4.3.4 Autophagie in *C. elegans*

Hauptsächlich stammen die Erkenntnisse über die an der Autophagie beteiligten Gene aus Studien an *S. cerevisiae*, wobei zahlreiche Orthologe auch in Eukaryoten wie Säugetierzellen und in *C. elegans* entdeckt wurden [362]. Durch den Einsatz von transgenen Stämmen, die Fusionsproteine mit GFP exprimieren, ermöglicht der transparente Körper von *C. elegans* insbesondere die Untersuchung der Makroautophagie mit fluoreszenzoptischen Methoden [363]. Demnach gilt das autophagosomale Protein LGG-1 (*LC3, GABARAP and GATE-16 family*), das homolog zu Atg8/LC3 ist, als einer der beliebtesten Autophagie-Marker in den Nematoden [128, 362, 364, 365]. Eine Depletion von LGG-1 oder BEC-1 (*beclin (human autophagy) homolog 1*), einem Ortholog zu Atg6/Vps30/Beclin1, das für die Bildung von Autophagosomen benötigt wird, führt zur Sterilität und Letalität schon während der Entwicklung der Nematoden [314, 364, 366]. Auch resultiert das Fehlen von BEC-1 in den Neuronen von *C. elegans* in einer erhöhten Akkumulation von toxischen Proteinaggregaten [362]. Hauptsächlich wird die Autophagie neben AMPK auch durch die Kinase TOR reguliert, die in *C. elegans* durch das Gen *let-363* kodiert wird [362, 367]. Bei fehlender LET-363/TOR-Aktivität arretieren die Nematoden in der Dauer-Phase, wobei ein Knockdown zu einer Verlängerung der Lebensspanne und einer verstärkten Autophagie führt [362, 367]. Weiterhin werden während der Entwicklung der Nematoden die paternalen Mitochondrien durch Autophagosomen eliminiert [364]. Festzustellen ist, dass Autophagie in *C. elegans* bei der Elimination von toxischen Proteinaggregaten oder bei der Beeinflussung der Entwicklung sowie der Lebensspanne eine wesentliche Rolle spielt [362]. Da der Abbau von

Mitochondrien durch Autophagosomen nicht nur bei der Entwicklung der Nematoden, sondern auch unter Stressbedingungen wichtig ist [364], wird im Folgenden die Mitophagie näher vorgestellt.

1.4.3.5 Mitophagie in *C. elegans*

C. elegans weist auch für die Mitophagie-relevanten Gene Homologe auf. Demnach zeigen Wildtyp-Nematoden eine altersbedingte Akkumulation von Mitochondrien, die auch bei altersbedingten humanen Erkrankungen vorkommt [368]. Wie bereits beschrieben (Kap. 1.1.5) kann auch die Mitophagie in *C. elegans* hauptsächlich in zwei Gruppen eingeteilt werden [162, 369]. Beispielsweise stellt DCT-1 (*DAF-16/FOXO Controlled, germline Tumour affecting-1*) in *C. elegans* das Homolog zu den Mitophagie-Rezeptoren BNIP3 bzw. BNIP3L/NIX in Säugetierzellen dar und verlängert als Schlüsselmediator der Mitophagie unter Stressbedingungen die Lebensspanne [163]. Die Expression von *dct-1* wird teilweise durch den Transkriptionsfaktor DAF-16 kontrolliert, der durch eine verminderte Aktivierung des Insulin/IGF-1-Signalweges induziert wird und auch zur Auslösung von Mitophagie dient [368]. Weiterhin interagiert DCT-1 in *C. elegans* mit LGG-1, dem Homolog zu Atg8/LC3, und beeinflusst auch in den Würmern die Rezeptor-vermittelte Mitophagie [162]. Neben DAF-16 ist an der Expression von DCT-1 auch SKN-1 (*skinhead 1*) beteiligt, was ein Homolog zu Nrf2 (*nuclear factor (erythroid-derived 2)-related factor*) darstellt und bei oxidativem Stress, der u.a. durch geschädigte Mitochondrien entsteht, aktiviert wird [365, 368]. Im Gegensatz dazu spielen in *C. elegans* die *glb* (*globin related*) bzw. die Globine bei einem Knockdown von Frataxin, einem Regulator der Eisen-Schwefel-Cluster-Biogenese und der Atmungskette, bei der Induktion der Mitophagie eine wichtige Rolle [370].

Die Elimination der Mitochondrien wird in Abwesenheit der ubiquitär vorkommenden Kinase PINK-1 (*PINK (PTEN-induced kinase) homolog*) und des Homologs zu Parkin, PDR-1 (*Parkinson's disease related*), verhindert [162, 371]. Im Gegensatz dazu bewirkt ein reduziertes Membranpotential die Akkumulation von PINK-1 an der Mitochondrienaußenmembran, wodurch die Mitophagie ausgelöst wird [372]. Daneben besitzt *C. elegans* weitere für die Dynamik bzw. die Fusion der Mitochondrien relevante Gene, wie z.B. die Dynamin-ähnlichen GTPasen FZO-1 (*FZO (Fzo mitochondrial fusion protein related)*) oder EAT-3 (*eating: abnormal pharyngeal pumping*), die ortholog zu Mfn1/2 bzw. OPA1 sind und die Fusion der äußeren bzw. inneren Mitochondrienmembran steuern [373]. EAT-3-Mutanten zeigen eine verminderte pharyngeale Pumprate, was zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme bzw. zu einer geringeren Körpergröße und -masse im Vergleich zu den Wildtyp-Würmern führt [374]. Bei der Stress-induzierten Mitophagie in den Nematoden hingegen spielen Fissionsproteine wie DRP-1 (*dynamamin-related protein*) eine

wichtige Rolle, wobei der Knockdown von FIS-1 (*S. cerevisiae FIS1-related*) die korrekte Elimination von geschädigten Mitochondrien beeinträchtigt [375]. Demnach sind sowohl die Fusions- als auch die Fissionsproteine, *fzo-1*, *eat-3* und *drp-1*, an der Entfernung von geschädigter mtDNA in *C. elegans* beteiligt [376].

2 Zielsetzung

Die durchschnittliche Lebenserwartung der Menschen nimmt weltweit zu. Dies führt gleichzeitig zu einem Anstieg von altersbedingten neurodegenerativen oder metabolischen Gesundheitsstörungen, wie z.B. Morbus Alzheimer, Parkinson oder Diabetes mellitus. Eine Gemeinsamkeit von altersbedingten Erkrankungen ist u.a. eine Störung des Proteostase-Netzwerkes, das aus verschiedenen Mechanismen besteht, die zur Elimination von falsch gefalteten Proteinen dienen. Bei Diabetes mellitus scheint die Störung der Proteostase unmittelbar durch die erhöhte Blutglucosekonzentration verursacht zu sein, die beispielsweise zur Bildung von AGEs führt. In der *mev-1*-Mutante des Modellorganismus *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass das pflanzliche Polyphenol Quercetin in der Lage ist, über die Aktivierung des Proteasoms die durch Glucose verursachte Verkürzung der Überlebenszeit zu verhindern.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des Aggresoms als potentielle Zielstruktur von Quercetin bezüglich protektiver Wirkungen unter glucotoxischen Bedingungen untersucht. Das Aggresom stellt einen wichtigen Bestandteil der Proteostase dar und wird durch die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen gebildet. Zunächst sollte die Bedeutung Aggresom-relevanter Gene (*dnc-1*, *sqst-1*, *ubql-1*) für die Überlebenszeit von *mev-1* nach der 48-stündigen Inkubation mit 10 mM Glucose in An- und Abwesenheit von 1 μ M Quercetin bei 37 °C analysiert werden. Von Interesse für die vorliegende Arbeit waren ebenso mögliche Interaktionen zwischen dem Aggresom und den weiteren Bestandteilen des Proteostase-Netzwerkes, der UPR^{ER}, dem UPS und insbesondere der Mitophagie. Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der ER-Aktivität in Abhängigkeit von Aggresom-relevanten Genen wurde der transgene *C. elegans*-Stamm SJ4005xTK22 (*hsp-4p::gfp*) verwendet. Des Weiteren erfolgte in *mev-1* die Analyse der Proteasomaktivität nach dem Knockdown von *dnc-1*, *sqst-1* sowie *ubql-1* und der Inkubation der Nematoden mit Glucose in An- bzw. Abwesenheit von Quercetin. Daneben ermöglichte die Analyse der Proteinaggregation nicht nur die Bedeutung der Aggresom-relevanten Gene für die Bildung von Aggresomen, sondern auch den Einfluss von Glucose und Quercetin auf diesen Prozess zu erkennen. Mittels des transgenen Stammes BC12921 (*sqst-1::gfp*) konnte die SQST-1-Menge in Autophagosomen und in Verbindung mit der Quantifizierung von Lysosomen der autophagosomale Proteinabbau bestimmt werden. Die Bedeutung der Mitophagie-relevanten Gene *dct-1*, *glb-1*, *pdr-1*, *pgam-5*, *pink-1* sowie *eat-3*, *fzo-1* (Fusion), *drp-1* und *fis-1* (Fission) für die Autophagie-Aktivität wurde durch RNAi ermittelt.

3 Methoden

Sämtliche Nematoden- und Bakterienstämme, sowie Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, sind in Kap. 9 (Appendix) mit Angabe des Herstellers und der Artikelnummer aufgelistet. Daneben ist dort auch die Zusammensetzung der selbst hergestellten Lösungen und Puffer tabellarisch angegeben.

3.1 Kultivierung von *C. elegans*

Kultiviert wurde jeder *C. elegans*-Stamm auf *Nematode Growth Medium* (NGM)-Agarplatten (Tabelle 9.34), die mit *E. coli* OP50 (Tabelle 9.2) als Nahrungsquelle ausgestrichen waren. Zur Verhinderung des Verhungerns der Nematoden wurden sie regelmäßig auf neue Platten mit frischer *E. coli* OP50-Schicht überführt. Wenn der *E. coli* OP50-Rasen fast abgefressen bzw. aufgebraucht war und sich die Würmer an einer Stelle der Agarplatte sammelten, wurden die Würmer auf neue Platten mit *E. coli* transferiert. Hierfür diente unter sterilen Bedingungen ein ausgeglühtes und abgekühltes Skalpell, mit dem ein Stück des mit Nematoden bewachsenen Agars kopfüber auf eine neue NGM-Agarplatte transferiert wurde. Bei 20 °C fand die Lagerung der mit Nematoden besetzten NGM-Agarplatten und somit die Kultivierung von *C. elegans* statt.

3.1.1 Herstellung von NGM-Agarplatten

Wie der NGM-Agar hergestellt wurde, ist der Tabelle 9.34 zu entnehmen. Nach dem Autoklavieren kam es zum Abkühlen der Lösung auf 60 °C im Wasserbad (Tabelle 9.5). Anschließend wurden vom flüssigen Agar jeweils ca. 20 ml unter sterilen Bedingungen in Petrischalen mit 9,2 cm Durchmesser gegossen und getrocknet. Die Lagerung der NGM-Agarplatten erfolgte bei Raumtemperatur. Für die Kultivierung von *C. elegans* wurden diese nach dem Aushärten des Agars, unter sterilen Bedingungen mit *E. coli* OP50-Bakterien ausgestrichen. Hierfür waren für eine NGM-Agarplatte 600 µl einer aufkonzentrierten *E. coli* OP50-Tageskultur nötig. Nach dem Trocknen konnten die NGM-Agarplatten direkt zum Transferieren von Würmern verwendet werden. Auch die Lagerung von NGM-Agarplatten mit einem *E. coli* OP50-Rasen fand bei Raumtemperatur statt, bei der sie maximal 7 Tage haltbar waren.

3.1.2 Herstellung der *E. coli* OP50 Kultur

Durchgeführt wurden alle Schritte zur Herstellung von *E. coli* OP50-Kulturen unter sterilen Bedingungen. Bei OP50 handelt es sich um einen Uracil-auxotrophen *E. coli*-Stamm, dessen Überwucherung durch die gezielte Gabe von Uracil verhindert werden kann, wodurch die Beobachtung sowie die Paarung der Nematoden erleichtert werden [377]. Bezogen wurde er vom *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC, University of Minnesota, St. Paul, USA). Zu Beginn der Kultivierung wurden die aus den Glycerin-Kulturen der Stammsammlung gewonnenen *E. coli*-Bakterien auf 2x YT-Agarplatten (Tabelle 9.32) nach dem „Drei-Ausstrich-Prinzip“ ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 3 ml 2x YT-Medium (Tabelle 9.33) mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft, woraufhin die Übernacht-Inkubation auf einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 300 rpm erfolgte. Für die Herstellung der Tageskultur wurden am nächsten Morgen 200 ml 2x YT-Medium mit 500 µl der Übernachtkultur versetzt und auf einem Schüttelinkubator erneut bei 37 °C bzw. 300 rpm für 6-8 h inkubiert. Nach der sechsständigen Inkubation fand die fünfminütige Zentrifugation der Tageskultur bei 5100 x g statt, nachdem sie in 4 x 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt wurde. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Bakterienpellets wurden in je 5 ml 2x YT-Medium resuspendiert. Bei 4 °C und maximal für sieben Tage konnte die aufkonzentrierte Tageskultur gelagert werden.

Damit die *E. coli*-Bakterien für längere Zeit bei -80 °C lagerfähig waren, wurden die Glycerin-Kulturen unter sterilen Bedingungen aus 800 µl Übernachtkultur und 200 µl Glycerin (Tabelle 9.6) hergestellt.

3.1.3 Synchronisation von *C. elegans*

Zur Erlangung von alterssynchronen Nematoden wurde unter sterilen Bedingungen eine sogenannte „egg preparation“ (*EggPrep*) durchgeführt und so eine Population von L1-Larven gewonnen. Je nach Wurmstamm kam es für die Synchronisation von *C. elegans* zum Einsatz von vier bis sechs dicht mit *C. elegans* bewachsenen NGM-Agarplatten.

Begonnen wurde damit, dass die Nematoden mittels M9-Puffer (Tabelle 9.12) und einer Glaspasteurpipette von den NGM-Agarplatten in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt wurden, woraufhin drei Zentrifugationsschritte folgten. Dieses mehrmalige Waschen führte u.a. zur Entfernung von Bakterien und bereits geschlüpfter Larven. Am Ende der dritten Zentrifugation wurde der Überstand mithilfe einer Vakuumpumpe bis auf 3,5 ml abgenommen und 1,5 ml Bleichlösung (Tabelle 9.8) hinzugegeben. Daraufhin wurde bis zum Aufbrechen der Kutikula der Würmer kräftig geschüttelt, um die Eier der adulten Nematoden freizusetzen. Hierbei war zu beachten, dass die Inkubation mit der Bleichlösung nicht länger

als 6 min dauerte, da sonst die Eier beschädigt werden konnten. So kam es nach dem Auffüllen des Zentrifugenröhrchens mit M9-Puffer zur zweiminütigen Zentrifugation bei 2800 x g. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt, wobei im Anschluss an die dritte Zentrifugation der Überstand auf 0,1 ml abgesaugt und das Zentrifugenröhrchen mit 10 ml M9-Puffer aufgefüllt wurde. Auch erfolgte die Zugabe von Cholesterol (Tabelle 9.7), dessen Fehlen zu Wachstumsstörungen führt [378], im Verhältnis 1:1000. Die Übernacht-Inkubation des Zentrifugenröhrchens bei 25 rpm und 20 °C sollte das Schlüpfen der Larven fördern. Am nächsten Tag wurden die synchronisierten L1-Larven zweimal bei 1200 x g für 2 min zentrifugiert und nach dem Absaugen des Überstandes mikroskopisch untersucht. Hierbei war das Ziel, die Konzentration der Nematodensuspension (gegebenenfalls mit M9-Puffer) auf 10-15 Würmer pro 10 µl Suspension einzustellen.

3.1.4 Kultivierung der synchronisierten Nematoden in NGM-Flüssigmedium

Zur Kultivierung von synchronisierten L1-Würmern diente ein NGM-Flüssigmedium (Tabelle 9.35) mit *E. coli*-OP50-Bakterien als Nahrungsquelle. Zunächst wurde die optische Dichte (OD_{600}) der mikrobiellen Lösung auf 1 eingestellt, die einer optimalen Bakterienkonzentration entsprach. Die Zentrifugation der hierfür berechneten Menge erfolgte für 5 min bei 5100 x g. Nach der Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml NGM resuspendiert und gevortext. Für einfache Versuchsansätze reichten 96-*well*-Mikrotiterplatten aus. Deren Vertiefungen wurden pro Gruppe mit jeweils 10 µl Larven sowie mit 44 µl bzw. 46 µl NGM-OP50-Gemisch bestückt. Als Evaporationsschutz dienten die mit jeweils 100 µl bidest. H₂O gefüllten äußeren *wells*. Große Versuchsansätze hingegen, die für die Gewinnung von Proteinen nötig waren, erforderten das zehnfache Volumen pro *well* in mindestens drei 24-*well*-Mikrotiterplatten pro Behandlungsgruppe. Bei 20 °C und 150 rpm erfolgte die lichtgeschützte Inkubation zunächst bis zum Erreichen des jung-adulten Stadiums der Würmer.

3.1.5 Einfrieren von *C. elegans*

Zum Einfrieren wurden die L1- und L2-Larven mit dem Einfrierpuffer A (Tabelle 9.9) und dem Einfrierpuffer B (Tabelle 9.10), der noch zusätzlich 30 % Glycerin enthielt, im gleichen Verhältnis, von NGM-Agarplatten heruntergewaschen. Anschließend erfolgte das Überführen der Nematoden in Isopropanol-*Freezing*-Behälter, um ein langsames Herunterkühlen der Würmer (1 °C/min) zu gewährleisten. Die Würmer konnten so bei -80 °C aufbewahrt werden. Je nach Bedarf wurden die Nematoden bei Raumtemperatur aufgetaut.

3.2 Inkubation von *C. elegans* mit den Effektoren Glucose und Quercetin

Ab dem Erreichen des jung-adulten Stadiums erfolgte die Inkubation der Nematoden mit den zu testenden Effektoren Glucose und Quercetin. Hierfür wurde zunächst die bei -20 °C gelagerte 10 µM Quercetin-Arbeitslösung (Tabelle 9.7) auf Raumtemperatur gebracht. In dieser Zeit kam es zur Herstellung der Glucose-Stamm- und der Arbeitslösung (100 mM), die aufgrund der Gefahr von Kontaminationen für jeden Versuch frisch angesetzt werden mussten. Zur Kontrolle dienten die Lösungsmittel der jeweiligen Effektoren. So ergaben sich je nach Experiment folgende Gruppen: eine Kontroll-, Glucose- sowie eine Glucose/Quercetin-Gruppe. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaft des eingesetzten Polyphenols, wurde eine Arbeitslösung mit Ethanol-Tween®20 (Tabelle 9.11) verwendet. Das Auftragen der Effektoren erfolgte so, dass die zehnfach konzentrierten Arbeitslösungen im *well* einer 1:10-Verdünnung unterlagen. Der 48-stündigen Inkubation bei 20 °C und 150 rpm folgten zwei Waschschrte vor den jeweiligen Messungen. Hierfür wurden die Würmer aus den Mikrotiterplatten in 15 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit M9-Tween®20 (Tabelle 9.13) gewaschen, um fettlösliche, unerwünschte Bestandteile oder auch Larven, Bakterien oder Effektoren zu entfernen.

3.3 RNA-Interferenz in *C. elegans*

1998 wurde die Methode der RNA Interferenz (RNAi) erstmals durch Andrew Fire und sein Team am Tiermodell *C. elegans* entdeckt [379]. Hierbei kommt es durch das Einführen von doppelsträngiger RNA (dsRNA) zur verminderten Expression spezifischer Gene [379, 380]. So findet durch den Abbau von endogener mRNA, die homolog zu einem Strang der dsRNA ist, die Nachahmung einer *loss-of-function-mutation* des Zielgens statt [278]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fütterungsmethode verwendet [381]. Die Verfütterung der dsRNA erfolgte über *E.coli*-Bakterien des Stammes HT115 (DE3) (Tabelle 9.2), die aufgrund der RNaseIII-Defizienz dsRNA-Moleküle nicht abbauen können [382]. In diese Mikroorganismen erfolgte die Transformation des sogenannten *feeding vector* L4440 (Tabelle 9.40) [278, 380]. Dieser Vektor kodiert für eine Ampicillin-Resistenz und enthält einen Teil eines *C. elegans*-Gens, das zwischen zwei entgegengesetzten T7-Promotorsequenzen kloniert wurde [278, 383]. Die Induktion der T7-Promotoren erfolgt durch Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (Tabelle 9.6), was zur Synthese der in HT115 inklonierten T7-Polymerase führt [278, 383]. Diese bewirkt die Bildung der dsRNA, von der ein Strang komplementär zur mRNA des entsprechenden *C. elegans*-Gens ist [278, 384]. Im ersten Schritt der RNAi wird die dsRNA durch das Enzym Dicer, eine Endoribonuklease der RNaseIII-Familie, unter ATP-Verbrauch

prozessiert (Abbildung 3.1). Hierbei entstehen Fragmente aus ungefähr 22 Nukleotiden, die als *short interfering RNA* (siRNA)-Duplices bezeichnet werden [383, 385, 386]. Diese tragen am 3'-Ende einen Dinukleotid-Überhang, wobei das 5'-Ende aus einem Monophosphat-Molekül besteht [384].

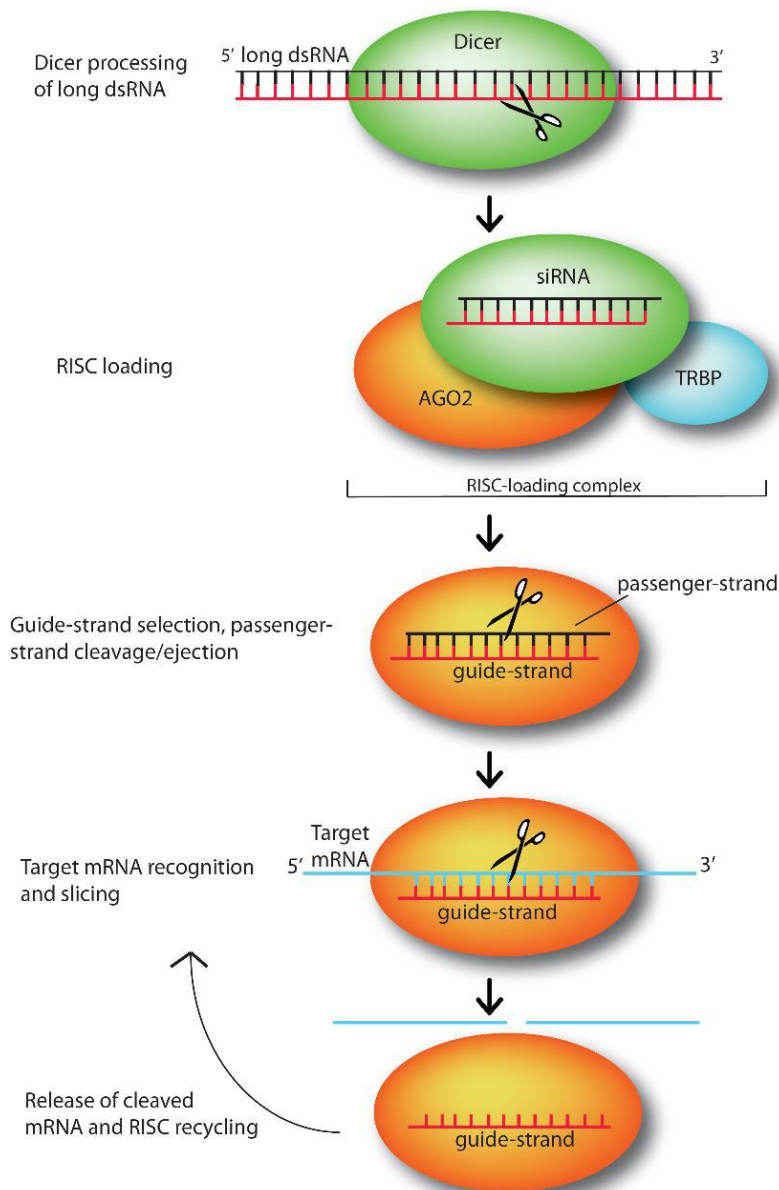


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der RNA-Interferenz

Ago2: Argonauten-Protein 2, dsRNA: *double-stranded RNA*, RISC: *RNA-induced silencing complex*, mRNA: *messenger RNA*, siRNA: *short interfering RNA*, TRBP: *the human immunodeficiency transactivating response RNA-binding protein* [384].

Weiterhin wird siRNA mittels Hsp90 auf ein Protein aus der Argonauten (Ago)-Familie, genauer Ago2, überführt, das zusammen mit Dicer und dem RNA-bindenden Protein TRBP (*the human immunodeficiency transactivating response RNA-binding protein*) den RNA-induced silencing complex loading complex (RISC-loading complex) bildet (Abbildung 3.1) [384, 387, 388]. Hier findet auch die Entwindung durch die RNA-Helikase statt, wodurch unter ATP-Verbrauch zwei Einzelstränge (*single-stranded* RNA, ssRNA), ein *guide* Strand und ein *passenger* Strand entstehen [389]. Das weniger stabile 5'-Ende des *guide* Strangs (auch bekannt als *antisense* oder Leitstrang) bleibt an RISC gebunden [389–391]. Erst durch die Dissoziation des siRNA-Strangs bzw. den Abbau des *passenger* (*sense*) Strangs entsteht der aktive RISC-Komplex [391, 392]. Hierbei stellt das katalytische Zentrum des RISC-Komplexes Ago2 dar [393] und führt die Degradation des *passenger* Strangs mit seiner Endonuklease-Aktivität durch (Abbildung 3.1) [392, 394, 395]. Diese Eigenschaft ist letztendlich für den Abbau der Ziel-mRNA (*slicing*) verantwortlich, die durch komplementäre Basenpaarung an den Leitstrang der siRNA gebunden ist [396–398].

Zur Umsetzung der obigen Mechanismen in die Praxis wurden zunächst RNAi-Bakterien ausgestrichen, was die Herstellung von Übernachtskulturen ermöglichte. Unter sterilen Bedingungen erfolgte das Ausstreichen von Bakterien aus den Glycerin-Kulturen der Stammsammlung auf 2x YT-Agarplatten mit Ampicillin [100 µg/ml] und Tetrazyklin [25 mg/ml] (Tabelle 9.6) nach dem „Drei-Ausstrich-Prinzip“. Inkubiert wurden die 2x YT-Agarplatten über Nacht bei 37 °C. Ab dem nächsten Morgen waren die Bakterien bei 4 °C für ca. vier Wochen lagerfähig. Für die Herstellung einer Übernachtskultur wurden 3 ml 2x YT-Medium mit Ampicillin [100 µg/ml] sowie einer einzelnen Bakterien-Kolonie versetzt und über Nacht bei 37 °C und 300 rpm auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag fand unter sterilen Bedingungen erneut die Herstellung der Tageskultur statt, die aus 4 ml 2x YT-Medium, 4 µl Ampicillin (Tabelle 9.7) und 400 µl der jeweiligen Übernachtskultur bestand. Zur Induktion der dsRNA wurden noch 4 µl einer 1 M IPTG-Lösung (Tabelle 9.7) hinzugefügt. Im Anschluss an die vierstündige Inkubation bei 37 °C und 300 rpm auf dem Schüttelinkubator wurde 1 ml der Tageskultur zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands erfolgte das Resuspendieren des Pellets in 500 µl NGM mit Kanamycin [25 µg/ml] (Tabelle 9.7), was bakterielle Kontaminationen verhindern sollte. Zur Sicherstellung, dass der OD₆₀₀-Wert der NGM-Bakteriensuspension bei 1 lag, fand die photometrische Messung der Bakterienkonzentration und gegebenenfalls die Verdünnung mit NGM statt. Als Kontrolle für die RNAi-Experimente der vorliegenden Arbeit diente der *E. coli*-Stamm HT115 mit leerem L4440-Vektor [380]. Für Doppel-RNAi-Versuche wurden die jeweiligen NGM-Bakteriensuspensionen im entsprechenden Verhältnis vor dem Versuchsansatz gemischt. Um bei Doppel-RNAi-Experimenten die Effekte mit denjenigen der einzelnen RNAi vergleichen zu

können, wurden die Einzel-RNAis mit der Vektor-Kontrolle 1:2 verdünnt. Der Tabelle 9.3 sind alle RNAi-Klone zu entnehmen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

3.4 Bestimmung der Hitzestress-Resistenz

Zur Ermittlung der Überlebenszeit von *C. elegans* unter Hitzestress wurden die Nematoden zunächst mit M9-Tween®20 am Stereomikroskop mithilfe einer Kaltlichtquelle vereinzelt, indem sie zuerst mithilfe einer Glaspasteurpipette aus den Zentrifugenröhrchen in ein Glasschälchen pipettiert und dann in eine 384-well-Mikrotiterlatte überführt wurden. Deren Vertiefungen waren mit jeweils 6,5 µl M9-Tween®20-Puffer (Tabelle 9.13) bestückt. In ein well wurde stets ein adulter Nematode mit einem Volumen von 1 µl pipettiert. Zusätzlich kam es zur Zugabe von 7,5 µl einer mit M9-Tween®20 verdünnten sowie bei jedem Versuch frisch hergestellten SYTOX®-Green-Arbeitslösung (2 µM) (Tabelle 9.7). Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff, der die Membran toter Zellen durchdringt und danach mit der DNA interkaliert und fluoresziert [399, 400]. Die Bestimmung der Emission bei 538 nm nach Anregung bei 485 nm ermöglicht so die Ermittlung des individuellen Todeszeitpunktes [399]. Den finalen Schritt der Vorbereitung der Mikrotiterplatte bildete der Verschluss mit einer Selbstklebefolie und einem Deckel zum Schutz vor Evaporation. Schließlich wurde der Versuch in einem Fluoroskan Ascent FL Fluorometer (Tabelle 9.5) vollzogen, bei dem es alle 30 min über einen Zeitraum von 16 h zur Messung der Lebensspanne der einzelnen Würmer kam. Ausgewertet wurde der Versuch mit Graphpad Prism 5.0 (Tabelle 9.41). Diese Software ermöglichte die graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität zu verschiedenen Messzeitpunkten. Die Ermittlung der Lebensspanne unter Hitzestress-Bedingungen erfolgte durch die optische Analyse der Überlebenskurve für jeden einzelnen Nematoden. Hierbei wurde die Zeit, die 1 h über der Basisfluoreszenz lag, als Todeszeitpunkt festgelegt (Abbildung 3.2). Die abgelesenen Werte dienten sowohl zur Erstellung von Kaplan-Meier-Kurven als auch für die statistische Auswertung mit dem Mantel-Haenszel Logrank-Test.

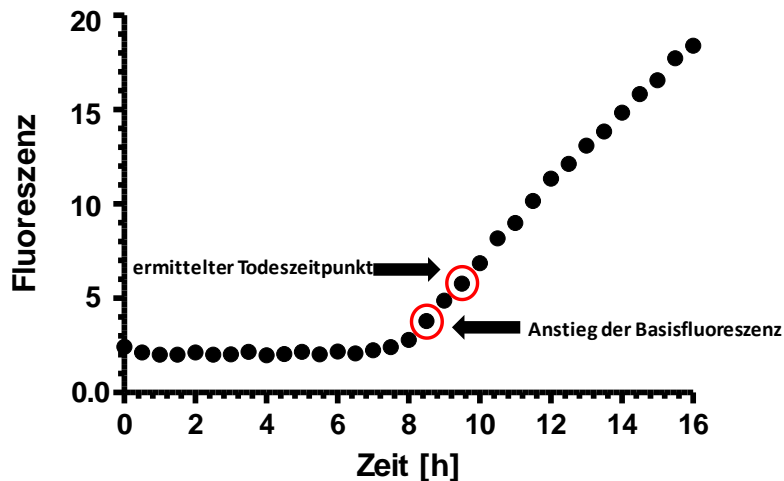


Abbildung 3.2 Typischer Verlauf der Fluoreszenz unter Hitzestress-Bedingungen

Zur Bestimmung des Todeszeitpunkts, der zur Erstellung einer Überlebenskurve dient, wird zu dem Zeitpunkt des Anstiegs der Basisfluoreszenz 1 h addiert.

3.5 Fluoreszenzmikroskopie

3.5.1 Expressionsanalyse mit GFP-Reportergenen

Ziel der Fluoreszenzmikroskopie war in der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von Aggresom-relevanten Genen (*dnc-1*, *sqst-1* und *ubq1-1*) auf die UPR^{ER} in *C. elegans* zu ermitteln. Wie bereits erwähnt (Kap. 1.4.3.1), wird die UPR^{ER} durch den Anstieg von falsch gefalteten Proteinen aktiviert und führt zu ER-Stress [401]. Dieser löst die Transkription des *hsp-4*-Gens aus, was sich dementsprechend zur Analyse der UPR^{ER}-Aktivität gut eignet [401, 402]. Zur Untersuchung der *hsp-4*-Expression diente der transgene Stamm SJ4005 (Genotyp (Genotyp *zcls4 [hsp-4p::gfp] V*), der mit dem Wurmstamm TK22 (Genotyp *mev-1 (kn1)*) gekreuzt wurde (Tabelle 9.1) [256, 403, 404]. Hierbei ist hinter dem Promotor des Zielgens (*hsp-4*) ein Gen geschaltet, das für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) kodiert. Bei GFP handelt es sich um ein Fluoreszenzprotein, das von Shimomura *et al.* entdeckt wurde [405]. Es stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und absorbiert blaues Licht bei 470 nm und emittiert grünes Licht bei 509 nm [406]. Begonnen wurde mit dem zweimaligen Waschen der Nematoden mit M9-Tween@20, was die Entfernung von Larven oder unerwünschten Schmutzpartikeln gewährleisten und somit das Mikroskopieren erleichtern sollte. Daraufhin wurden die 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit Alufolien umwickelt, um das Fluoreszenzprotein vor Licht zu schützen. Zur Betäubung der Nematoden diente eine 2 mM Levamisol-Lösung (Tabelle 9.15) (Verhältnis 1:2,5). Nach einer zehnmütigen Inkubation wurden 35 µl der Nematodensuspension auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas fixiert. Schließlich erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse der GFP-Expression mit dem digitalen Fluoreszenzmikroskop AMG EVOS fl Color (Tabelle 9.5) bei 100-facher

Vergrößerung. Innerhalb der Detektionsbereiche 470 ± 22 nm (Exzitation) und 525 ± 50 nm (Emission) bzw. unter Verwendung des EVOS LED Light Cube GFP wurden mindestens 20 Würmer pro Versuchsgruppe fotografiert.

3.5.2 Untersuchung der Autophagie in *C. elegans*

Zur Untersuchung der Autophagie in *C. elegans* diente der BC12921-Stamm (Tabelle 9.1), der das Transgen *sqst-1::gfp* trägt. Hier ist das GFP-kodierende Gen (Reporter-gen) mit dem Promotor des zu untersuchenden Gens (*sqst-1*) fusioniert. Bei einer hohen Autophagie-Aktivität wird SQST-1::GFP vermehrt durch Autophagosomen abgebaut, was zu einer verminderten Fluoreszenzaktivität führt [361, 407–409]. Neben Aggresom-relevanten Genen (*dnc-1*, *sqst-1* und *ubql-1*) wurden auch Mitophagie-relevante Gene (*dct-1*, *drp-1*, *eat-3*, *fis-1*, *fzo-1*, *glb-1*, *pdr-1*, *pgam-5* und *pink-1*) mithilfe der RNAi-Methode inhibiert und der Einfluss dieser Gene auf die Autophagie-Aktivität untersucht. Hierfür wurden die Nematoden zweimal mit M9-Tween®20-Puffer gewaschen und mit 2 mM Levamisol anästhesiert. Die Analyse der GFP-Fluoreszenz erfolgte erneut mit dem digitalen Fluoreszenzmikroskop. Mithilfe des EVOS LED Light Cube RFP wurden innerhalb der Detektionsbereiche 531 ± 40 nm (Exzitation) und 593 ± 40 nm (Emission) bei 100-facher Vergrößerung mindestens 20 Nematoden pro Behandlungsgruppe fotografisch festgehalten.

3.5.3 Quantifizierung von Lysosomen mit LysoTracker® Red

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lysosomenbildung in *C. elegans* erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker® Red DND-99 (Tabelle 9.6). Nach der Aufnahme in die Lysosomen wird der hydrophobe Farbstoff aufgrund des sauren pH-Wertes dieser Organellen protoniert und akkumuliert dort, was die spezifische Anfärbung und Quantifizierung von Lysosomen ermöglicht [410]. Hierfür wurden die sich im jung-adulten Stadium befindenden Nematoden mit der 20 μ M LysoTracker® Red-Arbeitslösung, die mit M9-Tween®20 aus der LysoTracker® Red-Stammlösung (Tabelle 9.7) hergestellt wurde, für 48 h unter lichtgeschützten Bedingungen inkubiert. Daraufhin folgten zwei Waschschriffe mit M9-Tween®20. Damit die Würmer den Fluoreszenzfarbstoff aus dem Darm ausscheiden konnten, kam es zu einer einstündigen Inkubation im Dunkeln auf NGM-Agarplatten mit *E. coli* OP50-Bakterien. Danach wurden die Nematoden wieder unter denselben Bedingungen gewaschen und mit 2 mM Levamisol betäubt. Erneut fand die Detektion der Fluoreszenz mit dem digitalen Fluoreszenzmikroskop AMG EVOS fl Color statt. Mittels EVOS LED Light Cube RFP wurde nach Anregung bei 531 ± 40 nm (Exzitation) die Emission

bei 593 ± 40 nm bestimmt, wobei erneut bei 100-facher Vergrößerung mindestens 20 Nematoden pro Behandlungsgruppe fotografiert wurden.

3.5.4 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrien mit MitoTracker® Red CM-H₂XRos

Bei MitoTracker® Red CM-H₂XRos (Tabelle 9.6) handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der in Mitochondrien akkumuliert und nach Oxidation durch ROS fluoresziert [410, 411]. Während das Anregungsmaximum von CM-H₂XRos bei 579 nm liegt, weist der Fluoreszenzfarbstoff ein Emissionsmaximum bei 599 nm auf [411]. Für die Analyse der mitochondrialen ROS-Produktion diente der EVOS® LED Light Cube RFP zur Anregung bei 531 ± 40 nm (Exzitation) und Messung der Emission bei 593 ± 40 nm.

Für die Durchführung des Experiments wurde eine 300 µM Stammlösung des bereits erwähnten Farbstoffs (Tabelle 9.7) in DMSO (Dimethylsulfoxid) (Tabelle 9.6) angesetzt, woraufhin die Herstellung einer 5 µM Arbeitslösung mit M9-Puffer erfolgte. Diese wurde im jung-adulten Stadium zu den Nematoden hinzugegeben und lag in der Plattenvertiefung aufgrund der 1:10-Verdünnung in einer Endkonzentration von 0,5 µM vor. Am Ende der 48-stündigen Inkubation fand nach dem Waschen der Würmer und der Zugabe von 2 mM Levamisol (Kap. 3.5.1) die Untersuchung der mitochondrialen ROS-Produktion mithilfe des Fluoreszenzmikroskops statt. Pro Versuchsgruppe wurden wieder mindestens 20 Bilder erstellt.

3.5.5 Auswertung der Fluoreszenz

Die Quantifizierung der Fluoreszenz-Experimente erfolgte mithilfe der Software ImageJ, mit der die Bilder der Nematoden in separate 8-Bit-Graustufenbilder getrennt wurden. Je nach Reportergen diente entweder der grüne (GFP) oder der rote Farbkanal (RFP) zur quantitativen Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Daten. Zunächst wurde der untere Grenzwert so eingestellt, dass die Pixel des Nematoden eingeschlossen waren, wobei die Hintergrundfluoreszenz so gering wie möglich gehalten wurde. So wurde aus den ausgewählten Pixeln für jeden Wurm die integrierte Dichte als Maß für die Fluoreszenzintensität erfasst. Im Gegensatz zu den anderen Fluoreszenzmikroskopie-Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde für die Untersuchung der Autophagie-Aktivität nur der Kopf eines Nematoden bis zum terminalen Bulbus ohne weitere Bestandteile mit einer Ellipse ausgewählt und das Fluoreszenzsignal in dieser Ellipse gemessen.

Die ermittelten Werte wurden mit der Software GraphPad Prism 5 (Tabelle 9.41) mittels verschiedener Tests (ungepaarter t-Test bei zwei Behandlungsgruppen, ANOVA bei mehr als zwei Behandlungsgruppen) auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen geprüft und die Auswertung grafisch dargestellt.

3.6 Biochemische Methoden

3.6.1 Proteinextraktion

Durchgeführt wurde die Proteinextraktion von *C. elegans* mit dem Precellys 24-Dual Homogenisator (Tabelle 9.5). Wie in Kap. 3.1.4 beschrieben, wurden pro Behandlungsgruppe mindestens drei 24-well-Mikrotiterplatten pro Behandlungsgruppe mit dem zehnfachen Volumen an Nematodensuspension, NGM-RNAi-Lösung und den Effektoren bestückt. Nach 48-stündiger Inkubation jung-adulter Würmer mit Effektoren erfolgte das zweimalige Waschen mit M9-Puffer. Nach dem Entfernen des Überstands, kam es zur Zugabe von Wurm-Lysepuffer (Tabelle 9.25), dessen Volumen äquivalent zu dem des Pellets war. Um die Kutikula der Nematoden aufzubrechen und die Proteinextraktion zu fördern, fand die Inkubation der sich im Lysepuffer bzw. in 2 ml Precellys Schraubdeckelgefäß befindenden Nematoden bei -80 °C für mindestens 24 h statt. Während der eigentlichen Proteinextraktion sollten die Nematoden auf Eis gelagert werden, damit die Proteine vor einer Denaturierung geschützt waren. Für die Freisetzung der Proteine aus den Zellen erfolgte die Zugabe von 600 mg Precellys Keramikkügelchen (Tabelle 9.4) in das entsprechende Schraubdeckelgefäß. Die Homogenisierung fand im Precellys 24-Dual Homogenisator für zweimal 20 sec bei 6500 rpm mit 30 sec Pause statt. Direkt danach erfolgte die 20-minütige Zentrifugation des Homogenats bei 4 °C und 2000 rpm. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und konnte entweder direkt für weitere Experimente verwendet oder bis zur nächsten Verwendung bei -20 °C eingefroren werden. Wichtig war es bei späteren Analysen, die Proteine auf Eis aufzutauen und auch im Rahmen der Versuche stets kühl zu lagern.

3.6.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen dient der Bradford-Assay [412]. Ermöglicht wird die Messung durch den Einsatz des Farbstoffs Coomassie® Brilliant Blau G-250 (Tabelle 9.6). Dieser weist je nach pH-Gehalt unterschiedliche Farben auf [413]. Nach der Bindung an die zu untersuchenden Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum im

sauren Milieu von 465 nm nach 595 nm [412]. Somit entsteht aus der roten, kationischen Form je nach Proteingehalt eine blaue, anionische Verbindung [413]. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums wird photometrisch ermittelt und korreliert mit dem Proteingehalt der relevanten Proben.

Zur Messung der Proteinkonzentration wurden zunächst sogenannte Standardlösungen mit bovinem Serumalbumin (BSA) (Tabelle 9.6) und Wurm-Lysepuffer (Tabelle 9.25) hergestellt. Die Standardreihe bestand aus den BSA-Konzentrationen 0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml. So wurden zu 25 µl Standard je 975 µl H₂O gegeben. Von den Proteinproben wurden auch jeweils 25 µl entnommen und mit 975 µl bidest. H₂O versetzt. Nach Zugabe von 250 µl Bradford-Reagenz (Tabelle 9.6) wurden die Reaktionsgefäße vorsichtig geschüttelt.

Die Inkubationszeit betrug mindestens 10 min. Im Anschluss daran erfolgte die Messung der Absorption mittels Photometer (Tabelle 9.5) bei 595 nm. Mithilfe der Standards wurde anhand deren Extinktion eine Standardgerade erstellt. Die Detektion der Proteinkonzentrationen in den Wurmproben fand nach ihrer 1:10-Verdünnung mit bidest. H₂O und anhand der Standardgerade in Doppelbestimmung statt.

3.6.3 Analyse von polyubiquitinierten Proteinen

Zur Bestimmung von K48- und K63-verknüpften Polyubiquitinketten in *C. elegans* diente die Western-Blot-Methode. Nach Extraktion und Homogenisierung (Kap. 3.6.1) der Proteine wurden sie mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Des Weiteren ermöglichte der Semi-Dry-Blot den Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran. Auf der Membran fand die Detektion von polyubiquitinierten Proteinen und β-Aktin mithilfe spezifischer Antikörper statt. Auf einem Horizontalschüttler (Tabelle 9.5) erfolgten die unterschiedlichen Wasch- und Inkubationsschritte bei Raumtemperatur.

3.6.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in dem Elektrophorese Komplettsystem Mini Protean 3 Cell (Tabelle 9.5) fand zunächst die Denaturierung der einzusetzenden Proteine nach der Methode von Laemmli (1970) statt [414]. Hierfür wurden zwei 8,5 %ige Trenngele (Tabelle 3.1) vorbereitet und zwischen zwei Glasplatten gegossen, wobei je ein Gel zur Analyse einer

Ubiquitinierungsart diene. Die Polyacrylamidgele wurden mit je 150 µl 2-Methyl-1-Propanol überschichtet, um den Kontakt mit Sauerstoff zu verhindern.

Tabelle 3.1 Zusammensetzung der 8,5 %igen Trenngele

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

Nach der durch Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Tabelle 9.6) katalysierten Polymerisationsreaktion des Trenngels, wurde das 2-Methyl-1-Propanol (Tabelle 9.6) entfernt und ein 5 %iges Sammelgel (Tabelle 3.2) aufgegossen. Zuletzt wurde für die Bildung von Taschen noch vorsichtig ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt, bevor auch das Sammelgel polymerisierte.

Tabelle 3.2 Zusammensetzung der 5 %igen Sammelgele

Chemikalie	Menge
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1 ml
10 % SDS (w/v)	40 µl
30 % Acrylamidlösung	680 µl
bidest. H ₂ O	2,24 ml
10 % APS	40 µl
TEMED	2 µl

Am Ende der zweistündigen Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm herausgezogen. Anschließend wurden jeweils 30 µg der Proteine mit dem doppelten Volumen an dreifachkonzentriertem Lämmli-Puffer (Tabelle 9.16) für 15 min bei 55 °C auf einem Thermoschüttler bei 400 rpm inkubiert. Beginnend mit dem Molekulargewicht-Standard im Bereich von 43 bis 200 kDa (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*) (Tabelle 9.6) erfolgte das Pipettieren der denaturierten Proteine in die jeweiligen Taschen. Durchgeführt wurde die Elektrophorese bei 200 V für 45 min.

3.6.3.2 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE wurden sie mithilfe eines Semi-Dry-Blotters auf eine PVDF-Membran (Tabelle 9.4) elektrotransferiert. Zur Aktivierung der Membran diente eine Inkubation in Methanol (100 %) (Tabelle 9.6) für 1 min, wobei der nächste Schritt darin bestand, die Membran für 15 min in Blotpuffer nach Towbin zu legen (Tabelle 9.17). Die Kathode befand sich am Boden des Semi-Dry-Blotters (Tabelle 9.5) und die Anode im Deckel. Aufgebaut wurde ein Blot so, dass die Wanderung der Proteine von der Kathode zur Anode erfolgte [415]. Hierfür kam es zum Einsatz von sechs in Blotpuffer äquilibrierten Whatman-Papieren. So wurden drei Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei ausgerollt, die mit dem Trenngel, der Membran und drei weiteren Lagen Whatman-Papier überschichtet wurden. Bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² Membranfläche fand der Blot in einem Semi-Dry-Blotter statt und lief 45 min.

3.6.3.3 Ponceau S- und Coomassie-Färbung

Zum Nachweis des Elektrotransfers wurde im Anschluss noch eine Ponceau S-Färbung durchgeführt. Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff, der zur reversiblen Färbung der transferierten Proteine auf der Membran dient [416, 417]. Jede Membran wurde für 5 min bei Raumtemperatur in 1:10 verdünnter frischer Ponceau S-Lösung (Tabelle 9.22) geschwenkt. Waren Proteinbanden nach der kurzen Inkubation mit bidest. H₂O zu sehen, so erfolgte die Entfärbung durch das mehrmalige Waschen der Membran mit bidest. H₂O. Im Gegensatz zu Ponceau S dient der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau zur Färbung bzw. Detektion von Proteinen im Gel [416]. Hierfür wurde Letzteres bei Raumtemperatur für 45 min in die Coomassie-Färbelösung (Tabelle 9.23) gelegt, wobei die Proteine nach dem mehrmaligen Waschen in der Entfärbelösung (Tabelle 9.24) sichtbar gemacht wurden.

3.6.3.4 Immunodetektion von K48- und K63-verknüpften Polyubiquitinketten

Am Ende des Elektro-Protein-Transfers und der Ponceau S- bzw. Coomassie-Färbung wurden die PVDF-Membranen zunächst 1 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer (Tabelle 9.21) auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Dieser Schritt diente zur Sättigung von unspezifischen Bindungsstellen. Danach erfolgte die 16-stündige Inkubation bei 4 °C mit dem 1:2000 in Blockpuffer verdünnten primären Antikörper gegen Polyubiquitin (*rabbit-anti-ubiquitin, linkage-specific K48* bzw. *mouse-anti-ubiquitin, linkage-specific K63*) (Tabelle 9.37). Durch das zweimalige Waschen in PBST-Puffer für jeweils 5 min auf einem Horizontalschüttler konnten nicht gebundene primäre Antikörper entfernt werden. Im nächsten Schritt kam es zur einstündigen Inkubation der Membranen mit dem Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*; HRP)-konjugierten sekundären Antikörper (*mouse anti-rabbit IgG-HRP* bzw. *mouse anti-rabbit IgG-HRP*) (Tabelle 9.37). Die Antikörper wurden vorher 1:2000 in Blockpuffer verdünnt. Das Waschen der Membran bzw. das Entfernen des Antikörpers erfolgte wieder durch den zweimaligen Einsatz von PBST-Puffer (Tabelle 9.19) bzw. den einmaligen Einsatz von PBS-Puffer (Tabelle 9.6) für jeweils 5 min bei Raumtemperatur.

3.6.3.5 Chemilumineszenz-Reaktion

Ermöglicht wird die Chemilumineszenz-Detektion durch die Aktivität der an den sekundären Antikörper konjugierten HRP. Zuständig ist dieses Enzym für die Katalyse der Oxidation von Luminol, einem gelblich bis grünlichen Farbstoff, der sich in der *enhanced chemiluminescent* (ECL)-Lösung (Tabelle 9.20) befindet [418]. Neben Luminol (Tabelle 9.6) sind an der von HRP katalysierten Reaktion auch Peroxide wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Tabelle 9.6) beteiligt [418]. Das aus dem Luminol-Radikal entstehende Luminolendoperoxid wird in 3-Aminophthalat-Dianion umgewandelt, das für die Aussendung von Licht verantwortlich ist [419]. Durch die Photonenemission kommt es zur Schwarzfärbung auf dem Film und somit werden die Stellen, an denen sich K48- bzw. K63-verknüpfte Polyubiquitinketten befinden, sichtbar. Die Inkubation der Membran für die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte in frischer ECL-Lösung unter Lichtausschluss für 5 min bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde die eingeschweißte Membran als Lichtschutz in einer Filmkassette (Tabelle 9.5) platziert und ins dunkle Fotolabor gebracht, wobei die Belichtungszeit bei 2 min lag. Die Filmentwicklung fand im Optimax X-Ray Film Processor (Tabelle 9.5) statt.

3.6.3.6 Strippen

Das sogenannte Strippen diente zur Entfernung der primären und sekundären Antikörper gegen Polyubiquitin von der jeweiligen Membran, um diese anschließend zur Detektion des Referenzproteins β -Aktin zu verwenden. Bei Raumtemperatur erfolgte die 45-minütige Inkubation der Membran in Strippuffer. Nach zweimaligem Waschen in PBST-Puffer für jeweils 5 min fand die Inkubation in Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur statt.

3.6.3.7 Immunodetektion von β -Aktin

Nachgewiesen wurde β -Aktin in analoger Vorgehensweise wie der in oberen Abschnitten (Kap. 3.6.3.4) beschriebenen Detektion der polyubiquitinierten Proteine. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Inkubation der PVDF-Membran mit dem primären Antikörper (*mouse-anti-actin*, 1:400) (Tabelle 9.37) für 2 h bei Raumtemperatur stattfand. Mit dem sekundären Antikörper (*goat anti-mouse IgG-HRP*, 1:5000) (Tabelle 9.37) wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Expositionszeit des Filmes (Tabelle 9.4) betrug ca. 2 min.

3.6.4 Messung der spezifischen Proteasomaktivität

Die Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des 20S-Proteasoms beruht auf der proteolytischen Spaltung eines fluorogenen Farbstoffs 7-Amido-4-Methylcoumarin (AMC), der an ein Peptidsubstrat (N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr) gekoppelt ist [420]. Nach der Spaltung des Peptids wird das Fluorogen freigesetzt und danach Fluoreszenz generiert. Für die Ermittlung der spezifischen Proteasomaktivität, wurde das Proteasom spezifisch durch MG-132 (Tabelle 9.6) gehemmt. Durch die Differenzbildung der Proteasomaktivität in Ab- und Anwesenheit des Inhibitors konnte die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität bestimmt werden.

Zur Analyse der Fluoreszenz diente eine 96-well-Halbflächen-Mikrotiterplatte, bei der die Plattenvertiefungen zum Versuchsbeginn mit einer 3 %igen BSA-Lösung blockiert wurden. Hierfür reichte eine 30-minütige Wartezeit bei 37 °C aus. Nach dem Absaugen des in *tris-buffered saline* (TBS) (Tabelle 9.26) gelösten BSA erfolgte das Pipettieren von 30 μ l des Aktivitätspuffers sowie 20 μ l der zu untersuchenden Proben. Weiterhin wurden die *wells* noch zusätzlich entweder mit 0,5 μ l DMSO (Gesamtpeptidase-Aktivität) oder 0,5 μ l MG-132 (Gesamtpeptidase-Aktivität – Proteasomaktivität) bestückt. Als Nächstes fand eine 15-minütige Inkubation im Dunkeln bei 150 rpm und 20 °C statt. Im Anschluss an die Wartezeit kam es zur Zugabe von 0,5 μ l des spezifischen Substrats (N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-

AMC) (Tabelle 9.6) zu jedem *well*. Unmittelbar danach wurde die Messung im Fluoroskan Ascent FL Fluorometer gestartet und der Anstieg der Fluoreszenz nach Anregung bei 355 nm alle 10 min über einen Zeitraum von 190 min bei 460 nm ermittelt.

Anhand der Fluoreszenzwerte, die zunächst auf mg Protein normalisiert wurden, wurde in GraphPad Prism 5 mittels linearer Regression der Anstieg der Fluoreszenz pro Zeiteinheit als Maß der spezifischen Enzymaktivität bestimmt. Schließlich wurde zum Erhalt der spezifischen Proteasomaktivität die Differenz der Enzymaktivitäten in Abwesenheit und Anwesenheit des Inhibitors MG-132 berechnet.

3.6.5 Detektion aggregierter Proteine mit dem ProteoStat® Protein aggregation assay

Zur Messung der Menge aggregierter Proteine in Lösung dient der ProteoStat® Protein *aggregation assay* (Tabelle 9.38). Hierbei handelt es sich um ein einfaches und sensitives Verfahren, mit dem die Messung von weniger als 1 % aggregierter Proteine in Lösung möglich ist. Das Anregungsmaximum des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffs liegt bei 500 nm und das Emissionsmaximum bei 600 nm.

Die durch Proteinextraktion gewonnenen Proteinlösungen (Kap. 3.6.1) wurden auf Eis aufgetaut. Nach der 1:10-Verdünnung des *assay buffers* (AB) mit bidest. H₂O erfolgte auch die 1:5000-Verdünnung des ProteoStat® *detection reagent* mit einfachem AB in einem lichtgeschützten Reaktionsgefäß. Des Weiteren wurden auch die Proteinproben mit AB je nach ihrer Konzentration so verdünnt, dass Proteinkonzentrationen von 100 µg/ml entstanden. Für alle Proben wurden identische Proteinmengen eingesetzt. Die fluorometrische Messung der Proteinaggregate fand jeweils als Dreifachbestimmung in 96-*well*-Halbflächen-Mikrotiterplatten statt. In die Plattenvertiefungen wurden 50 µl des verdünnten ProteoStat® *detection reagent* und 50 µl Proteinprobe oder AB (Leerwert) pipettiert. Direkt nach dem Pipettieren kam es zu einer 15-minütigen Inkubation der Mikrotiterplatte im Dunkeln bei 150 rpm und 20 °C. Gemessen wurde die Fluoreszenz nach dem Versiegeln der Mikrotiterplatte mit einem Verschlussfilm bei 646 nm nach Anregung bei 544 nm mit dem Fluoroskan Ascent FL Fluorometer.

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 Herstellung von RNAi-Klonen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die *dnc-1* und *sqst-1* RNAi-Klone durch Klonierung hergestellt, da sie in der RNAi-Bibliothek nicht vorhanden waren [421]. Den folgenden Abschnitten sind die hierfür angewandten Methoden zu entnehmen.

3.7.2 Lyse der Nematoden

Zunächst wurden die Wildtyp-Würmer von NGM-Agarplatten mithilfe einer Mischung aus Wurm-Lysepuffer (Tabelle 9.28) und der Proteinase K (Tabelle 9.7) einzeln in 0,2 ml-PCR-Gefäße überführt. Diese Mischung ermöglichte mit den durch einen Thermocycler (Tabelle 9.5) gewährleisteten notwendigen Temperaturen die Freisetzung der genomischen DNA aus den Nematoden. Die Lyse-Reaktion fand bei 60 °C innerhalb von 60 min statt. In den letzten 15 min erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K bei 90 °C, die für die Hemmung von DNasen verantwortlich ist, wodurch die Lyse beendet wurde.

3.7.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die aus der Lyse eines Nematoden gewonnene genomische DNA konnte entweder bei -20° C eingefroren oder direkt weiterverwendet werden. Demnach wurden die für die Amplifikation notwendigen Substanzen in einem Mastermix vereint und dem sogenannten *template*, der genomischen DNA, hinzugegeben. Die Vervielfältigung der DNA im Rahmen der *single worm* PCR (SW-PCR) wird durch das hitzebeständige Enzym *Taq*-DNA-Polymerase ermöglicht, das u.a. zweiwertige Magnesium-Ionen als Kofaktor und ein Oligonukleotid als Startermolekül (Primer) benötigt. Durchgeführt wurde die SW-PCR-Reaktion mit dem KAPA2G *Fast Hotstart* PCR Kit (Tabelle 9.38). Diese Methode umfasst ca. 30 Zyklen, die jeweils aus 3 Phasen, der Denaturierung, der Amplifikation und der Elongation bestehen (Tabelle 3.3). Als Erstes wurde bei 95 °C die doppelsträngige DNA durch Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen in Einzelstränge zerlegt. Nach einer Abkühlung auf eine für den Primer spezifische Temperatur, die von seiner Länge sowie Zusammensetzung aus Purinen und Pyrimidinen abhängt, lagerte sich dieser an die entsprechenden, komplementären DNA-Abschnitte innerhalb des *templates* an (Primerhybridisierung). Für die Erzielung bester Resultate lag die Annealing-Temperatur ungefähr 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur des Primers, bei der sich 50 % des Primers vom *template* lösen. Zuletzt wurden gemäß dem Namen der PCR die Produkte vorheriger

Zyklen, wie in einer Kettenreaktion, bei 72 °C in jedem Zyklus verdoppelt. Die PCR-Produkte konnten bis zum nächsten Gebrauch bei -20 °C für längere Zeit gelagert werden.

Ein Reaktionsansatz von 25 µl war wie folgt zusammengesetzt:

2 µl genomische DNA aus der Lyse

5 µl KAPA2G Puffer [5x]

0,5 µl KAPA2G dNTP Mix [40 mM]

1,25 µl forward Primer [10 µM]

1,25 µl reverse Primer [10 µM]

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

14,9 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H₂O.

Die Durchführung der PCR erfolgte in dem Thermocycler Veriti® 96 *Well Thermal Cycler* (Tabelle 9.5). Wie oben bereits erwähnt, wurde die Annealing-Temperatur für jedes Primer-Paar neu bestimmt und entsprechend eingestellt.

Tabelle 3.3 Phasen der PCR

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	
Annealing	59 °C (für <i>dnc-1</i>)	15 s	30
	57 °C (für <i>sqst-1</i>)	15 s	30
Elongation	72 °C	1 s	

3.7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des Erfolgs der PCR diene eine Agarose-Gelelektrophorese. Hierbei handelt es sich um eine Methode, welche die Trennung von Gemischen aus DNA- oder RNA-Molekülen sowie Proteinen gemäß ihrem Molekulargewicht, ermöglicht [422]. Verantwortlich für die Gelbildung ist das aus Seetang gewonnene Polysaccharid Agarose [422], das in Laufpuffer bzw. TAE-Puffer (Tabelle 9.29) gelöst wird. Nach dem Kochen erfolgt

die Zugabe eines speziellen DNA-bindenden Farbstoffs (hier: *SYBR™ Safe DNA Gel Stain*) (Tabelle 9.6), der die Visualisierung der zu untersuchenden Banden ermöglicht. Durch das Einsetzen von speziellen Kämmen entstehen Vertiefungen bzw. Taschen, in welche die Proben pipettiert werden können, die vorher noch mit einem bestimmten sechsfachen DNA-Beladungspuffer (Tabelle 9.6) vermischt werden. Auch wurde eine Standard-DNA-Leiter (*Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder*) (Tabelle 9.6) zur groben Größenbestimmung der amplifizierten DNA aufgetragen. Für die Auftrennung der DNA wurde das Gel mithilfe von Elektroden an eine Spannungsquelle angeschlossen und die Gelkammer mit dem Laufpuffer befüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte 1 h bei 80 V. So wanderte die DNA aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen von der Kathode (Minuspole) zur Anode (Pluspol). Am Ende der Gelelektrophorese fand die optische Detektion der DNA mithilfe eines Blaulicht-Transilluminators (Tabelle 9.5) statt, durch den der fluoreszierende Gelfarbstoff angeregt wurde. Die Dokumentation der Ergebnisse der Gelelektrophorese erfolgte mithilfe einer Kamera (Tabelle 9.5). Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch die Banden nach einer DNA-Gelelektrophorese bzw. *dnc-1*-Amplifikation.

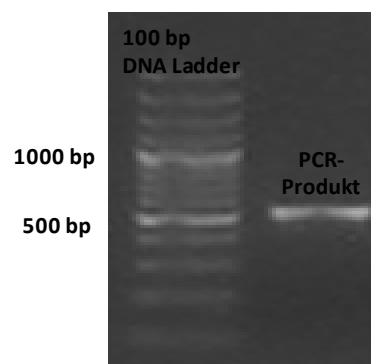


Abbildung 3.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung des Inserts

links: DNA-Größenmarker 100bp Plus, rechts: *dnc-1*-PCR-Produkt (~ 500 bp).

3.7.5 Ligation des PCR-Amplifikats in den pCR2.1-TOPO®Vektor

Mit dem TOPO® TA Cloning® Kit (Tabelle 9.38) wird das Klonieren von PCR-Produkten durchgeführt, die durch die *Taq*-Polymerase amplifiziert wurden. Letztere bewirkt dank ihrer terminalen Transferase-Aktivität das Anhängen eines Adenin-Überhangs an jedes 3'-Ende des PCR-Produkts [423]. Da der Klonierungsvektor, pCR2.1-TOPO®, einen Thymidin-Überhang aufweist, kommt es zu einer komplementären Basenpaarung zwischen den Thymidin-Überhängen des TA-Vektors und den Adenin-Überhängen des PCR-Produkts. So wird durch Topoisomerase I die Insertion des DNA-Fragments in den Klonierungsvektor ermöglicht. Mit seiner Tyrosyl-Gruppe bindet das Enzym über eine kovalente Bindung an den 3'-Phosphatrest des Klonierungsvektors. Diese Phospho-Tyrosyl-Bindung wird zwischen

dem TA-Vektor und der Topoisomerase I durch die 5'-Hydroxylgruppe des PCR-Produkts angegriffen, woraufhin Letzteres in den Vektor ligiert und das Enzym freigesetzt wird [423].

Zur Durchführung des TOPO-TA-Clonings wurden die folgenden Substanzen zusammengemischt und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert:

frisches PCR-Produkt	1 μ l
Salzlösung	1 μ l
bidest. H ₂ O	3 μ l
pCR2.1-TOPO® Vektor®	1 μ l [10 ng/ μ l].

Wenn das PCR-Produkt bei -20 °C gelagert wurde, erfolgte vor dem TOPO TA-Cloning® noch eine zusätzliche Endsynthese von 10 min bei 72 °C im Thermocycler. Nach dem TOPO TA-Cloning® konnte das Ligationsprodukt entweder direkt weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren werden.

3.7.6 Transformation der Plasmid-DNA in *E.coli NovaBlue Giga Singles*™

Die bei der Ligation gewonnene Plasmid-DNA wurde in *E. coli*-Zellen, die *NovaBlue Giga Singles*™ (Tabelle 9.2), transformiert. Hierbei handelt es sich um chemisch-kompetente Mikroorganismen, deren Zellmembran durch Chemikalien permeabilisiert wurde. Für die Transformation erfolgte zunächst die fünfminütige Inkubation von 50 μ l Bakterien mit 2 μ l pCR2.1-TOPO® Vektor®. Anschließend wurde das Zell-Vektor-Gemisch für exakt 30 sec bei 42 °C inkubiert. Diese Hitzeschockreaktion ermöglichte die Öffnung der Poren und somit die Aufnahme des Plasmids durch die Bakterienzellmembran. Zur Schließung der Poren fand noch eine zweiminütige Inkubation auf Eis statt. Nach der Zugabe von 250 μ l *super optimal broth* (SOC)-Medium, das als bakterielles Nährmedium fungiert, wurde das Zell-Vektor-Gemisch für eine Stunde bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Währenddessen erfolgte das Ausstreichen von 40 μ l X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid) (Tabelle 9.7) [40 mg/ml] und 40 μ l 100 mM IPTG (Tabelle 9.7) auf jeweils drei 2x YT-Agarplatten mit Ampicillin [50 μ g/ml]. Diese wurden mit Parafilm® (Tabelle 9.4) verschlossen und bis zum Gebrauch bei 37 °C aufbewahrt. X-Gal und IPTG waren für die optische Erkennung der Bakterienkolonien mit der Plasmid-DNA im Rahmen des Blau-Weiß-Screenings essentiell [424]. Da der Klonierungsvektor, pCR2.1-TOPO® Vektor®, an der Insertionsstelle (*multiple cloning site; mcs*) das Gen für die β -Galactosidase (LacZ) trägt, kommt es nach erfolgreicher Insertion zu einer Zerstörung des LacZ-Gens und somit zu einer Inaktivierung der β -Galactosidase. Demnach kann IPTG die Bildung der β -Galactosidase nicht mehr induzieren [424]. Letztere hydrolysiert in Bakterien, die Plasmide ohne Insert tragen, den zugebenen

Zucker X-Gal zu einem Substrat, woraus durch Dimerisierung und Oxidation ein blauer Indigofarbstoff (5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo) entsteht [425]. Dies ermöglicht die optische Unterscheidung zwischen den weißen Bakterienkolonien, die das gewünschte *C. elegans*-DNA-Fragment enthalten, und den blauen, die es nicht aufweisen. Eine kontaminationsfreie Vermehrung der Mikroorganismen wurde durch die sich im Agar befindlichen Antibiotika gewährleistet. Die Aufbewahrung der vorgewärmten mit dem Zell-Vektor-Gemisch versetzten Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht im Inkubator. Am nächsten Tag fand die Selektion der weißen Kolonien statt, wobei der Erfolg der Transformation mit Insert-haltigen Plasmiden mithilfe von Gen-spezifischen Primern anhand einer PCR (Kap. 3.7.3) sowie einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 3.7.4) getestet wurde.

3.7.7 Aufreinigung der Plasmid-DNA

Die Extraktion der Plasmid-DNA aus den *NovaBlue Giga Singles*[™] erfolgte mit dem Plasmid Miniprep Kit I (Tabelle 9.38) nach den Angaben des Herstellers. Hierbei wurden 1,6 ml der jeweiligen Übernachtskultur (Kap. 3.3) in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden 250 µl Solution I hinzugefügt und gevortext. Solution I enthält RNase A, die zum Abbau von RNA-Molekülen und somit zum Schutz vor RNA-Kontaminationen führt. Als Nächstes kam es zur Zugabe von 250 µl Solution II, wobei der Inhalt des Reaktionsgefäßes nicht gevortext, sondern nur durch vorsichtiges Invertieren gemischt wurde, bis sich ein klares Lysat bildete. Durch das Pipettieren von 350 µl Solution III fand die Neutralisierung der Lösung und die Fällung der Plasmid-DNA statt. So entstand ein weißes, flockiges Präzipitat, das bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert wurde. Darauf folgend kam es zur Überführung des Überstandes in eine *PerfectBind DNA Column*, damit die DNA an die Silikamembran binden konnte. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 14000 rpm für 1 min wurde die von der Säulenmatrix aufgefangene Plasmid-DNA mit zwei verschiedenen Lösungen, dem PW Plasmid-Puffer (500 µl) und dem DNA-Waschpuffer (750 µl), gewaschen. Die durch eine zweiminütige Zentrifugation erreichte Trocknung der Säulenmatrix stellte einen essentiellen Schritt bei der Aufreinigung dar. Anschließend wurde die DNA mit dem entsprechenden Elutionspuffer (50-100 µl) durch die Zentrifugation bei 7000 rpm für 1 min in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Zuletzt erfolgte die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration sowie zur Verifizierung der Basenabfolge des Inserts die Abgabe der Probe zur Sequenzierung beim Sequenzierlabor des Interdisziplinären Forschungszentrums der Universität Gießen (*dnc-1*) bzw. bei Microsynth SeqLab (Göttingen, D) (*sqst-1*).

Für die Aufreinigung von größeren Mengen an Plasmid-DNA wurde das QIAfilter Plasmid Midi Kit (Tabelle 9.38) nach Herstellerangaben verwendet.

3.7.8 Doppelverdau mittels *XhoI* und *HindIII*

Bei *XhoI* und *HindIII* handelt es sich um zwei Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme), die zum Schneiden des jeweiligen DNA-Fragments bzw. des Inserts aus dem pCR2.1-TOPO® Vektor® sowie zur Behandlung des leeren L4440-Vektors dienen. Folgende Substanzen wurden für einen 50 µl-Ansatz nach Herstellerangaben zusammengemischt:

32,5 µl DEPC-/Nuklease-freies H₂O

5 µl 10x *Buffer R*

2,5 µl Plasmid-DNA [0,5-1 µg/µl]

5 µl *XhoI*

5 µl *HindIII*.

Nach einem kurzen, vorsichtigen Mischen erfolgte eine 4-stündige Inkubation bei 37 °C.

3.7.9 Extraktion der DNA aus dem Agarosegel

Mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der verdauten DNA-Fragmente (Kap. 3.7.4). Hierbei wurden zunächst 800 mg Agarose in 40 ml 1xTAE-Puffer gelöst und mit 4 µl SYBR™ *Safe DNA Gel Stain* versetzt. Nach dem Beladen der Taschen mit 50 µl Verdau-Ansatz, gemischt mit 10 µl Beladungsfarbstoff, erfolgte die einstündige Gelelektrophorese bei 80 V und 75 mA. Die Banden wurden mithilfe des Blaulichttransilluminators sichtbar gemacht, mithilfe eines Skalpell's herausgeschnitten und in Reaktionsgefäße überführt. Daraufhin kam es zur Extraktion der DNA mit dem Gelextraktionskit (Tabelle 9.38) gemäß den Herstellerangaben. Durch das Wiegen der 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit und ohne Gel wurde das zu pipettierende Volumen an *Binding Buffer* bestimmt und pro 100 mg Gel 100 µl der Pufferlösung hinzugegeben. Danach fand eine siebenminütige Inkubation bei 60 °C im Wasserbad statt, wobei die Reaktionsgefäße alle 2 bis 3 min geschüttelt wurden, damit keine Gelstücke mehr vorhanden waren. Der Inhalt wurde auf eine *Perfect Bind* DNA Säule überführt und bei 14000 rpm für 2 min zentrifugiert. Dies ermöglichte die Bindung der DNA an die Säulenmatrix. Anschließend fanden drei weitere Wasch- bzw. Zentrifugationsschritte (bei 14000 rpm für 1 min) mit 300 µl *Binding*

Buffer sowie zweimal 750 µl *CG Wash Buffer* statt. Die Trocknung der Silikamembran spielte eine essentielle Rolle bei der Aufreinigung und wurde durch eine Zentrifugation bei 14000 rpm für 2 min ohne die Zugabe eines jeglichen Lösungsmittels gewährleistet. Zur Elution der DNA erfolgte das Pipettieren von 30 µl *Elution Buffer* auf die Säulenmatrix und eine Zentrifugation bei 7000 rpm für 1 min. Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration stellte den letzten Schritt der DNA-Aufreinigung dar.

3.7.10 Ligation des Inserts in den L4440-Vektor

Das Verbinden des Inserts mit dem verdauten und aufgereinigten L4440-Vektor wurde durch die ATP-abhängige T4-DNA-Ligase katalysiert, die die 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle miteinander verknüpft [426]. Hierbei kam es zur Bildung eines ringförmigen Plasmids. Für einen 30 µl-Ansatz wurden die im Folgenden dargestellten Substanzen zusammengemischt und daraufhin bei 15 °C über Nacht inkubiert:

15 µl DEPC-/Nuklease-freies H₂O

5 µl Insert-DNA [0,1 µg/µl]

5 µl Vektor-DNA [0,5 µg/µl]

2 µl T4-DNA-Ligase

3 µl Ligase-Puffer [10x].

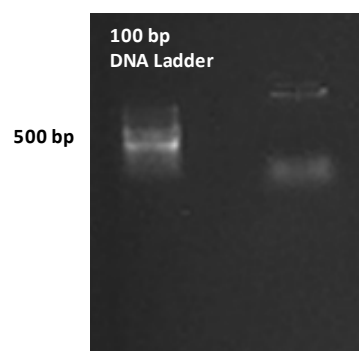


Abbildung 3.4 Ligation des *sqst-1*-Inserts in den L4440-Vektor

links: DNA-Größenmarker 100bp Plus, rechts: *sqst-1*-Insert (~ 300 bp).

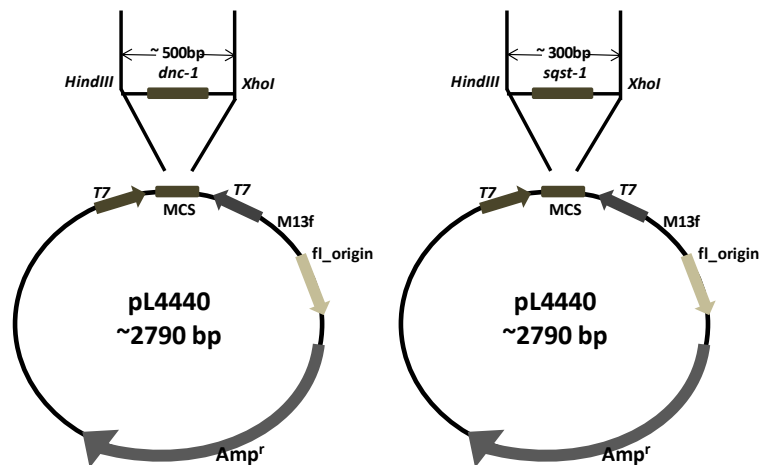


Abbildung 3.5 Genkarte des *dnc-1*- bzw. *sqst-1*-RNAi-Plasmids

Das Insert befindet sich zwischen zwei T7-Promotoren, die durch IPTG induzierbar sind.

Modifiziert nach [427].

3.8 Statistische Auswertung

Für jedes Experiment fand die Durchführung von mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen statt. Zur statistischen Analyse diente die Software GraphPad Prism 5. Festgelegt wurden folgende Signifikanzniveaus: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***). Die Darstellung der Ergebnisse zur Überlebenszeit unter Hitzestress in *C. elegans* erfolgte mittels Kaplan-Meier-Kurven, wobei zur Analyse der Mantel-Haenszel Logrank-Test diente. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse mit GFP-Reportergenen, der Messung der Autophagie-Aktivität, der Quantifizierung von Lysosomen mit LysoTracker® Red, der mitochondrialen ROS-Produktion, der Messung der spezifischen Proteasomaktivität sowie der Messung der Proteinaggregation wurden auf die Kontrolle normalisiert und als Balkendiagramme mit Mittelwert \pm Standardabweichung (SD; engl. *standard deviation*) veranschaulicht. Die statistische Analyse fand mittels unpaarigem t-Test oder einfaktorierter Varianzanalyse (ANOVA) sowie Bonferroni's *multiple comparison test* statt.

4 Ergebnisse

Die korrekte Elimination von geschädigten und falsch gefalteten Proteinen stellt einen essentiellen Bestandteil für die Funktionalität von Zellen und Organismen dar [6]. Hierbei spielt das Proteostase-Netzwerk eine wichtige Rolle [6]. Es besteht aus verschiedenen Mechanismen der Wiederherstellung der Funktionalität über Chaperone oder die UPR sowie der Elimination von gealterten Proteinen über das Aggresom, das Proteasom oder das Autophagosom (Kap. 1.1). Demnach geht eine Störung der Proteostase nicht nur mit einer erhöhten Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen, sondern auch mit dem Altern oder verschiedenen neurodegenerativen sowie metabolischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus einher [12]. Über die günstigen Effekte der Polyphenole auf die verschiedenen Bestandteile des Proteostase-Netzwerkes wurde bereits berichtet [256, 428]. So haben frühere Untersuchungen auch gezeigt, dass die 48-stündige Inkubation von *C. elegans* mit 10 mM Glucose die Lebensspanne unter Hitzestress bei 37 °C verkürzt, wobei diese durch die gleichzeitige Gabe von 1 µM Quercetin kompensiert wurde [256]. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abbildung 4.1).

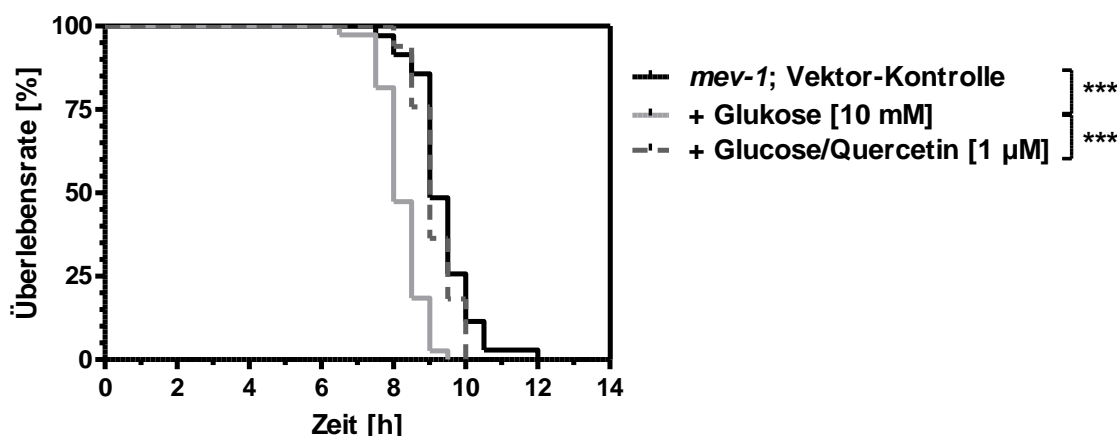


Abbildung 4.1 Quercetin führt zur Prävention der Glucose-induzierten Verkürzung der Überlebenszeit von *mev-1* unter Hitzestress bei 37 °C

Die Verhinderung der Glucose-induzierten Abnahme der Hitzestress-Resistenz durch Quercetin nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C konnte, wie von Fitzenberger *et al.* [256] publiziert, in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. *** $p < 0.001$ vs. Kontrolle

Des Weiteren stellte sich heraus, dass für diesen Effekt des Quercetins die Aktivierung der UPR sowie des Proteasoms verantwortlich ist [256]. In der vorliegenden Arbeit diente der Stamm TK22 bzw. *mev-1* zur Untersuchung des Aggresoms als eine Zielstruktur von Quercetin zur Prävention glucotoxischer Effekte. So wurden ausgewählte in funktionellem Zusammenhang mit dem Aggresom stehende Gene mithilfe der RNAi-Methode in ihrer

Expression reduziert, um deren Einfluss auf die Lebensspanne oder die Proteinaggregation zu ermitteln.

4.1 Die Bedeutung von Aggresom-relevanten Genen für die Hitzestress-Resistenz von *mev-1*

4.1.1 Die Verkürzung der Überlebenszeit unter RNAi von *ubql-1* oder *dnc-1* wird durch Glucoseexposition in Ab- oder Anwesenheit von Quercetin nicht weiter beeinflusst

Bei *ubql-1* und *dnc-1* handelt es sich um die Homologe der Säugetiergene *ubqln1* und *p150^{Glued}/dctn1*, die an der Bildung bzw. Elimination von Aggresomen beteiligt sind (Kap. 1.1.3) [57, 429]. Mithilfe der RNAi-Methode wurden die beiden Gene einzeln inhibiert und die Hitzestress-Resistenz von *mev-1* bei 37 °C nach 48-stündiger Inkubation bestimmt. Die Überlebensdauer der Würmer war nach dem Knockdown von *ubql-1* (Abbildung 4.2) im Vergleich zur Kontrolle signifikant verkürzt. Auch kam es zu einer signifikanten Abnahme der Hitzestress-Resistenz von *mev-1* in funktioneller Abwesenheit von *dnc-1* (Abbildung 4.3). Unter RNAi der Aggresom-relevanten Gene *ubql-1* oder *dnc-1* hatte die Behandlung der Nematoden mit Glucose und Quercetin keinen Einfluss auf die Überlebenszeit.

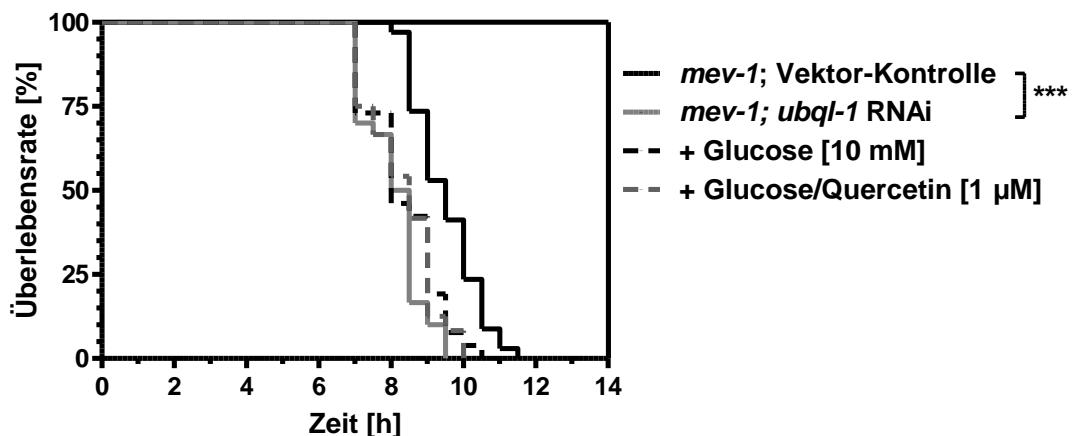


Abbildung 4.2 Unter *ubql-1* RNAi lebt *mev-1* kürzer, wobei Quercetin die Lebensspanne nicht mehr verlängert

Die Hitzestress-Resistenz der Nematoden ist nach dem Knockdown von *ubql-1* bei 37 °C signifikant verringert. Unter *ubql-1* RNAi wird die Überlebenszeit bei 37 °C durch die zusätzliche Gabe von Glucose in Ab- und Anwesenheit von Quercetin nicht verändert. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

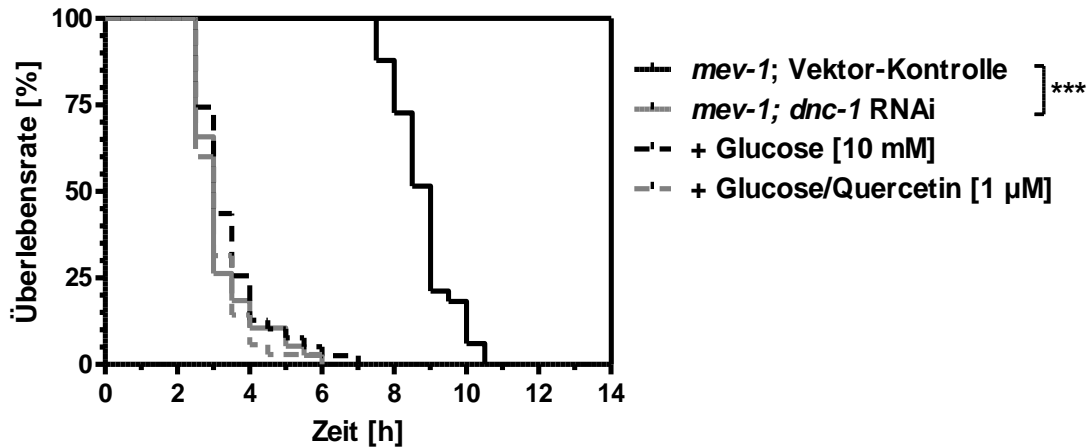


Abbildung 4.3 Der Knockdown von *dnc-1* mittels RNAi-Methode verringert die Hitzestress-Resistenz von *mev-1*, worauf Quercetin jedoch keinen Einfluss hat

Die Nematoden leben unter *dnc-1* RNAi bei 37 °C kürzer. Nach Exposition gegenüber Glucose in Ab- und Anwesenheit von Quercetin bleibt die Überlebenszeit in funktioneller Abwesenheit von DNC-1 unbeeinflusst. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

4.1.2 Der Knockdown von *sqst-1* hat keinen Einfluss auf die Überlebenszeit von *mev-1* bei 37 °C

Sqst-1 kodiert für das Homolog zu *p62* in Säugetierzellen [364]. Da es als ein für die Aggresombildung relevantes Gen gilt (Kap. 1.1.3) [69], stand *sqst-1* auch im Fokus der Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Unter *sqst-1* RNAi wurden keine signifikanten Veränderungen bzgl. der Lebensspanne im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Auch führte die 48-stündige Inkubation mit Glucose in Ab- oder Anwesenheit von Quercetin zu denselben Effekten wie in Abwesenheit der *sqst-1* RNAi (Abbildung 4.4).

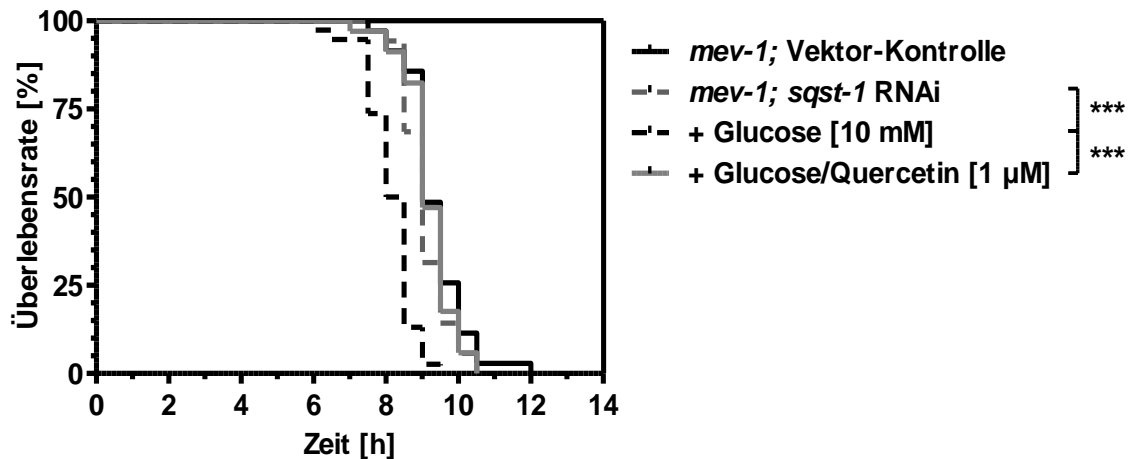


Abbildung 4.4 Unter *sqst-1* RNAi ist die Lebensspanne von *mev-1* im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert

Die Überlebenszeit von *mev-1* bleibt sowohl nach dem Knockdown von *sqst-1* als auch nach der 48-stündigen Inkubation mit Glucose und Quercetin bei 37 °C im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

4.2 Der Einfluss von Aggresom-relevanten Genen auf die Proteinaggregation

4.2.1 Das funktionelle Fehlen von *ubql-1* und *dnc-1* erhöht die Proteinaggregation und verhindert die Reduktion der Proteinaggregation durch Quercetin in Glucose-exponierten Nematoden

Wie bereits erwähnt (Kap. 1.1.3.2), ist an der Bildung von Aggresomen neben verschiedenen Adaptorproteinen, wie z.B. *ubql-1*, auch der wichtige Bestandteil vom Dyneinmotorkomplex, *dnc-1* beteiligt [57]. Da das Aggresom für die Elimination von fehlgefalteten bzw. aggregierten Proteinen verantwortlich ist [57], wurde erwartet, dass in Abwesenheit von *ubql-1* oder *dnc-1* die Proteinaggregation zunimmt (Abbildung 4.5). Tatsächlich führte das funktionelle Fehlen der beiden Aggresom-relevanten Gene zu einer deutlich erhöhten Proteinaggregation in den Nematoden (Abbildung 4.5). Nahezu identische Steigerungen der Proteinaggregation wurden durch die 48-stündige Inkubation der Nematoden mit Glucose erzielt, die jedoch durch die zusätzliche Applikation von Quercetin wieder auf den Wert der Kontrolle vermindert wurden. Nach dem Knockdown von *ubql-1* und *dnc-1* resultierte die Behandlung mit Glucose wiederum nicht in einer weiteren Erhöhung der Proteinaggregation. Die RNAi gegenüber *ubql-1* und *dnc-1* verhinderte auch die Senkung der Proteinaggregation in Glucose-exponierten *mev-1*-Nematoden durch Quercetin.

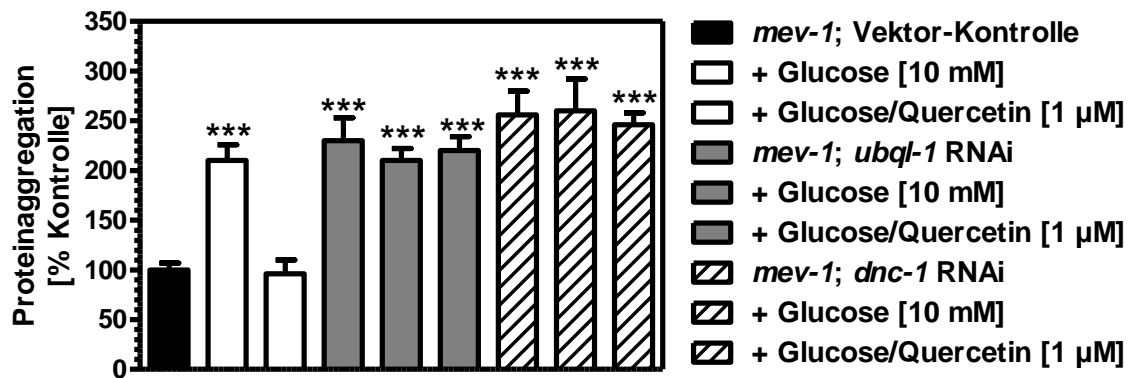


Abbildung 4.5 Unter *ubq1-1* RNAi und *dnc-1* RNAi ist die Proteinaggregation in *mev-1* im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht

Durch den Knockdown von *ubq1-1* und *dnc-1* nimmt die Proteinaggregation im Vergleich zur Kontrolle zu, ebenso wie in der Glucose-exponierten Vektor-Kontrolle. Quercetin reduziert die Proteinaggregation in Glucose-exponierten *mev-1*-Nematoden nur in funktioneller Anwesenheit von *ubq1-1* und *dnc-1*. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

4.2.2 Unter *sqst-1* RNAi bleibt die Proteinaggregation unverändert

Da das Adaptorprotein *sqst-1* an der Bildung von Aggresomen beteiligt ist (Kap. 1.1.3.2) [69], war auch hier die Hypothese, dass unter *sqst-1* RNAi die Proteinaggregation in *C. elegans* zunimmt. Es zeigte sich jedoch, dass das funktionelle Fehlen von *sqst-1* die Proteinaggregation im Vergleich zur Vektor-Kontrolle oder nach 48-stündiger Inkubation mit Glucose in Anwesenheit von Quercetin nicht beeinflusste.

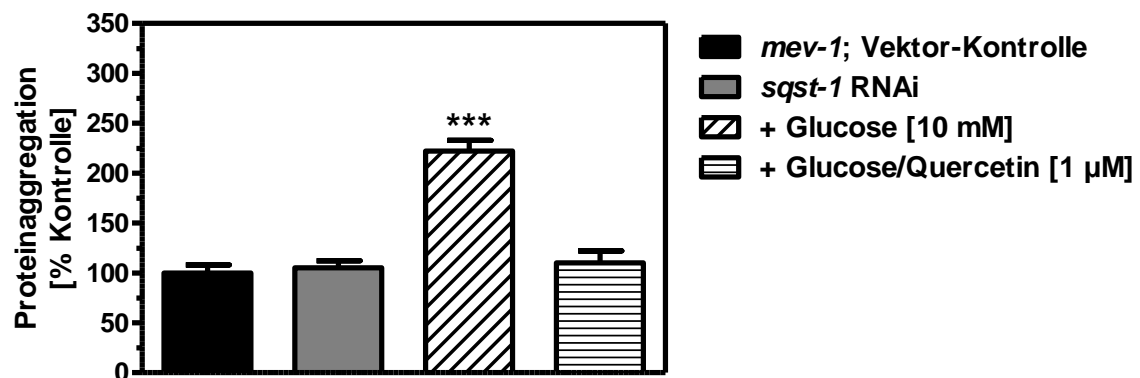


Abbildung 4.6 Unter *sqst-1* RNAi wird die Proteinaggregation in *mev-1* nicht beeinflusst

Im Vergleich zur Kontrolle bleibt in Abwesenheit von SQST-1 die Proteinaggregation unverändert, wobei diese durch die 48-stündige Inkubation mit Glucose erhöht wird und bei zusätzlicher Gabe von Quercetin wieder auf den Wert der Kontrolle zurückgeführt wird. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

4.3 Der Einfluss von Aggresom-relevanten Genen auf die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität

4.3.1 Der Knockdown von *ubql-1* und *dnc-1* verringert die spezifische Proteasomaktivität

Zur Ermittlung der Interaktion zwischen dem Proteasom und dem Aggresom fand die Untersuchung der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasomaktivität nach dem Knockdown von *ubql-1* und *dnc-1* statt. Unter RNAi von *ubql-1* und *dnc-1* war die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms signifikant verringert (Abbildung 4.7). Durch die 48-stündige Inkubation von *mev-1* mit 10 mM Glucose wurde die spezifische Proteasomaktivität in gleichem Ausmaß reduziert. Quercetin konnte die Proteasomaktivität in Glucose-exponierten *mev-1*-Nematoden wiederherstellen [256, 430], während dies unter *ubql-1* oder *dnc-1* RNAi nicht mehr beobachtet wurde.

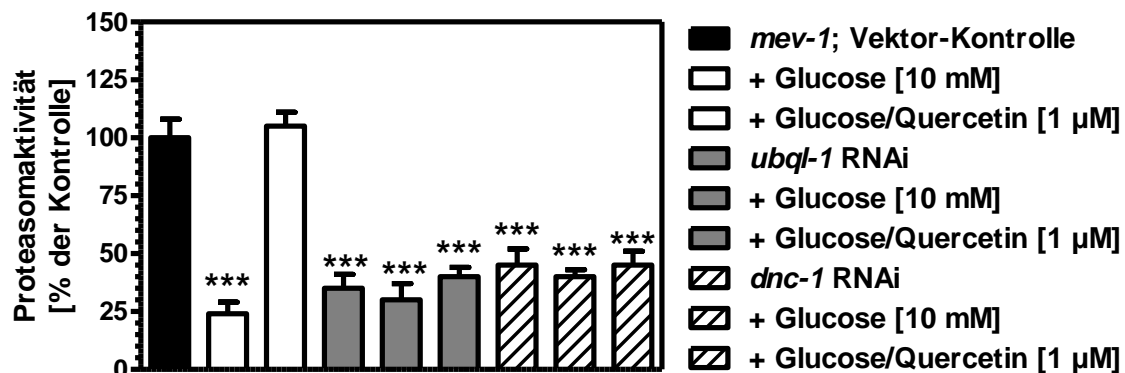


Abbildung 4.7 Der Knockdown von *ubql-1* und *dnc-1* führt zu einer Abnahme der spezifischen Proteasomaktivität

Nach dem Knockdown von *ubql-1* und *dnc-1* mittels RNAi-Methode ist die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität in *mev-1* im Vergleich zur Kontrolle vermindert, ebenso wie nach 48-stündiger Inkubation mit Glucose. Während Quercetin in der Glucose-behandelten Vektor-Kontrolle die Proteasomaktivität auf den Wert der Vektor-Kontrolle in Abwesenheit von Glucose anhebt, geschieht dies unter *ubql-1* bzw. *dnc-1* RNAi nicht mehr. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

4.3.2 Das Fehlen des Aggresom-relevanten Gens *sqst-1* führt zu einer Erhöhung der spezifischen Proteasomaktivität

Im Gegensatz zu den anderen beiden untersuchten Aggresom-relevanten Genen resultierte der Knockdown von *sqst-1* mithilfe der RNAi-Methode in einer signifikanten Steigerung der

Chymotrypsin-ähnlichen Proteasomaktivität. Dies könnte als eine kompensatorische Reaktion auf die erhöhte Proteinaggregation aufgrund der zu erwartenden Einschränkung des Aggresoms betrachtet werden (Abbildung 4.8). Der Knockdown von *sqst-1* hatte jedoch keinen Einfluss auf die durch Glucose reduzierte Proteasomaktivität, die in Abwesenheit von *sqst-1* durch Quercetin auf die Ebene der Kontrolle zurückgeführt wurde.

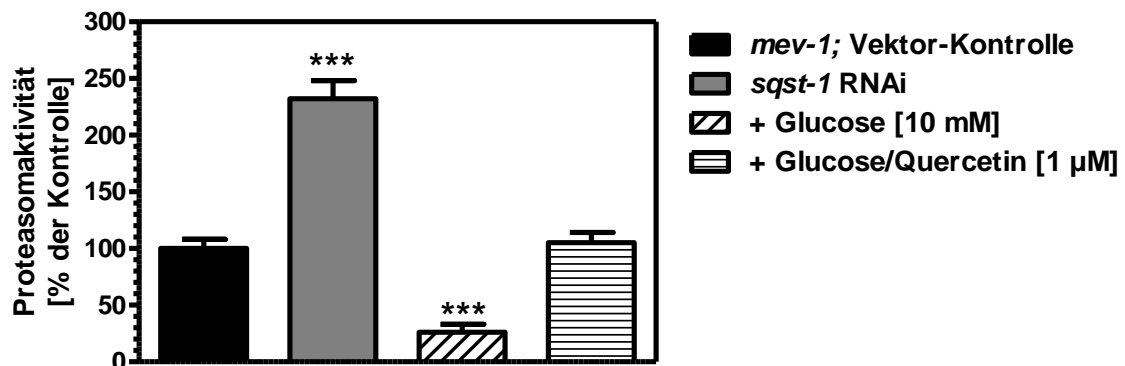


Abbildung 4.8 Das Fehlen von *sqst-1* resultiert in einer kompensatorischen Erhöhung der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasomaktivität

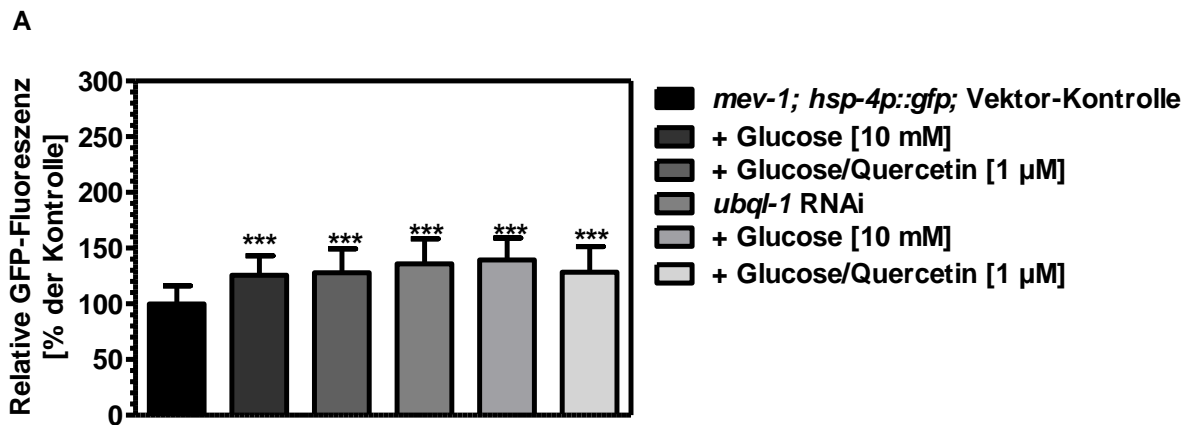
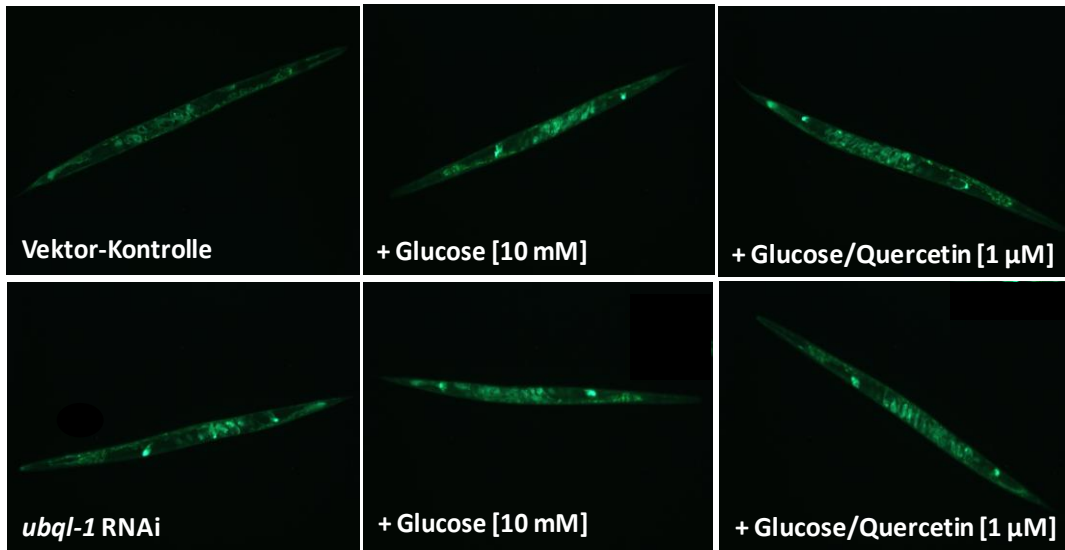
Unter *sqst-1* RNAi ist die spezifische Proteasomaktivität in *mev-1* signifikant erhöht. Jedoch wird in funktioneller Abwesenheit dieses Gens die durch Glucose erniedrigte und durch die gleichzeitige Gabe von Quercetin wieder erhöhte Proteasomaktivität nicht beeinflusst. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

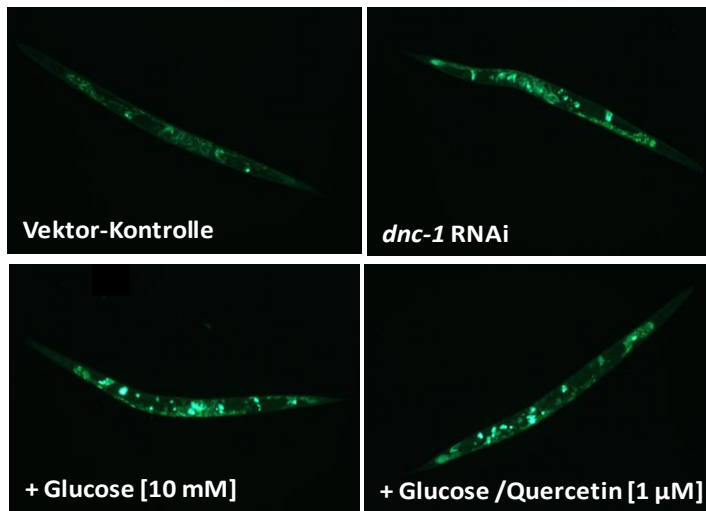
4.4 Der Einfluss von Aggresom-relevanten Genen auf die UPR^{ER}

4.4.1 RNAi Aggresom-relevanter Gene führt zu gesteigertem ER-Stress

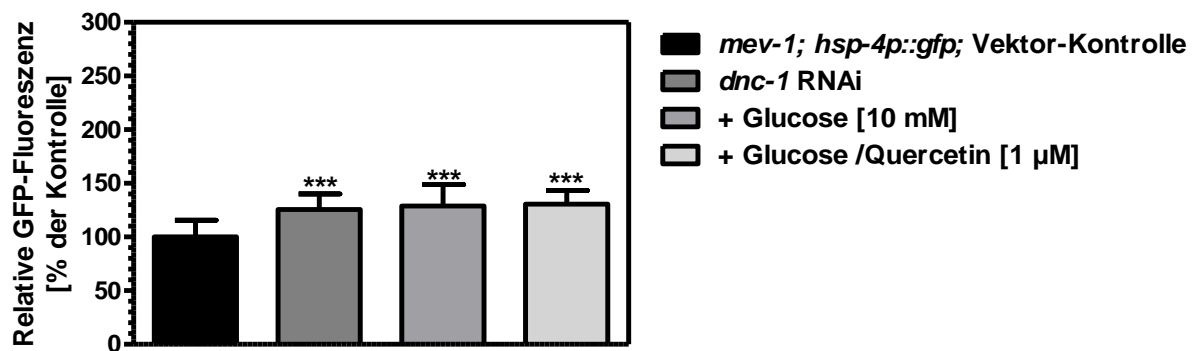
Zur Bestimmung der UPR^{ER}-Aktivität in Abhängigkeit von Aggresom-relevanten Genen wurde die *hsp-4*-Expression unter RNAi von *ubql-1*, *dnc-1* und *sqst-1* fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. *Hsp-4* ist ein Chaperon des ER, das bei gesteigertem Stress im ER vermehrt exprimiert wird [402, 431]. Wie vorherige Untersuchungen zeigten, kommt es nach 48-stündiger Inkubation mit 10 mM Glucose zu einer Erhöhung der *hsp-4*-Expression, die durch 1 µM Quercetin nicht wieder gesenkt werden konnte [430]. Dies wurde zunächst in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Abbildung 4.9). Auch unter RNAi der untersuchten Aggresom-relevanten Gene *ubql-1*, *dnc-1* und *sqst-1* kam es in dem *C. elegans*-Stamm SJ4005xTK22 (*hsp-4p::gfp*) zu einer signifikant erhöhten *hsp-4*-Expression (Abbildung 4.9). Die in Abwesenheit dieser Gene erhöhte *hsp-4*-Expression wurde durch Glucose nicht weiter gesteigert, was dafür spricht, dass Glucose durch Hemmung dieser Aggresom-relevanten Gene ER-Stress verursacht. Da Quercetin weder nach dem Knockdown von *ubql-1*, *dnc-1* oder *sqst-1*, noch in deren funktioneller

Anwesenheit die durch Glucose gesteigerte *hsp-4*-Expression senken konnte, ist davon auszugehen, dass *hsp-4* kein Gen darstellt, über das Quercetin die Steigerung der Hitzestress-Resistenz in Glucose-exponierten Nematoden vermittelt [430].





B



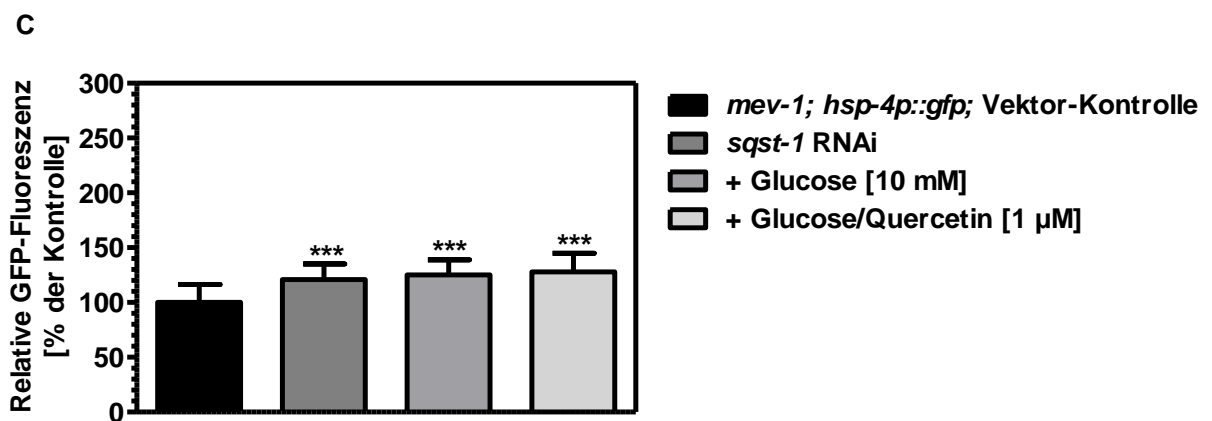
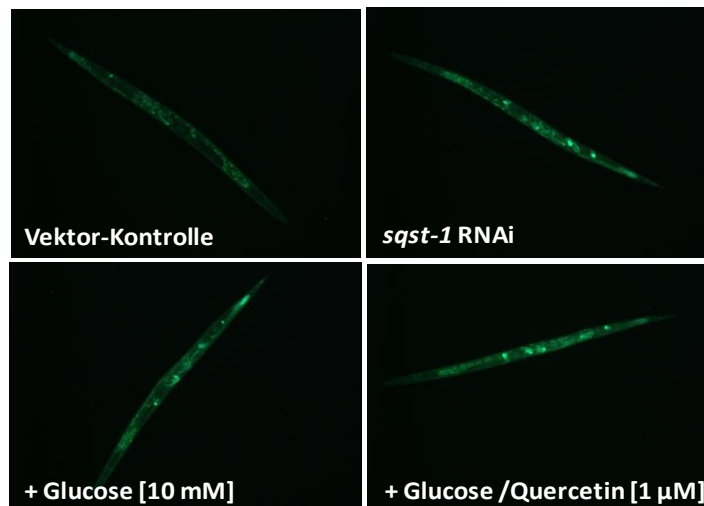


Abbildung 4.9 Unter RNAi der Aggresom-relevanten Gene *ubq1-1*, *dnc-1* und *sqst-1* nimmt die *hsp-4*-Expression zu

Durch den Knockdown von *ubq1-1* (A), *dnc-1* (B) und *sqst-1* (C) ist die relative GFP-Fluoreszenz in SJ4005xTK22 (*hsp-4p::gfp*) im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht, wobei dieser Effekt durch Glucose [10 mM] in Ab- und Anwesenheit von Quercetin [1 µM] nicht beeinflusst wird. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

4.4.2 Die Rolle von *hsp-4* bei der Aufrechterhaltung der Überlebenszeit in funktioneller Abwesenheit von *sqst-1*

Da unter *sqst-1* RNAi, trotz der Bedeutung von SQST-1 für die Aggresombildung [70], die Lebensspanne nicht beeinflusst wurde (Abbildung 4.4), die Expression von *hsp-4* jedoch zunahm (Abbildung 4.9 C), wurde untersucht, ob dieses Hitzeschockprotein in Abwesenheit von SQST-1 die zu erwartende Einschränkung des Aggresoms kompensiert. Hierfür kam es zur Durchführung von Doppel-RNAi-Experimenten. Dass unter *hsp-4* RNAi die Überlebenszeit der *mev-1*-Mutante nicht beeinflusst wird, wurde bereits gezeigt [430]. Unter Doppel-RNAi von *sqst-1* und *hsp-4* fand jedoch auch keine Verkürzung der Überlebenszeit bei 37 °C statt, was nicht für einen durch HSP-4 vermittelten Kompensationsmechanismus unter *sqst-1* RNAi spricht (Abbildung 4.10). Dies zeigt, dass die Lebensspanne der Nematoden in Abwesenheit von SQST-1 nicht durch die erhöhte Expression von *hsp-4* beeinflusst wird.

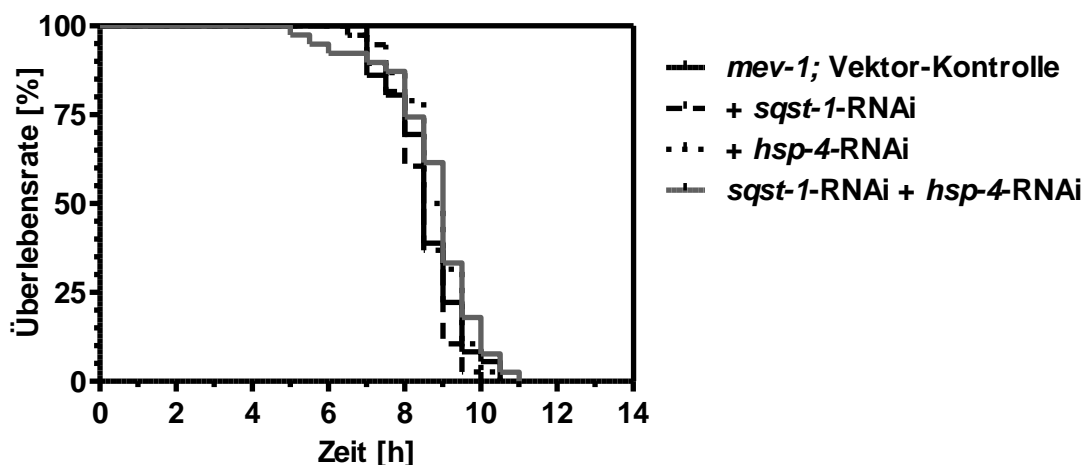


Abbildung 4.10 Die Doppel-RNAi von *sqst-1* und *hsp-4* führt nicht zu einer Verkürzung der Überlebenszeit bei 37 °C

Die Lebensspanne von *mev-1* unter Hitzestress (37 °C) zeigt nach dem Knockdown von *sqst-1* und *hsp-4* keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

4.4.3 Auch *pek-1* ist kein Kompensationsfaktor einer *sqst-1* RNAi

Gebildet wird das Chaperon *hsp-4* im Rahmen der IRE-1-XBP-1-Signalkaskade [404]. Demnach führt IRE1 durch das Spleißen der XBP1-mRNA zur Aktivierung der UPR [432]. Für die hormetischen Effekte unter Doppel-RNAi von *ire-1* und *xbp-1* in *mev-1* wurde *pek-1* als verantwortlicher Faktor identifiziert [404]. So bewirkte *pek-1* nach dem Knockdown von *ire-1* und *xbp-1* die Verlängerung der Lebensspanne der Nematoden über die Aktivierung der

spezifischen Proteasomaktivität [404]. Daher fand in der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der Hitzestress-Resistenz nach dem Knockdown von *sqst-1* und *pek-1* statt. Jedoch konnte *pek-1* auch nicht als Kompensationsfaktor für die nicht beeinflusste Lebensspanne in Abwesenheit von SQST-1 ermittelt werden (Abbildung 4.11), da auch die Doppel-RNAi von *sqst-1* und *pek-1* nicht zu einer Verkürzung der Überlebenszeit von *mev-1* bei 37 °C führte.

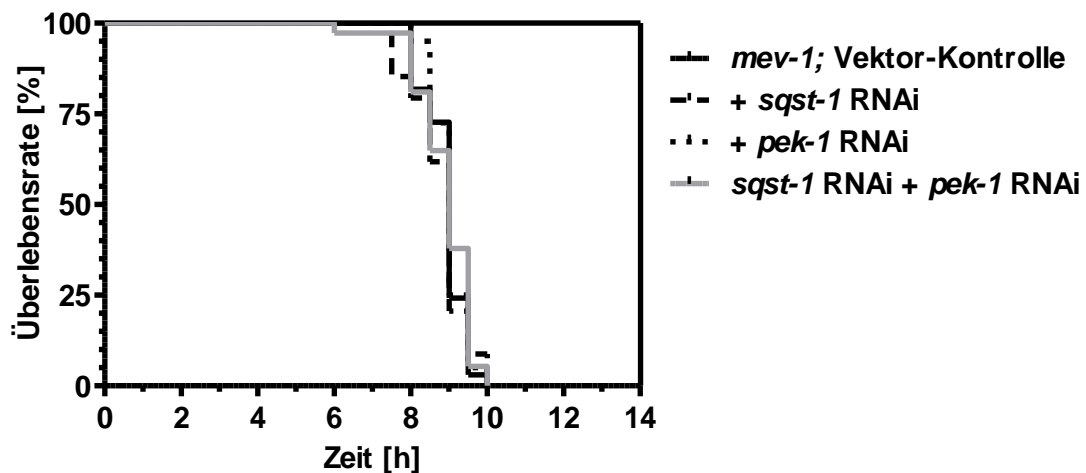


Abbildung 4.11 Der Knockdown von *sqst-1* und *pek-1* hat keinen Einfluss auf die Hitzestress-Resistenz von *mev-1*

Unter RNAi von *sqst-1* und *pek-1* bleibt die Überlebenszeit von *mev-1* bei 37 °C im Vergleich zur Kontrolle unverändert.

4.5 Der Knockdown von *sqst-1* aktiviert das Proteasom

Wie in Kap. 4.4.3 beschrieben, wurde der Knockdown des für die UPR^{ER} wichtigen Gens *pek-1* durch die Aktivierung des Proteasoms kompensiert [404]. Dementsprechend sollte hier untersucht werden, ob auch die *sqst-1* RNAi zu einer solchen Aktivierung beiträgt und so erklärt werden kann, warum keine Verkürzung der Überlebenszeit in Abwesenheit von *sqst-1* stattfindet. Zur Hemmung des Proteasoms wurde eine *ubq-1* RNAi durchgeführt [314]. In *C. elegans* wird Ubiquitin durch das *ubq-1*-Gen kodiert [314, 433]. Durch den gleichzeitigen Knockdown von *sqst-1* und *ubq-1* nahm die Hitzestress-Resistenz bei 37 °C im Vergleich zur Kontrolle signifikant ab (Abbildung 4.12 A). Des Weiteren kam es unter Doppel-RNAi von *sqst-1* und *ubq-1* auch zu einer Senkung der spezifischen Proteasomaktivität um $56 \pm 12\%$ (Abbildung 4.12 B).

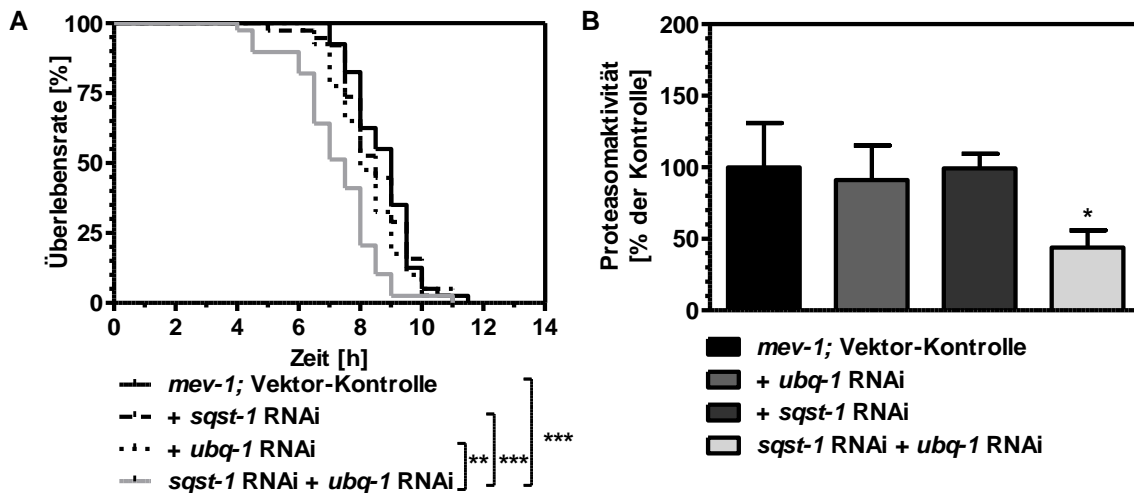


Abbildung 4.12 Die Effekte der Doppel-RNAi von *sqst-1* und *ubq-1* auf die spezifische Proteasomaktivität sowie die Hitzestress-Resistenz von *mev-1*

Die Doppel-RNAi von *sqst-1* und *ubq-1* bewirkt die Abnahme der Hitzestress-Resistenz und der spezifischen Proteasomaktivität in *mev-1*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

Es ist darauf zu hinzuweisen, dass bei Doppel-RNAi im Vergleich zur Einzel-RNAi nur die Hälfte der jeweiligen Bakterienkolonie eingesetzt wird (Kap. 3.3). Die alleinige RNAi von *sqst-1* führte, wie bereits erwähnt, zu einer signifikanten Steigerung des Proteasoms (Abbildung 4.8). Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen von *sqst-1* durch das Proteasom kompensiert wird, wobei dieses Gen kein Zielgen von Glucose und Quercetin darstellt.

Auch wurde noch mit der Western Blot-Methode analysiert, ob in Abwesenheit von SQST-1 die Konzentration der K48-verknüpften polyubiquitinierten Proteine, die vermehrt über das Proteasom abgebaut werden, im Vergleich zu den über das Aggresom eliminierten K63-verknüpften Polyubiquitinketten [54] stärker abnimmt. Wie in Abbildung 4.13 dargestellt, kam es unter *sqst-1* RNAi in den Nematoden im Vergleich zu K63-verknüpften Polyubiquitinketten zu einer Abnahme von K48-verknüpften Polyubiquitinketten, was wiederum für eine Aktivierung des Proteasoms unter *sqst-1* RNAi spricht.

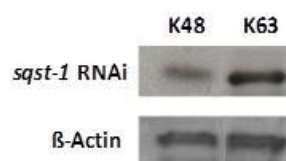


Abbildung 4.13 K48-verknüpfte Polyubiquitinketten vs. K63-verknüpfte Polyubiquitinketten unter *sqst-1* RNAi in der *mev-1*-Mutante

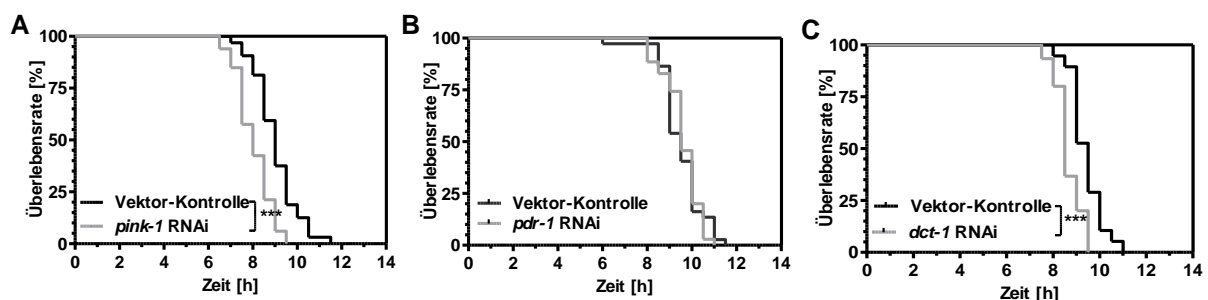
Nach dem Knockdown von *sqst-1* liegen K63-verknüpfte Polyubiquitinketten im Vergleich zu den K48-verknüpften Polyubiquitinketten vermehrt vor.

4.6 Die Bedeutung von Mitophagie-relevanten Genen für die Stressresistenz

Wie die Aggrephagie, die den selektiven Abbau von Aggresomen über Autophagie beschreibt, dient auch die Mitophagie zur Verhinderung der Ansammlung von Proteinaggregaten [434, 435]. So bilden auch funktionsgestörte Mitochondrien sogenannte perinukleäre Mito-Aggresomen, die für eine effiziente Mitophagie essentiell sind [436, 437]. Des Weiteren geht eine verminderte Elimination von geschädigten Mitochondrien mit verschiedenen Erkrankungen einher, die insbesondere im fortgeschrittenen Alter auftreten [163]. Daher spielen Mechanismen, die an der mitochondrialen Qualitätskontrolle beteiligt sind, wie die Fusion oder Fission oder die lysosomale Entfernung von Mitochondrien über Mitophagie für die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen eine wichtige Rolle [141]. Zur Untersuchung der Effekte der Mitophagie auf die Stressresistenz in *C. elegans* wurden Gene mithilfe der RNAi-Methode gehemmt, die für die mitochondriale Dynamik (*dct-1*, *glb-1*, *pdr-1*, *pgam-5*, *pink-1*) oder die Fusion (*eat-3*, *fzo-1*) bzw. für die Fission (*drp-1*, *fis-1*) der Mitochondrien relevant sind [438].

4.6.1 Der Knockdown von Mitophagie-relevanten Genen verringert die Hitzestress-Resistenz von *mev-1*

Bei der selektiven Degradation von Mitochondrien über Makroautophagie wird hauptsächlich zwischen der Rezeptor-vermittelten und der PINK1/Parkin-vermittelten Mitophagie unterschieden (Kap. 1.1.5) [163, 166]. Unter RNAi von *dct-1*, *glb-1*, *pgam-5*, *pink-1*, *eat-3*, *fzo-1*, *drp-1* und *fis-1* kam es zu einer Senkung der Hitzestress-Resistenz von *mev-1* bei 37 °C (Abbildung 4.14). Nur in Abwesenheit von Parkin, das in *C. elegans* durch *pdr-1* kodiert wird und einen wichtigen Bestandteil der PINK-1/PDR-1-vermittelten Mitophagie darstellt (Kap. 1.4.3.5) [162], fand keine Verkürzung der Lebensspanne im Vergleich zur Kontrolle statt (Abbildung 4.14 B).



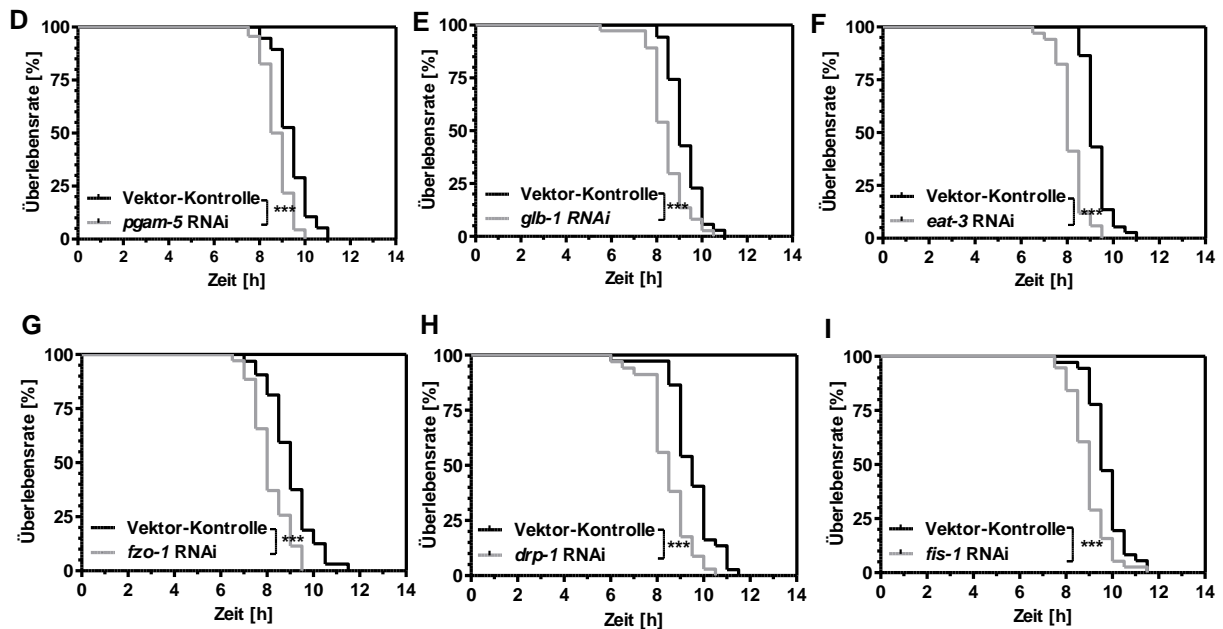


Abbildung 4.14 Der Knockdown von Mitophagie-relevanten Genen führt zu einer Abnahme der Hitzestress-Resistenz von *mev-1* bei 37 °C

Unter RNAi von Mitophagie-relevanten Genen nimmt die Lebensspanne der Nematoden bei 37 °C ab. Der Knockdown von *pdr-1* stellt eine Ausnahme dar, da die Würmer in Abwesenheit dieses Gens nicht kürzer leben. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

4.6.2 Unter RNAi von Mitophagie-relevanten Genen nimmt die Autophagie und die Bildung von Lysosomen ab

Neben dem Einfluss auf die Lebensspanne wurde auch die Bedeutung der Mitophagie-relevanten Gene für die Autophagie-Aktivität im *C. elegans*-Stamm BC12921 (*sqst-1::gfp*) untersucht. Hierbei wurde die Expression von SQST-1-GFP fluoreszenzmikroskopisch unter RNAi der jeweiligen Gene (*dct-1*, *drp-1*, *eat-3*, *fis-1*, *fzo-1*, *glb-1*, *pdr-1*, *pgam-5*, *pink-1*) analysiert. SQST-1-GFP wird im transgenen Stamm unter der Kontrolle des *sqst-1*-Promotors gebildet und bei hoher Autophagie-Aktivität vermehrt abgebaut, woraufhin die Nematoden unter dem Fluoreszenzmikroskop schwächer leuchten [408, 409]. So führte der Knockdown der Mitophagie-relevanten Gene *dct-1*, *drp-1*, *eat-3*, *fis-1*, *fzo-1*, *glb-1*, *pgam-5* sowie *pink-1* zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität in BC12921, was, wie bereits erwähnt (Kap. 3.5.2) [408], mit einer verminderten Autophagie einhergeht (Abbildung 4.15). Auch im Hinblick auf die Akkumulation von SQST-1 in Autophagosomen stellt die RNAi von *pdr-1* eine Ausnahme dar, weil danach die Fluoreszenz von SQST-1-GFP abnahm.

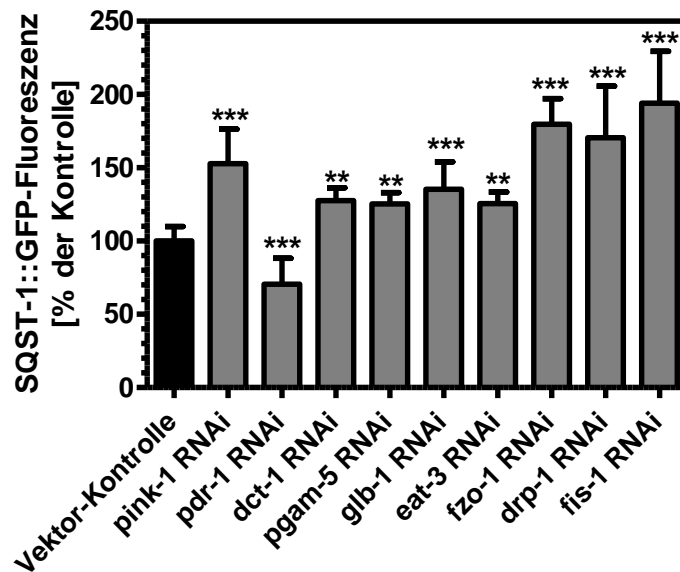
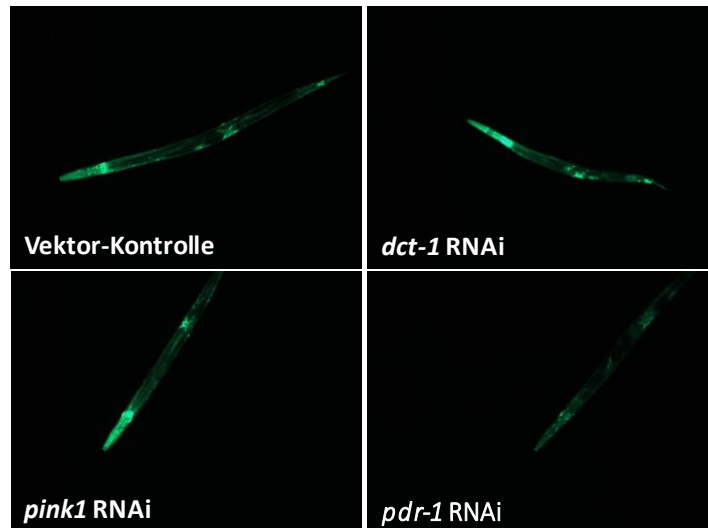


Abbildung 4.15 Unter RNAi von Mitophagie-relevanten Genen sinkt die Autophagie-Aktivität in BC12921

Der Knockdown von Mitophagie-relevanten Genen (*dct-1*, *drp-1*, *eat-3*, *fis-1*, *fzo-1*, *glb-1*, *pgam-5*, *pink-1*) reduziert die Autophagie-Aktivität in BC12921. Nur unter *pdr-1* RNAi nimmt die SQST-1::GFP-Fluoreszenz ab, was für eine erhöhte Autophagie spricht. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

Da der Grund für die erhöhte Fluoreszenzintensität in BC12921, wie in Abwesenheit von Mitophagie-relevanten Genen (außer *pdr-1*) aufgetreten, auch die verminderte Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen sein könnte, wurde anhand der Lysosomenmenge bestimmt, ob diese zu- oder abnahm. Die Quantifizierung von Lysosomen in *mev-1* erfolgte mithilfe des spezifischen Farbstoffs LysoTracker® Red und des Fluoreszenzmikroskops. Zunächst ist festzustellen, dass mit Ausnahme der *pdr-1* RNAi, alle anderen RNAis

Mitophagie-relevanter Gene zu einer Abnahme der Lysosomendichte führten, was darauf hindeutet, dass unter diesen Bedingungen tatsächlich die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen geschwächt ist. Der Knockdown von *pdr-1* resultierte allerdings in einer Zunahme der Lysosomenanzahl, was dafür spricht, dass ein funktionelles Fehlen von *pdr-1* mit erhöhter Mitophagie und Fusion von Autophagosomen und Lysosomen einhergeht.

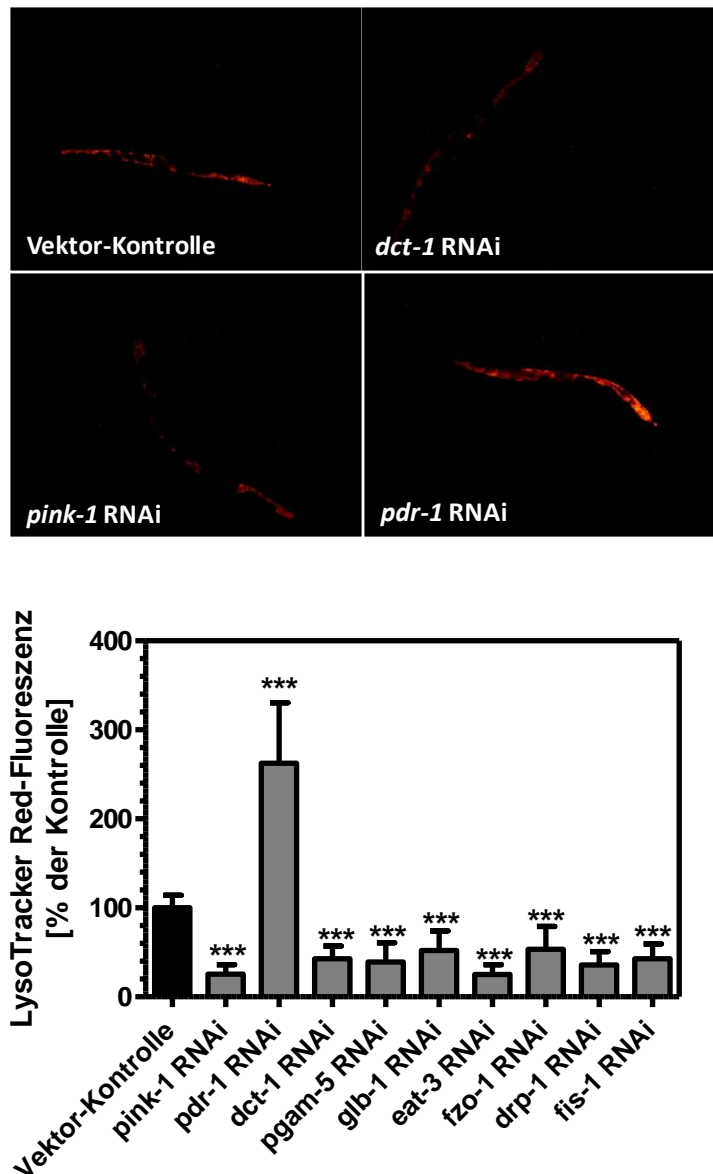


Abbildung 4.16 Die Bildung von Lysosomen nimmt nach dem Knockdown von Mitophagie-relevanten Genen ab

Unter RNAi von Mitophagie-relevanten Genen (*dct-1*, *drp-1*, *eat-3*, *fis-1*, *fzo-1*, *glb-1*, *pgam-5*, *pink-1*) sinkt die Lysosomenmenge in *mev-1*. Nur der Knockdown von *pdr-1* resultiert in einer erhöhten Bildung von Lysosomen. Die Quantifizierung dieser Organellen erfolgte mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs LysoTracker® Red. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

4.6.3 Das Fehlen von Mitophagie-relevanten Genen steigert die ROS-Produktion und die Proteinaggregation

Moderat erhöhte ROS-Spiegel sind in der Lage, als Folge einer mitochondrialen Dysfunktion Mitophagie zu induzieren [439]. Im Gegensatz dazu war zu vermuten, dass eine Störung der Mitophagie die ROS-Spiegel erhöht [440]. Ermittelt wurde die mitochondriale ROS-Produktion in der *mev-1*-Mutante durch den Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs MitoTracker® Red CM-H₂XRos. Nach dem Knockdown der Mitophagie-relevanten Gene kam es zu einer erhöhten mitochondrialen ROS-Produktion in *mev-1* (Abbildung 4.17). Im Hinblick auf die ROS-Produktion unterschied sich der Knockdown von *pdr-1* nicht von der RNAi der übrigen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mitophagie-relevanten Gene und führte somit ebenfalls zu einer vermehrten Bildung von ROS.

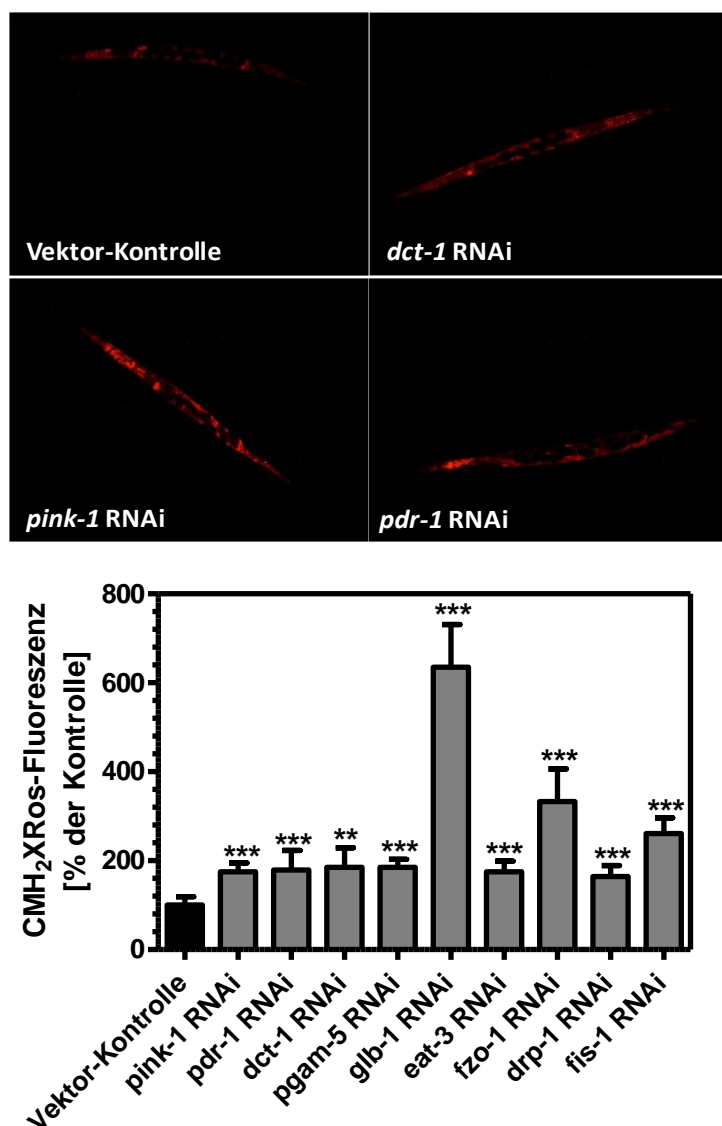


Abbildung 4.17 Unter RNAi von Mitophagie-relevanten Genen ist die mitochondriale ROS-Produktion in *mev-1* erhöht

Der Knockdown Mitophagie-relevanter Gene (*dct-1*, *drp-1*, *eat-3*, *fis-1*, *fzo-1*, *glb-1*, *pgam-5*, *pink-1*) führt zu einer Steigerung der mitochondrialen ROS-Produktion, die mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs MitoTracker® Red CM-H₂XRos quantifiziert wurde. Auch unter *pdr-1* RNAi nimmt die mitochondriale ROS-Produktion signifikant zu. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

Neben der ROS-Bildung erfolgte auch die Untersuchung der Proteinaggregation nach dem Knockdown der Mitophagie-relevanten Gene. Hierfür diente der ProteoStat® Protein aggregation assay, mit dem die Menge aggregierter Proteine in Lösung bestimmt wurde (Kap. 3.6.5). So kam es unter RNAi von Mitophagie-relevanten Genen zu einem signifikanten Anstieg der Proteinaggregation, wobei Letztere in Abwesenheit von *pdr-1* im Vergleich zur RNAi-Kontrolle unverändert blieb (Abbildung 4.18). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Proteinaggregation negativ mit der Überlebenszeit von *mev-1* unter Hitzestress korreliert – nicht aber die ROS-Spiegel.

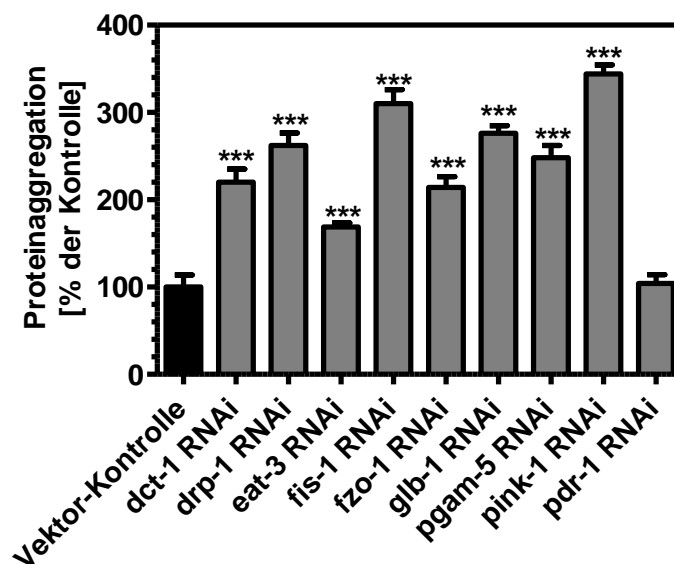


Abbildung 4.18 Der Knockdown von Mitophagie-relevanten Genen steigert die Menge aggregierter Proteine in Lösung

Unter RNAi von Mitophagie-relevanten Genen nimmt die Proteinaggregation in den Nematoden zu. Nur in funktioneller Abwesenheit von *pdr-1* bleibt die Proteinaggregation im Vergleich zur Kontrolle unverändert. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

4.6.4 Der Knockdown von Mitophagie-relevanten Genen resultiert in einer Senkung der spezifischen Proteasomaktivität

Nach dem Knockdown der Mitophagie-relevanten Gene kam es zu einer Abnahme der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasomaktivität (Abbildung 4.19). Dies kann somit auch die unter diesen Bedingungen festgestellte Steigerung der Proteinaggregation erklären. Dass die unveränderte Proteinaggregation unter *pdr-1* RNAi nicht auf einer gesteigerten Proteasomaktivität beruht, geht aus Abbildung 4.19 hervor.

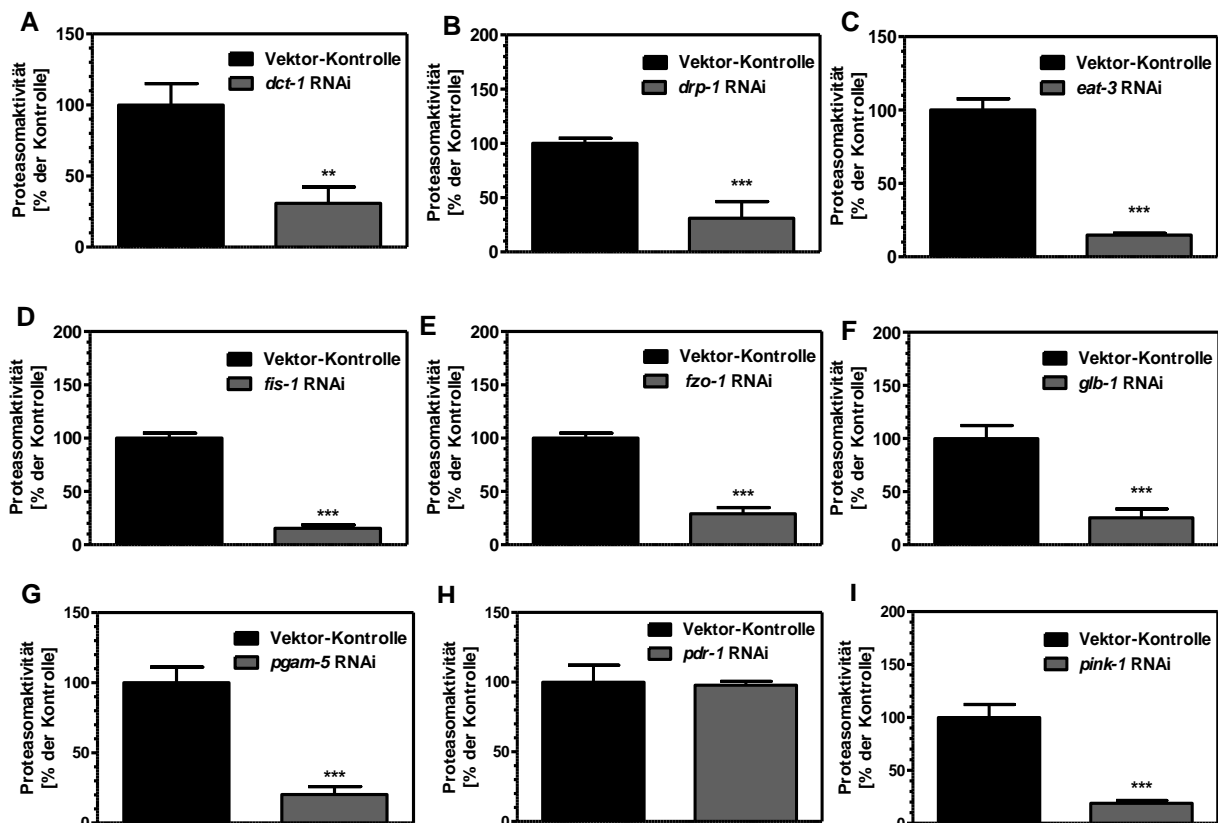


Abbildung 4.19 Die spezifische Proteasomaktivität nimmt nach dem Knockdown von Mitophagie-relevanten Genen in *mev-1* ab

In den Nematoden sinkt die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität unter RNAi von Mitophagie-relevanten Genen. In funktioneller Abwesenheit von *pdr-1* hingegen bleibt die spezifische Proteasomaktivität unverändert. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

4.6.5 Eine Störung des PINK-1/PDR-1-Signalwegs unter *pdr-1* RNAi wird durch die Rezeptor-vermittelte Mitophagie kompensiert

Da trotz des *pdr-1*-Knockdowns bzw. der Hemmung des PINK-1/Parkin-Signalwegs die Autophagie-Aktivität in *C. elegans* zunahm (Abbildung 4.15), wurde untersucht, ob für diesen Effekt die Rezeptor-vermittelte Autophagie verantwortlich sein könnte. Da neben der Überlebenszeit der Nematoden auch die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität durch das Fehlen von *pdr-1* nicht beeinflusst wurde, könnte ein alternativer Autophagieweg zur Kompensation der Lebensspanne dienen. So fand im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Durchführung eines Doppel-RNAi-Versuchs statt, bei dem *pdr-1* und *dct-1* (das Homolog zu BNIP3 und BNIP3/NIX in Säugetieren [162]) durch RNAi funktionell reduziert wurden. Dass die Überlebenszeit unter der Doppel-RNAi im Vergleich zur Kontrolle abnahm, zeigt, dass *dct-1* notwendig ist, damit es unter *pdr-1* RNAi nicht zu einer Verkürzung der Überlebenszeit kommt (Abbildung 4.20).

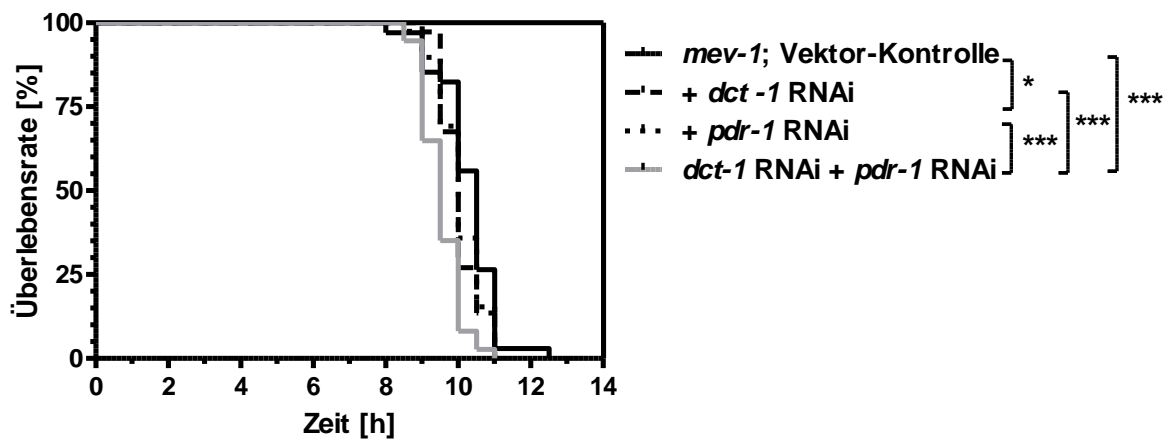


Abbildung 4.20 Unter Doppel-RNAi von *pdr-1* und *dct-1* sinkt die Hitzestress-Resistenz von *mev-1* bei 37 °C

Die Überlebenszeit der Nematoden ist nach der gleichzeitigen Hemmung der PDR- und der DCT-1-vermittelten Mitophagie signifikant verkürzt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

4.7 Der Knockdown von Aggresom-relevanten Genen reduziert die Bildung von Lysosomen

Neben Mitophagie-relevanten Genen wurde auch die Bedeutung von Aggresom-relevanten Genen (*ubql-1* und *sqst-1*) für die Autophagie-Aktivität im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Dies erfolgte erneut durch die Verwendung des transgenen Nematodenstamms BC12921, der die Ermittlung der SQST-1-GFP-Menge und somit auch die Quantifizierung der Autophagie-Aktivität ermöglicht (Kap. 3.5.2). Da die Adaptorproteine an der Bildung von Aggresomen beteiligt sind, die von Autophagosomen aufgenommen und degradiert werden [57], wurde erwartet, dass der Knockdown von *ubql-1* und *sqst-1* zu einer verminderten Autophagie-Aktivität in *mev-1* führt. Unter RNAi von *ubql-1* nahm die Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle um $19 \pm 8 \%$ ab (Abbildung 4.21 A), was normalerweise bedeutet, dass sich die Autophagie-Aktivität in Abwesenheit von *ubql-1* erhöht. Jedoch wurden nach dem Knockdown dieses Gens weniger Lysosomen mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessen (Abbildung 4.21 B). Daher lässt sich vermuten, dass unter *ubql-1* RNAi die aggregierten Proteine weniger oder nicht mehr zu Autophagosomen transportiert werden und somit die Degradation von Proteinen über den autophagosomalen bzw. lysosomalen Abbauweg abnimmt. Des Weiteren kam es nach dem Knockdown von *sqst-1* zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität um $15 \pm 10 \%$ bzw. zu einer Senkung der Autophagie-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 4.21 A). Dies stimmte mit dem Ergebnis der Bestimmung der Lysosomenbildung überein, die mittels LysoTracker® Red gemessen wurde (Abbildung 4.21 B) und deutet darauf hin, dass in funktioneller Abwesenheit von *sqst-1* die Elimination der aggregierten Proteine über Autophagosomen bzw. Lysosomen abnimmt.

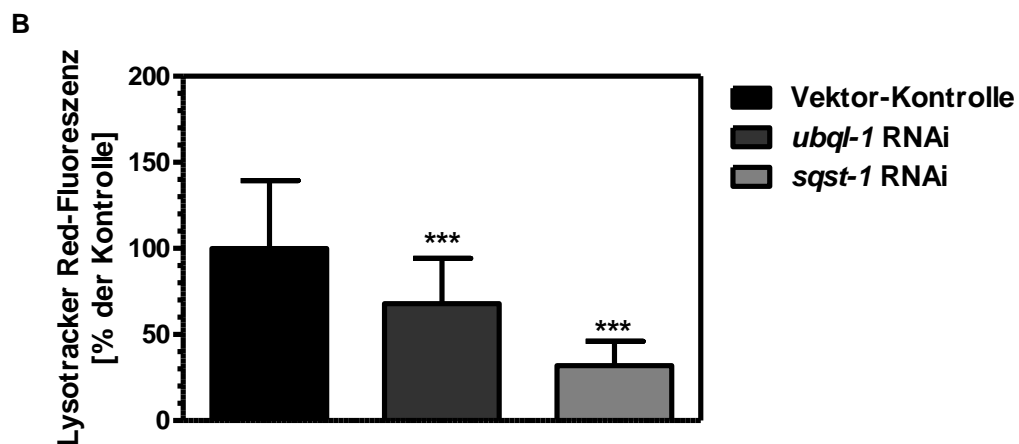
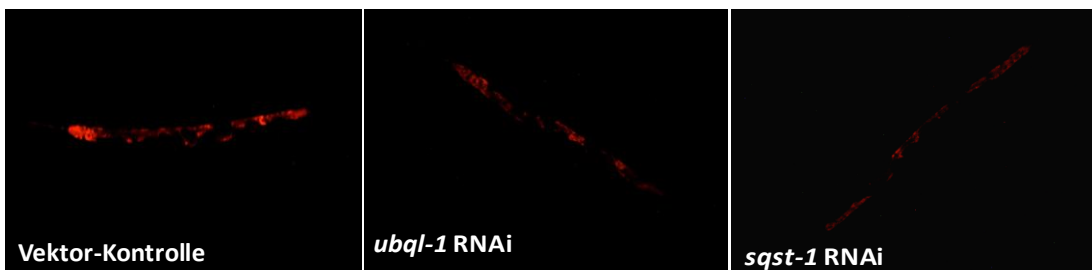
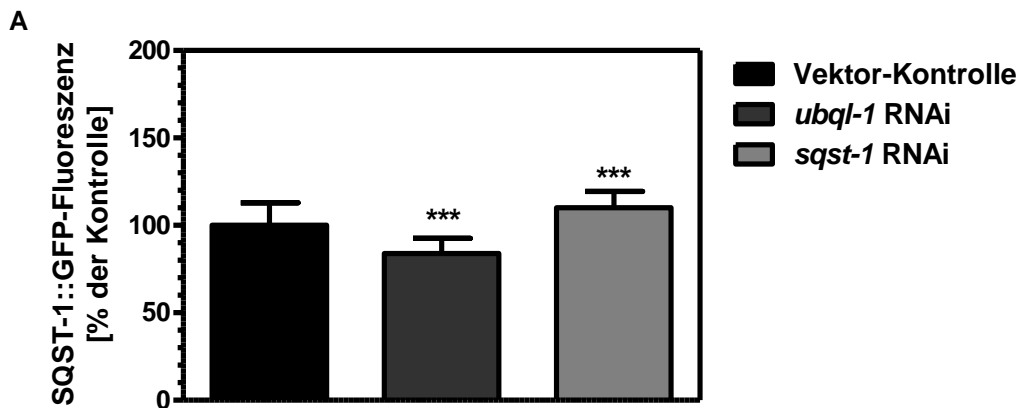


Abbildung 4.21 Der Einfluss von Aggresom-relevanten Genen auf die Autophagie-Aktivität und die Lysosomenbildung

Nach dem Knockdown von *sqst-1* nimmt die Autophagie-Aktivität (A) bzw. die Bildung von Lysosomen (B) in den Nematoden ab. Die Lysosomenmenge ist auch unter *ubql-1* RNAi in der *mev-1*-Mutante verringert. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

5 Diskussion

Neben der durchschnittlichen Lebenserwartung ist auch die Zahl chronischer altersbedingter Erkrankungen in den letzten zwei Jahrhunderten, insbesondere bei sitzenden und überernährten Bevölkerungsgruppen, gestiegen [2]. Dies schließt neurodegenerative oder metabolische Gesundheitsstörungen wie Alzheimer oder Diabetes mellitus mit ein [2, 441]. Demnach wurden im Jahr 2015 weltweit ungefähr 415 Millionen Diabetes-Patienten zwischen 20 und 79 Jahren registriert, wovon 5 Millionen an den Folgen dieser Krankheit gestorben sind [442]. Laut Prognosen wird die Zahl der an Diabetes mellitus erkrankten Menschen bis 2040 ca. 642 Millionen erreichen [442]. Da die derzeitigen medizinischen Behandlungsmöglichkeiten mit Kostenfaktoren, geringer Therapietreue sowie Nebenwirkungen einhergehen, besteht ein Interesse an komplementären und alternativen Agenzien bzw. Medikamenten auf pflanzlicher Basis [252, 443–445].

Grundlage des Alterns sowie altersbedingter Erkrankungen sind falsch- oder fehlgefaltete Proteine im Organismus, die sich im Alter ansammeln und toxisch wirken [446, 447]. Zu einer Akkumulation von Proteinen führt die Überlastung der sogenannten Proteinqualitätskontrolle, die aus Mechanismen zur korrekten Faltung und Degradation von Proteinen besteht [447]. So werden die verschiedenen Systeme zur Aufrechterhaltung der Proteom-Integrität und der Proteostase unter dem Begriff Proteostase-Netzwerk zusammengefasst [7, 12]. Hierbei sind als erste Kontrollstation die molekularen Chaperone zu nennen, die bereits nach der Biosynthese die Proteine vor einer Falschfaltung schützen [447, 448]. Zusätzlich sind sie ebenso an der Rückfaltung von Proteinen beteiligt, die beispielsweise durch bestimmte Stressfaktoren wie Hitze oder ROS fehlgefaltet werden [449]. Des Weiteren können einige HSPs den Abbau von falsch gefalteten oder denaturierten Proteinen durch das UPS fördern [449, 450]. Letzteres ist für die Degradation von intrazellulären Proteinen nach deren Ubiquitinierung verantwortlich [48]. Eine Störung des UPS bewirkt, dass sich falsch gefaltete Proteine in Einschlusskörperchen namens Aggresomen zusammenschließen, an deren Bildung verschiedene Adaptorproteine beteiligt sind [57]. Abgebaut werden die aggregierten Proteine in den Lysosomen nach der Aufnahme von Aggresomen durch Autophagosomen [451]. Hierbei ist auch die selektive Elimination von bestimmten Organellen, wie Mitochondrien, möglich [451, 452]. Die Akkumulation von geschädigten Mitochondrien ist ebenso ein Kennzeichen des Alterns, wobei diese weniger ATP, jedoch vermehrt ROS produzieren [453]. Dies weist auf einen Teufelskreis hin [454, 455]. Die mitochondriale ROS-Produktion in gealterten Mitochondrien führt zu Mutationen in mitochondrialer DNA und somit auch zu Funktionseinbußen der durch sie kodierten Atmungskettenkomplexe [454, 456]. Als Folge der funktionell eingeschränkten Atmungskettenproteine nimmt die ROS-Bildung zu [456].

Neurodegenerative oder metabolische Erkrankungen wie Diabetes mellitus sind mit solchen Prozessen assoziiert [441]. Die Entfernung von geschädigten Mitochondrien durch Mitophagie minimiert damit nicht nur die ROS-Produktion, sondern führt gleichzeitig zu einer gesteigerten Neubildung von Mitochondrien [457].

Zur Untersuchung der Elimination von geschädigten Proteinen unter diabetischen Bedingungen kam es in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz des *C. elegans*-Stammes *mev-1*. Dieser weist aufgrund einer mitochondrialen Mutation im Komplex II der Atmungskette eine erhöhte ROS-Produktion auf [314]. Der transparente Körper der Nematoden ermöglichte es [278], die Bildung von ROS, die Mitophagie bzw. die Bildung von Autophagosomen oder Lysosomen im lebenden Organismus fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. Daneben fand auch die Analyse der Lebensspanne, der Proteasomaktivität oder der Aggresombildung in *mev-1* statt. Unter RNAi von Aggresom-relevanten Genen erfolgte auch gleichzeitig die Behandlung der Würmer mit Glucose und Quercetin. Die Inkubation der Nematoden mit 10 mM Glucose führt zu einer endogenen Glucosekonzentration von ca. 8 mM [314]. Dies würde beim Menschen einer Blutglucosekonzentration von 144 mg/dl entsprechen, was mit einer gemäßigten diabetischen Stoffwechsellage einhergeht [458]. Bei Quercetin handelt es sich um ein Polyphenol, das bereits in verschiedenen *in vivo*-Studien potentiell gesundheitsfördernde Effekte zeigte [252, 256]. So wurde auch herausgefunden, dass dieses Flavonol in *C. elegans* durch die Modulation einzelner Bestandteile des Proteostase-Netzwerkes Glucosetoxizität verhindert [256].

5.1 Glucosetoxizität und deren Verhinderung durch Quercetin

Hyperglykämie gilt für die Komplikationen von Diabetes mellitus als verantwortlich [459]. So bewirkt diese, als Folge der Generierung von ROS, die Aktivierung verschiedener pathogener Mechanismen, die u.a. in der Bildung von AGEs oder Polyolen resultieren [193, 459]. Dass Glucose zu einer Verkürzung der Lebensspanne von *C. elegans* führt, wurde bereits 2009 durch Schlotterer *et al.* herausgefunden und damit die Bedeutung der Nematoden als Modellorganismus für die Forschung von Diabetes mellitus gezeigt [310]. Hierbei kam es beispielsweise durch AGEs zu einer Störung der Proteostase [196]. Fitzenberger *et al.* fanden heraus, dass Glucose in der *mev-1*-Mutante durch die Abnahme der Proteasomaktivität eine verringerte Hitzestress-Resistenz verursacht [314]. Auch in Endothelzellen sowie in diabetischen Mäusen kam es nach der Exposition gegenüber hohen Glucosekonzentrationen durch die Methylglyoxal-induzierte Modifikation des 20S-Proteasoms zu einer Verminderung der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasomaktivität [208]. Bei Diabetes-Patienten wurde neben einer verminderten Aktivität des UPS auch eine

verringerte Produktion von Genen des 26S-Proteasoms ermittelt, was in Übereinstimmung mit einer anderen Studie steht, in der in den β -Zellen von Typ 2-Diabetikern eine Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen auftrat [460]. Des Weiteren führten hohe Glucosekonzentrationen in Säugetierzellen auch zu einer Abnahme der Autophagie-Aktivität [461]. Unter Glucose-armen Bedingungen hingegen kam es durch die Hemmung des mTOR-Signalweges zur Induktion der Autophagie [462, 463]. Des Weiteren wird auch die selektive Autophagie bzw. Mitophagie durch Glucose aufgrund der erhöhten Produktion von ROS negativ beeinflusst, weshalb die Akkumulation von geschädigten Mitochondrien auftritt [464]. In humanen Monozyten bzw. Makrophagen resultierte die Inkubation mit erhöhten Glucosekonzentrationen in einer Verringerung der proteolytischen und lipolytischen Aktivität in Lysosomen, was bei Diabetes-Patienten durch die verminderte Elimination und die Akkumulation von modifizierten (Lipo-) Proteinen zur Entwicklung von Atherosklerose beitragen könnte [465]. Berichtet wurde auch, dass Hyperglykämie zu einer Induktion der UPR als Folge von ER-Stress führt und somit u.a. das Risiko von endothelialer Dysfunktion bei Typ 2-Diabetikern erhöht [466–468]. Zur Verhinderung der glucotoxischen Effekte kam es bisher in unterschiedlichen Studien zum Einsatz von verschiedenen Polyphenolen wie z.B. Resveratrol oder Quercetin [469, 470]. Letzteres zeigte unter Exposition gegenüber erhöhten Glucosekonzentrationen auch in *C. elegans* protektive Effekte [256, 310]. Demnach wurde durch das Polyphenol Quercetin die Glucose-bedingte Verkürzung der Überlebenszeit von *C. elegans* unter Hitzestress verhindert [256]. Auch in einer anderen Studie konnte die Lebensspanne der Nematoden mit Quercetin durch die erhöhte Translokation von DAF-16 und die dadurch verursachte Aktivierung von Stress-Antwortgenen verlängert werden [239]. Die Kompensation glucotoxischer Effekte scheint damit mehr durch transkriptionelle Aktivierung als durch antioxidative Wirkungen dieses Polyphenols verursacht zu sein [239, 256]. So erfolgte der lebensverlängernde Effekt von Quercetin in der *mev-1*-Mutante in Abhängigkeit von der UPR und durch die Aktivierung des UPS [256]. Diesbezüglich fand nach dem Knockdown von bestimmten Genen der UPR bzw. des UPS keine lebensverlängernde Wirkung durch Quercetin in mit Glucose behandelten Nematoden statt [256]. Da eine Hemmung oder Überlastung des Proteasoms mit der Bildung von Aggresomen in Verbindung gebracht wird [53], wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welche Rolle das Aggresom für die protektiven Wirkungen des Polyphenols Quercetin gegenüber glucotoxischen Effekten spielt.

5.2 Die Bedeutung des Aggresoms für die Stressresistenz

5.2.1 Die Elimination von Proteinaggregaten über das Aggresom stellt eine wichtige Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Lebensspanne dar, wobei *dnc-1* und *ubql-1* zwei Zielgene von Glucose und Quercetin darstellen

Die altersbedingte Abnahme der Proteostase resultiert in einer verminderten Löslichkeit und einer erhöhten Proteinakkumulation [471]. Letztere stellt jedoch nicht nur eine Folge, sondern ihrerseits auch eine Ursache einer verminderten Proteostase dar [472]. Demnach werden von der Aggregation auch Bestandteile des Proteostase-Netzwerkes betroffen, was die zellulären Funktionen beeinträchtigt [471]. Bei der Zellviabilität und Lebensspanne eines Organismus gilt somit die Proteinaggregation als ein entscheidender Faktor [472]. Eine altersbedingte Akkumulation von unlöslichen Proteinen weist auch *C. elegans* auf und eignet sich dementsprechend nicht nur wegen seiner kurzen Lebensdauer als ein Modellorganismus zur Untersuchung der Bedeutung von Aggresomen in Bezug auf die Überlebenszeit der Nematoden [473, 474].

Als ein 63 kDa schweres UBA-UBL-Protein spielt UBQLN1 durch die Bindung von K48- und K63-polyubiquitinierten Proteinen bei der Proteostase eine wichtige Rolle [475]. Somit ist UBQLN1 nicht nur am proteasomalen Abbau, sondern auch an der Elimination von Proteinen über das Aggresom beteiligt [57, 475]. Kodiert wird das Adaptorprotein UBQLN1 [57] in *C. elegans* durch das Gen *ubql-1* [476], nach dessen Knockdown in der vorliegenden Arbeit die *mev-1*-Mutante im Vergleich zur Kontrollgruppe kürzer lebte. Des Weiteren führte das Fehlen von *ubql-1* auch in anderen Studien zu einer verkürzten Lebensspanne von *C. elegans* oder *Drosophila* [476–478]. Im Gegensatz dazu resultierte die Überexpression von Ubiquilin-1 in einem Mausmodell der Chorea Huntington in einer Verlängerung der Lebensspanne [477]. In Abwesenheit dieses Gens wurde in der vorliegenden Arbeit die Glucose-bedingte Verringerung als auch die durch Quercetin ausgelöste Verlängerung der Lebensspanne unter Glucoseexposition verhindert. Dies weist darauf hin, dass Glucose die Überlebenszeit durch Inhibition von *ubql-1* reduziert und Quercetin die Lebensdauer bei 37 °C durch dessen Aktivierung wieder verlängert. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des Aggresoms für die Stressresistenz und die Lebensspanne von Organismen.

Auch kam es in den Nematoden in funktioneller Abwesenheit von *ubql-1* zu einer vermehrten Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen, während die Überexpression dieses Gens in einer verzögerten Akkumulation von Proteinaggregaten resultierte [476, 477]. In der vorliegenden Arbeit fand die Ermittlung der Proteinaggregation in TK22 mittels ProteoStat® Protein *aggregation* assay statt. Hierbei wurde die durch Glucose erhöhte Menge

aggregierter Proteine durch die gleichzeitige Gabe von Quercetin wieder gesenkt. Die durch RNAi von *ubql-1* erhöhte Proteinaggregation wurde weder durch Glucose weiter gesteigert noch durch Quercetin wieder vermindert. Auch dies verdeutlicht die Aussage, dass *ubql-1* ein Zielprotein und damit das Aggresom eine Zielstruktur sowohl von Glucose als auch von Quercetin ist.

Für UBQLN1 wurde gezeigt, dass es über die UBA-Domäne ubiquitinierte Proteine bindet und durch die Interaktion zwischen der UBL-Domäne und der S5a/Rpn10/p54-Untereinheit des Proteasoms die proteasomale Degradation von Substraten fördert [478, 479]. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivität des Proteasoms in Abwesenheit von UBQL-1 abnehmen müsste. Tatsächlich führte in der vorliegenden Arbeit das Fehlen von *ubql-1* in der *mev-1*-Mutante zu einer Senkung der Proteasomaktivität. Dass das Polyphenol Quercetin unter RNAi von *ubql-1* nicht mehr die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität steigert, zeigt die Abhängigkeit des Proteasoms von *ubql-1*, über das das UPS ebenfalls zu einer Zielstruktur des Polyphenols Quercetin wird. Weiterhin stellt die Reduktion der Proteasomaktivität in funktioneller Abwesenheit von *ubql-1* wahrscheinlich auch eine Überlastung des Proteasoms als Folge der Zunahme der Proteinaggregation aufgrund einer eingeschränkten Aggresombildung dar [480, 481].

Neben dem UPS ist UBQLN1 auch am proteasomalen Abbau von Substraten über ERAD beteiligt [63]. So kommt es durch die Zunahme von falsch gefalteten ERAD-Substraten zur Rekrutierung von Ubiquilin-1 zum ER [476]. Daraufhin fördert UBQLN1 den Transport von Membran-gebundenen und luminalen ERAD-Substraten aus dem ER ins Cytosol sowie deren Degradation über das Proteasom [476]. Dies erfolgt mithilfe von anderen ERAD-Proteinen, wie z.B. Erasin oder Herp (*homocystein-induced ER protein*) [476, 482]. Bei Letzterem handelt es sich um ein in der ER-Membran vorkommendes Protein, das bei ER-Stress aktiviert wird [482]. Es interagiert an der cytosolischen Seite des ERs mit verschiedenen Ubiquilinen, wie Ubiquilin-1, woraufhin ubiquitinierte Substrate rekrutiert und über den proteasomalen Abbau eliminiert werden [482]. Erasin hingegen bewirkt die Rekrutierung von p97/VCP sowie Ubiquilin-1 zum ER und fördert durch die Bildung eines Komplexes die Degradation von ubiquitinierten ERAD-Substraten über das Proteasom im Cytosol [476]. Nicht nur der Knockdown von Erasin, sondern auch das Fehlen von UBQLN1 löste *in vitro* ER-Stress aus, was auf die Störung der ERAD und somit auch auf den verminderten Abbau von falsch gefalteten Proteinen im ER zurückgeführt werden könnte [476]. Tatsächlich führte auch in *C. elegans* eine *ubql-1* RNAi zu einer erhöhten *hsp-4*-Expression als Folge einer UPR^{ER}-Aktivierung [476]. Da das BiP/GRP78-Homolog *hsp-4* bei ER-Stress vermehrt gebildet wird [333], wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression dieses Chaperons als Indikator der UPR^{ER}-Aktivität fluoreszenzmikroskopisch gemessen. Es wurde eine Zunahme der *hsp-4*-Expression nach dem Knockdown von *ubql-1*, aber auch von

dnc-1 und *sqst-1* in den Nematoden ermittelt. In anderen Studien kam es in Würmern, die mit milder Hitze behandelt wurden, zu einer hormetischen Verlängerung der Überlebenszeit, die mit den HSP-4-Spiegeln korrelierte [321, 483]. Demnach spielt *hsp-4* bei der Regulation der Überlebenszeit der Nematoden eine wichtige Rolle, wobei die erhöhte Bildung von HSP-4 im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Kompensation der *ubql-1* RNAi-induzierten Lebenszeitverkürzung bei 37 °C nicht ausreichend war.

Aggresom-relevante Proteine beeinflussen nicht nur die UPR^{ER}, sondern auch offenbar die Autophagosomenbildung, indem z.B. UBQL-1 mit seiner UBL- bzw. seiner UBA-Domäne die Bildung von Aggresomen sowie den Transport von aggregierten Proteinen zu Autophagosomen fördert [62]. Ubiquilin selbst wird auch über Autophagie eliminiert [484]. Des Weiteren wurde *in vitro* gezeigt, dass die cytoprotektiven Effekte von UBQLN1 von der Autophagie abhängen [485]. Demnach ging der Knockdown dieses Gens nicht nur mit einem vermehrten Zelltod, sondern auch mit einer verminderten Bildung und Reifung von Autophagosomen einher [477]. Diesbezüglich resultierte in HeLa-Zellen das Fehlen von UBQLN1 in einer Reduktion der LC3-II-Konzentrationen, während die LC3-I-Spiegel zunahmten, was auf die verminderte Reifung von Autophagosomen hindeutet [484, 486, 487]. Daher wäre zu erwarten gewesen, dass in den Nematoden die Autophagie-Aktivität unter *ubql-1* RNAi abnimmt. In der vorliegenden Arbeit kam es jedoch unter *ubql-1* RNAi zu einer Senkung der SQST-1::GFP-Fluoreszenz. Dies geht normalerweise mit einer Zunahme der Autophagie-Aktivität einher [408]. Allerdings lässt sich die verminderte SQST-1::GFP-Fluoreszenz nach dem Knockdown von *ubql-1* nur in Verbindung mit der Intensität des LysoTracker-Farbstoffs interpretieren. Demnach ist aufgrund der Abnahme der Lysosomenbildung zu vermuten, dass in funktioneller Abwesenheit des Adaptorproteins UBQL-1 die aggregierten Proteine offenbar weniger in die Autophagosomen und letztendlich in die Lysosomen gelangen. So verzögerte die Abwesenheit von UBQLN1 in HeLa-Zellen die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen und verhinderte somit den Abbau von Autophagosomen [485]. Dies stimmt mit der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Abnahme der Lysosomenmenge überein und deutet darauf hin, dass das funktionelle Fehlen von *ubql-1* in den Nematoden zu einer verminderten Proteindegradation via Autophagie führt.

Neben UBQL-1 spielt auch Dynactin bei der Bildung von Aggresomen und somit bei der Elimination von Proteinaggregaten eine wichtige Rolle und stellt einen essentiellen Bestandteil des Dyneinmotorkomplexes dar [57, 488, 489]. Dieser ist für die Beförderung von aggregierten Proteinen zum Minusende der Mikrotubuli verantwortlich [57]. Hierbei bewirkt der Dynactin-Komplex die Anheftung der zu transportierenden Substrate an Dynein [490]. Er ist aufgebaut aus zwei morphologisch unterschiedlichen über Dynamitin miteinander verbundenen Domänen, wobei die stabförmige Domäne zur Substratbindung dient und die verlängerte Domäne bzw. das Homodimer p150^{Glued}, die Verbindung zwischen Dynein und

den Mikrotubuli herstellt [490]. Die Dynactin-Untereinheit p150^{Glued}, die in *C. elegans* durch *dnc-1* kodiert wird [359], besteht hingegen aus drei globulären Regionen sowie zwei superspiralisierten Domänen und sorgt zusätzlich für die Interaktion zwischen Dynactin und Dynein [491]. So ist DNC-1 am retrograden Transport von Autophagosomen durch das Axon zum Zellkörper beteiligt [492].

Wie bei *ubq1-1* kam es auch unter *dnc-1* RNAi in der vorliegenden Arbeit zu einer Verkürzung der Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei auch dieser Knockdown die weitere Verringerung der Überlebenszeit durch Glucose und die Verlängerung der Überlebenszeit von Glucose-exponierten Nematoden durch Quercetin verhinderte. Bei alten Mäusen verursachte die genetische Depletion dieser Dynactin-Untereinheit neben einer Akkumulation von acetyliertem α -Tubulin und autophagosomalen/lysosomalen Proteinen auch den Abbau von spinalen Motoneuronen [493]. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lässt sich postulieren, dass die spezifische Proteasomaktivität in funktioneller Abwesenheit von *dnc-1* aufgrund der erhöhten Proteinaggregation und einer damit verbundenen Überlastung des Proteasoms abnimmt [481]. Die Feststellung, dass unter Knockdown von *dnc-1* die angestiegene Menge aggregierter Proteine weder durch Glucose weiter erhöht, noch durch Quercetin gesenkt werden konnte, drückt aus, dass auch *dnc-1* ein Zielgen beider Effektoren darstellt.

Auch DNC-1 scheint mit dem ERAD in Verbindung zu stehen, da dessen Fehlen eine Zunahme der *hsp-4*-Expression bewirkte [476, 494]. Weiterhin resultierte eine Punktmutation in der p150^{Glued}-Untereinheit von Dynactin neben einer Störung der Dynactin-Funktion auch in einem Anstieg der Proteinaggregation [495]. Die Zunahme der Proteinaggregation in der *mev-1*-Mutante unter *dnc-1* RNAi stellt möglicherweise einen Effekt der verminderten Bildung von Aggresomen und ihrer reduzierten Elimination über Autophagosomen dar, da der retrograde Transport entlang der Mikrotubuli in Abwesenheit von *dnc-1* gestört wird [429]. So kam es in den Motoneuronen von *C. elegans* nach dem Knockdown von *dnc-1* nicht nur zu einer verminderten Beförderung von Autophagosomen, sondern auch zu deren Akkumulation [429].

5.2.2 Das Aggresom-relevante Gen *sqst-1* ist kein Zielgen von Glucose und Quercetin

Wie bereits erwähnt, stellt SQST-1 in *C. elegans* das Homolog zu SQSTM1/p62 dar, das als ein Adaptorprotein an der Aggresombildung und der Autophagie beteiligt ist [69, 364]. Demzufolge bewirkt es nicht nur die Aufnahme von Proteinen in die Autophagosomen für den lysosomalen Abbau, sondern auch die Bildung von Aggregaten aus polyubiquitinierten

Proteinen [496, 497]. Mit seiner UBA-Domäne ermöglicht das Adaptorprotein SQST-1 die Erkennung und die Aufnahme von ubiquitinierten Proteinen ins Autophagosom [65, 498, 499]. Weiterhin wurde berichtet, dass dieses Protein auch andere zelluläre Prozesse wie Inflammationen, Apoptose oder Zellüberleben beeinflusst [500]. Da p62 durch die Bindung bzw. den Abbau von falsch gefalteten Proteinen eine Störung von zellulären Funktionen verhindert, gilt es als cytoprotektiv [501, 502]. Das funktionelle Fehlen von SQST-1 schien jedoch keinen Einfluss zu haben, da die RNAi weder die Lebensspanne der *mev-1*-Mutante bei 37 °C beeinflusste, noch die Verkürzung der Überlebenszeit durch Glucose und die Wiederherstellung durch die zusätzliche Gabe von Quercetin verhinderte. Dies zeigt zunächst, dass *sqst-1* kein Zielgen der beiden Substrate im Hinblick auf die Beeinflussung der Stressresistenz der Nematoden darstellt. Allerdings kam es in der vorliegenden Arbeit unter *sqst-1* RNAi zu einer deutlichen Störung der Autophagie. Dies lässt vermuten, dass entsprechende Kompensationsmechanismen der Proteostase aktiviert werden. Auch *in vitro* fand durch den Knockdown von SQSTM1/p62 eine verminderte Zufuhr von Substraten zu Autophagosomen und somit eine ineffiziente Autophagie statt [496]. Letztere war auch in Krebszellen nach dem Knockdown von p62 verringert [503]. Des Weiteren ging im Hypothalamus von Mäusen die Abwesenheit von p62 mit einer Störung der Autophagie einher [504]. In HeLa-Zellen, die mit dem mitochondrialen Entkoppler CCCP (*carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone*) [505] behandelt wurden, resultierte der Knockdown von p62 in einer verminderten Elimination von geschädigten Mitochondrien, was darauf hinweist, dass dieses Protein auch für die Mitophagie essentiell ist [177]. Dass der Knockdown von p62 zu einem Anstieg der ROS-Produktion und des Mitophagie-Markers PINK1 führte, deutet auch darauf hin, dass die Degradation von geschädigten Mitochondrien, welche mit erhöhten Konzentrationen von ROS und PINK1 einhergehen, in Abwesenheit von p62 abnimmt [506]. Diese Ergebnisse stimmen mit der Abnahme der Autophagie bzw. der verminderten Bildung von Lysosomen unter *sqst-1* RNAi in der vorliegenden Arbeit überein. Untersuchungen an Fibroblasten aus Mäuseembryonen zeigten, dass p62 durch die Bindung von ubiquitinierten Proteinen für die Aggresombildung benötigt wird [70], wobei es auch durch die Interaktion mit LC3 die Rekrutierung von Autophagosomen bewirkt [503]. Durch den Knockdown von p62 kam es in Zellen mit einer gehemmten Autophagie zu einer vermehrten Entstehung von Polyglutamin-Aggregaten [507], die neurotoxisch wirken [508]. Im Rahmen einer *in vitro*-Studie resultierte das Fehlen von p62 in Zellen, in die pathogenes, Zelltod-verursachendes Ataxin-3-Protein transfiziert wurde, in einer verminderten Bildung von Aggresomen [69]. Dies deutet darauf hin, dass in Abwesenheit von SQST-1 keine Aggresomen entstehen und somit auch keine Degradation der aggregierten Proteine über Autophagosomen erfolgt.

Auch unter *sqst-1* RNAi kam es in der vorliegenden Arbeit zu einem Anstieg der *hsp-4* Expression, sodass zunächst untersucht wurde, ob dies die Ursache der nicht verkürzten

Überlebenszeit unter *sqst-1* RNAi war. In einer Mausstudie erfolgte nach dem Knockdown von p62 auch die Induktion von ER-Stress, der an der erhöhten Synthese von UPR-Markern, wie CHOP oder ATF-4, den Bestandteilen des PERK-Signalweges, ermittelt wurde [504]. Allerdings trat bei Doppel-RNAi gegenüber *hsp-4* und *sqst-1* kein lebensverkürzender Effekt auf, womit die Kompensation des Fehlens von SQST-1 durch HSP-4 ausgeschlossen wurde. Neben *hsp-4*, das nach der Induktion des IRE-1-Signalweges bzw. nach dem Spleißen der *xbp-1* mRNA gebildet wird, ist auch PERK an der Aktivierung von p62 beteiligt [404, 509]. Bei ER-Stress bewirkt das Transmembranprotein über die Phosphorylierung von eIF2 α die Expression von ATF4, woraufhin der Transkriptionsfaktor u.a. die Expression von p62 auslöst, um das Zellüberleben zu fördern [509–511]. Auch wenn das gleichzeitige Fehlen von *ire-1* und *xbp-1* in *mev-1* durch die hormetischen Effekte von *pek-1* kompensiert wurde [404], konnte eine protektive Wirkung von *pek-1* in Abwesenheit von SQST-1 nicht beobachtet werden. Abzuleiten ist dies wiederum aus den Ergebnissen der Doppel-RNAi von *sqst-1* und *pek-1*, die ebenfalls keine Verkürzung der Überlebenszeit bei 37 °C bewirkte. Dies deutet darauf hin, dass die molekularen Chaperone bzw. die Proteine der UPR^{ER} nicht an der Aufrechterhaltung der Lebensspanne unter *sqst-1* RNAi beteiligt sind.

Weiterhin wurde auch eine Interaktion von p62 mit dem Proteasom bereits gezeigt. So führte der Knockdown dieses Gens *in vitro* zu einem verminderten Zellüberleben, was auf die gesenkte Proteasomaktivität zurückgeführt wurde [512], während in der vorliegenden Arbeit die *sqst-1* RNAi die Proteasomaktivität erhöhte und dadurch die Verkürzung der Überlebenszeit der Nematoden verhinderte. Postuliert werden muss für *C. elegans*, dass in Abwesenheit von SQST-1 andere Adaptorproteine, aufgrund der Hemmung der Autophagie, vermehrt Proteine zum UPS transportieren. Dies könnte z.B. in *C. elegans* durch CDC-48 gelenkt werden, dessen Säugetier-Homolog p97 am proteasomalen Abbau beteiligt ist [351, 513, 514]. Demnach konkurriert p97 mit p62 um die Bindung an ubiquitinierte Proteine und deren Transport zum UPS [513]. CDC-48 könnte somit in Abwesenheit von SQST-1 dessen Funktion effizienter mit übernehmen und für die gemessene erhöhte Proteasomaktivität verantwortlich sein. Dass p97 neben K11-verknüpften Ubiquitinketten auch K48-verknüpfte polyubiquitinierte Proteine bindet, die vermehrt über das UPS abgebaut werden [515–518], unterstützt diese Hypothese. Des Weiteren deuten auch die Western-Blot-Untersuchungen darauf hin, dass in *mev-1* unter *sqst-1* RNAi K48-verknüpfte polyubiquitinierte Proteine stärker abgebaut werden, während die K63-polyubiquitinierten Proteine vermutlich aufgrund der gehemmten Autophagie akkumulieren.

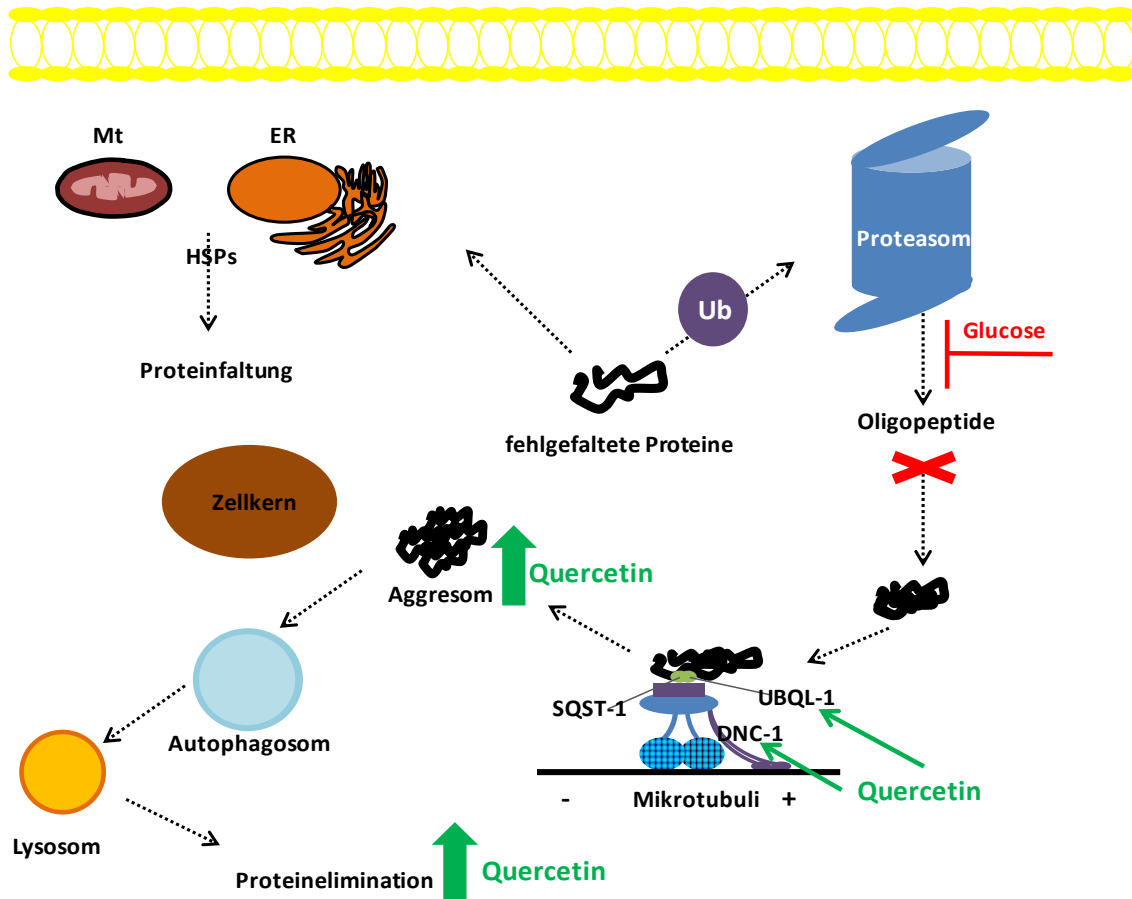


Abbildung 5.1 Effekte von Quercetin auf die Proteinelimination über das Aggresom

Laut den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit fördert Quercetin über *ubql-1* und *dnc-1* die Bildung von Aggresomen und somit die Proteinelimination unter glucotoxischen Bedingungen. Modifiziert nach [57, 80, 81].

Abbildung 5.1 zeigt zusammenfassend, dass *sqst-1* für die Aggresombildung von wesentlicher Bedeutung ist, sein Fehlen jedoch durch die Steigerung der proteasomalen Aktivität im Hinblick auf die Aufrechterhaltung der Überlebenszeit kompensiert wird. Während *sqst-1* kein Zielgen von Glucose oder Quercetin darstellt, war das im Falle der Aggresom-relevanten Gene *dnc-1* und *ubql-1* anders. Der Knockdown beider Gene führte zu einer Verkürzung der Überlebenszeit, die durch die zusätzliche Gabe von Glucose nicht weiter gesenkt wurde. Auch wurde in funktioneller Abwesenheit von DNC-1 und UBQL-1 die durch Quercetin verursachte Verlängerung der Überlebenszeit in Glucose-exponierten Nematoden verhindert.

5.3 Der Einfluss von Mitophagie auf die Proteostase in *C. elegans*

5.3.1 Der funktionelle Verlust Mitophagie-relevanter Gene reduziert die Stressresistenz

Unter *eat-3* RNAi kam es in der vorliegenden Arbeit zu einer signifikanten Verringerung der Lebensspanne von *mev-1*. In Hefe- oder Säugetierzellen gilt das *eat-3*-Homolog bzw. OPA-1 als essentiell für die Fusion der inneren Mitochondrienmembran [373, 519]. Des Weiteren bewirkt diese mitochondriale GTPase die Aufrechterhaltung der Struktur der Cristae [520]. Dies spielt insbesondere bei der Verhinderung von Apoptose eine Rolle, da OPA1 dank der GTPase-Aktivität die Schließung der Kanäle bzw. Tight Junctions auslöst, durch welche die Cristae mit der inneren Grenzmembran verbunden sind [520, 521]. Dadurch wird die Ausdehnung der Kanäle und somit auch die Freisetzung von Cytochrom c und die intrinsische Apoptose verhindert [520, 522]. In *C. elegans* kam es durch die *eat-3* RNAi zu weniger bzw. kleineren Cristae, was neben einer Störung der Elektronentransportkette auch zu Trägheit oder verlangsamtem Wachstum führte [523].

Wie der Name schon andeutet, weisen *eat*-Mutanten eine ineffiziente bzw. ungenügende Nahrungsaufnahme auf, die auf einer verlangsamten pharyngealen Pumpaktivität beruht [524, 525]. Durch die verminderte Nahrungsaufnahme und die damit einhergehende Kalorienrestriktion lebten die *eat*-Mutanten im Vergleich zu den Wildtyp-Würmern signifikant länger [525, 526]. Allerdings führt diese Mutation auch zu einer Störung der Nerven bzw. der Kontraktion und Relaxation der Pharynxmuskeln, die wiederum durch einen Defekt in einer Untereinheit des nikotineren Acetylcholin-Rezeptors verursacht wird [525, 527]. Außerdem kam es durch das Fehlen des EAT-3-Proteins oder die Mutation von *eat-3* zur Fragmentierung von Mitochondrien [523]. In *daf-2*-Mutanten, die einen Defekt des Insulin/IGF-1-Rezeptors aufweisen und dadurch den unter Kalorienrestriktion bestehenden Stoffwechsel simulieren, reduzierte die *eat-3* RNAi die Verlängerung der Lebensspanne, beruhend auf fragmentierten Mitochondrien, die im Vergleich zu elongierten Mitochondrien eine reduzierte ATP-Produktion, ein geringeres Membranpotential sowie eine erhöhte ROS-Produktion aufwiesen [528–531].

Laut Untersuchungen besteht eine Korrelation zwischen dem Schweregrad des pharyngealen Defekts und der verlängerten Lebensspanne, was bedeutet, dass mit verringerter alimentärer Zufuhr die Nematoden eine kleinere Körpergröße aufweisen, jedoch auch länger leben [524, 532]. Als Grund für die Langlebigkeit durch die Kalorienrestriktion wurde bei den *eat-3*-Mutanten anhand der gesteigerten LGG-1-Expression eine erhöhte Autophagie ermittelt, durch die geschädigte Proteine sowie Organellen entfernt werden und dementsprechend eine Verlangsamung des Alterungsprozesses erfolgt [532]. Des Weiteren

dient der aktivierte autophagosomale Abbauweg zur Gewinnung von Aminosäuren, die für Gluconeogenese oder andere Biosynthesereaktionen verwendet werden, wenn exogene Substrate fehlen [533, 534]. Unter Stressbedingungen scheint sich somit die lebensverlängernde Wirkung des Fehlens von EAT-3 umzukehren. Dies zeigte sich in einer weiteren Studie, in der die *eat-3*-Mutante eine Erhöhung der Sensitivität gegenüber Stressoren (wie Paraquat) bei erhöhter Bildung freier Radikale aufwies [523]. Die unter diesen Bedingungen gemessene erhöhte Expression der antioxidativ wirksamen Superoxiddismutase reicht offenbar zur Detoxifizierung der ROS nicht aus [523]. Zu betonen ist jedoch, dass die Untersuchung der Hitzestress-Resistenz im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit dem *mev-1*-Stamm durchgeführt wurde. Auch in der vorliegenden Arbeit kam es vermutlich durch die *eat-3* RNAi zu einer zusätzlichen Steigerung der Stresssensitivität und der Produktion von ROS in der Stress-sensitiven *mev-1*-Mutante. Die Hemmung der Autophagie und die Steigerung der ROS-Spiegel konnten jedoch weder durch die Kalorienrestriktion noch durch das Proteasom kompensiert werden. Insofern verursachte die *eat-3* RNAi in *mev-1* eine erhöhte Proteinaggregation. Ähnlich resultierte der Knockdown von OPA1 in retinalen Ganglienzellen in einer Aggregation des mitochondrialen Netzwerkes [535].

So ist festzustellen, dass die erhöhte ROS-Produktion unter einer *eat-3* RNAi in *mev-1* zur Bildung von geschädigten Proteinen und Mitochondrien führt. Deren Akkumulation belastet hingegen die Degradationsmechanismen, insbesondere das UPS und die Mitophagie, woraufhin die *mev-1*-Nematoden trotz einer Kalorienrestriktion kürzer leben.

5.3.2 Das funktionelle Fehlen von *fzo-1* verhindert die Fusion von Mitochondrien und deren Elimination über Autophagosomen

Mfn1 und Mfn2 stellen zwei Schlüsselproteine der mitochondrialen Fusion in Säugetieren dar [154, 536]. Beide Mitofusine, deren GTPase-Domänen für die mitochondriale Fusion essentiell sind, werden in vielen Geweben exprimiert, wobei Mfn2 hauptsächlich im Gehirn und Mfn1 vermehrt im Herz vorkommt [537]. Auch weist das zu *fzo-1* homologe Protein Mfn1 eine stärkere GTPase-Aktivität auf und bewirkt mit einer höheren Effizienz die Anbindung mitochondrialer Membranen in Abhängigkeit von der GTP-Hydrolyse [537].

Der Knockdown von *fzo-1* löste in verschiedenen Geweben von *C. elegans*, wie dem Darm oder den Neuronen, eine Laktatazidose aus, die durch die verminderte Fusion der Mitochondrien und den Funktionsverlust der Atmungskette verursacht wurde [538]. Unter diesen Bedingungen wird der Energiebedarf der Zellen durch vermehrte Glykolyse gedeckt [538, 539]. Aufgrund der abwesenden Atmungskettenphosphorylierung wird das Endprodukt

der Glykolyse, Pyruvat, zu Lactat reduziert [538–540]. In Hefezellen kam es in Abwesenheit von FZO1 zu einer anomalen mitochondrialen Fusion sowie zu einer Senkung der Lebensspanne [541]. Auch *daf-2*-Mutanten lebten unter *fzo-1* RNAi kürzer [528]. Als eine Erklärung hierfür lieferten die Autoren den Grund, dass die Nematoden mit einer Mutation im *daf-2*-Gen vermehrt elongierte Mitochondrien aufweisen, die in Abwesenheit von FZO-1 nicht mehr gebildet werden [528]. Laut Untersuchungen produzieren elongierte Mitochondrien effizienter ATP und weniger ROS [528, 542]. Umgekehrt wiesen nach dem Knockdown von Mfn1 murine Zellen eine reduzierte Fusion sowie stark fragmentierte Mitochondrien auf [543], die vermehrt ROS bildeten [529]. *In vitro* kam es in Zellen ohne Mfn1 oder Mfn2 zu einer Fragmentierung von Mitochondrien und einer erhöhten ROS-Produktion [544]. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene verstärkte ROS-Bildung in Abwesenheit von FZO-1 im *mev-1*-Stamm, der ohnehin erhöhte Superoxid-Anion-Spiegel aufweist [545], könnte somit das Ergebnis der verminderten Fusion bzw. der vermehrten Entstehung von fragmentierten Mitochondrien darstellen.

Dass der Abbau von Mfn zu einer kompensatorisch gesteigerten Fission führt, welche die Mitophagie fördert [546], steht jedoch im Widerspruch zu der gesenkten Mitophagieaktivität unter *fzo-1* RNAi. Der Grund für die verminderte Autophagie bzw. Lysosomenbildung in *mev-1* ist möglicherweise die Zunahme von geschädigten Mitochondrien, die durch die erhöhte ROS-Bildung vermehrt auftreten [132, 547]. Des Weiteren überlastet vermutlich die Akkumulation geschädigter Mitochondrien bzw. von aggregierten Proteinen die Kapazität der Proteostase bzw. des UPS sowie der Mitophagie, was schließlich die Lebensspanne der Nematoden unter Hitzestress verkürzt.

5.3.3 Die Hemmung der mitochondrialen Fission führt zur Akkumulation von geschädigten Mitochondrien

In gesunden Zellen besteht ein Gleichgewicht zwischen Fission und Fusion [548]. Für die Fission gilt das in der mitochondrialen Außenmembran vorkommende Protein Fis1 durch die Interaktion mit Drp1 als essentiell [549]. Durch den Knockdown des humanen Fis1-Proteins kam es *in vitro* zu einer Hemmung der Teilung der Mitochondrien, was mit Seneszenz einhergeht [550–552]. Des Weiteren verursachte der Knockout von Fis1 in *S. cerevisiae* neben Wachstumsstörungen auch das Absterben von Zellen [553]. Eine exzessive Fissionsrate hingegen fördert die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c und führt somit zum Zelltod [554]. Das Fehlen von *fis-1* wirkte sich negativ auf die Überlebenszeit von *mev-1* aus. Dass die verminderte mitochondriale Fission mit reduzierter Mitophagie und erhöhter Proteinaggregation einhergeht [463, 555], konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Mutation von *fis1* sorgte auch in Säugetierzellen und Würmern für eine gestörte

Elimination von geschädigten Mitochondrien, wodurch die Akkumulation von LC3/LGG-1-Aggregaten zunahm [375].

Auch im Hinblick auf die Fission kommt es wiederum zur Aktivierung von Mechanismen, die eine moderate Störung kompensieren können. So bilden elongierte Mitochondrien, die durch eine verminderte Fission auftreten, weniger ROS [528, 556]. Die festgestellte erhöhte ROS-Bildung unter *fis-1* RNAi in der vorliegenden Arbeit hingegen ist vermutlich das Resultat intrinsisch erhöhter ROS-Spiegel in *mev-1*. Diese können offenbar nicht mehr ausreichend kompensiert werden, sodass die reduzierte Fission die Mitochondrien irreparabel schädigt mit der Konsequenz erhöhter mitochondrialer ROS-Spiegel.

Durch die Fission ermöglicht Drp1 die Teilung von Mitochondrien in Fragmente und ermöglicht somit deren Aufnahme durch Autophagosomen [546, 557]. Demnach weist dieses Protein auch in *C. elegans* für die mitochondriale Fission eine essentielle Bedeutung auf [550]. In der vorliegenden Arbeit kam es nach dem Knockdown von *drp-1* zu einer signifikanten Verkürzung der Lebensspanne von *mev-1*. Im Gegensatz dazu konnte durch die Induktion der GTPase Drp1 die Lebensspanne von mittelalten Fruchtfliegen verlängert werden [546]. Des Weiteren sind Kompensationsmechanismen in Abhängigkeit vom Stresstatus beschrieben. So zeigten Studien, dass Drp1 bei Nahrungskarenz durch die Proteinkinase A inhibiert wird, was in einer Elongation von Mitochondrien resultiert, die bei Nährstoffmangel ihre Energiegewinnung anpassen, um die Zellviabilität aufrechtzuerhalten [558]. Bei Mäusen führte der Knockdown von Drp1 allerdings neben der Entstehung von elongierten Mitochondrien zu Herzversagen, mitochondrialer Funktionsstörung und frühzeitigem Tod [559]. Im Gegensatz dazu wurde die Lebensspanne von Wildtyp-Würmern unter *drp-1* RNAi nicht beeinflusst [560]. In der *mev-1*-Mutante führte vermutlich die Dysfunktion der Fission zu einer reduzierten Mitophagie [561], die als Folge des *drp-1*-Knockdowns nicht mehr kompensiert werden konnte.

5.3.4 GLB-1 ist für die Lebensspanne und die Mitophagie in *mev-1* essentiell

Bei den Globinen handelt es sich um Häm-bindende Proteine, die aus ungefähr 150 Aminosäuren bestehen und eine typische dreidimensionale aus sechs bis acht Helices aufgebaute „Sandwich-Struktur“ aufweisen [562, 563]. Es besteht eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Globinen Hämoglobin und Myoglobin in Vertebraten [564]. In *C. elegans* wurden bisher 33 Gene (*glb-1* bis *glb-33*) entdeckt, die für Globine kodieren [562]. Diese weisen Hypoxie-regulierte Elemente auf, die durch den *hypoxia-inducible factor-1* (*hif-1*) aktiviert werden können [370, 565]. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 wird durch Hypoxie induziert und führt zur Expression von Genen, die der Aufrechterhaltung der Sauerstoffkonzentration dienen, um das Zellüberleben unter Sauerstoffmangel zu fördern [565]. Je nach Lokalisation bzw. Gewebe variiert die Funktion der Globine in *C. elegans* [564, 566–568]. So kommt beispielsweise GLB-12 in somatischen Zellen vor und weist eine essentielle Funktion für die Reproduktion der Würmer auf [566]. Im Gegensatz dazu wird GLB-1 hauptsächlich in Neuronen und Muskeln produziert [562, 564]. Da *C. elegans* kein spezialisiertes Zirkulations- bzw. Respirationssystem aufweist, wird Letzteres auf molekularer Ebene reguliert [564]. Demnach ermöglicht die pentakoordinierte Struktur von *glb-1* die reversible Bindung von Sauerstoff mit hoher Affinität ans Häm-Eisen, das aus einem wasserstoffgebundenen Netzwerk aus Tyrosin B10 und Glutamin E7 besteht [564, 568]. Daneben dient *glb-1* auch zur Speicherung von Sauerstoff [564]. Zu einer Steigerung der *glb-1*-Expression in den Nematoden kommt es unter hypoxischen Bedingungen [562]. HIF-1 ist in der Lage, durch die Expression von BNIP3 Mitophagie zu induzieren, um die Zellen vor Hypoxie zu schützen [370, 569, 570]. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass HIF-1 für die Langlebigkeit von *C. elegans* unter hypoxischen Bedingungen benötigt wird [571]. Nach dem Knockdown von Frataxin, einem mitochondrialen eisenhaltigen Protein, treten ebenso Hypoxie-ähnliche Zustände auf, die in einer Studie mit den Nematoden erneut die Mitophagie aktiviert und die Lebensspanne verlängert haben [370]. Bei diesem Effekt könnte GLB-1 als ein Zielgen von HIF-1 eine essentielle Funktion übernehmen [370]. Die Essentialität von *glb-1* für die Mitophagie und die Überlebenszeit zeigte sich schließlich auch in der vorliegenden Arbeit für die *mev-1*-Mutante.

Da Globine bei der Detoxifikation von ROS eine wichtige Rolle spielen, passt es auch zu dem Ergebnis, dass unter *glb-1* RNAi die ROS-Spiegel anstiegen [564]. Im Gegensatz zu vielen anderen Mitophagie-relevanten Genen sind für das Fehlen von *glb-1* keine Kompensationsmechanismen beschrieben. Dies könnte erklären, weshalb die ROS-Spiegel unter *glb-1* RNAi in *mev-1* besonders anstiegen.

5.3.5 PGAM-5 wird zum Schutz vor geschädigten Mitochondrien und ROS benötigt

In *Drosophila melanogaster* bewirkte PGAM-5 bei mitochondrialem Stress über die Dephosphorylierung von ASK1 (*apoptosis signaling kinase 1*) die Aktivierung von FOXO [572]. Dies resultierte in der Expression protektiver Gene und in einer Verlängerung der Lebensspanne [572]. Umgekehrt lebten die Fruchtfliegen durch die Abwesenheit von PGAM5 im Vergleich zum Wildtyp signifikant kürzer, was mit der verminderten autophagosomalen Elimination von defekten Mitochondrien begründet wurde [150]. Des Weiteren könnte die Beeinflussung der Fission durch PGAM5 die Lebensspanne beeinflussen [150, 573], da dieser Prozess für die Auslösung der Mitophagie von wesentlicher Bedeutung ist [159, 574]. In Analogie hierzu ist zu schließen, dass die Abwesenheit von *pgam-5* in *C. elegans* die Entfernung von geschädigten Mitochondrien verhindert und somit zu einer Verkürzung der Überlebenszeit der *mev-1*-Mutante führte.

Ursprünglich wurde PGAM-5 als eine mitochondriale Phosphatase identifiziert, die oxidativen Stress durch die Bindung an Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) und Nrf2 kontrolliert [158, 575]. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 fördert durch die Bindung an die *antioxidant response elements* (ARE) in der regulatorischen Region von Zielgenen die Expression von Phase II-Enzymen sowie antioxidativen Enzymen [576]. Im Gegensatz dazu bewirkt der Repressor Keap1 unter basalen Bedingungen den Abbau von Nrf2 über das UPS und verhindert somit dessen Translokation in den Zellkern [576, 577]. Mit Keap1 sowie Nrf2 bildet PGAM5 an der mitochondrialen Außenmembran einen ternären Komplex [578, 579]. Durch den Knockdown von Keap1 oder PGAM5 kam es zu einer erhöhten Expression von Nrf2-abhängigen Genen [578]. Dies würde bedeuten, dass die Abwesenheit von PGAM-5 durch die Erhöhung der Produktion von antioxidativen Genen die ROS-Konzentration senken müsste. In der vorliegenden Arbeit wurde in *C. elegans* das Gegenteil beobachtet. Auch wenn in den Nematoden kein Homolog zu Keap1 existiert, wird davon ausgegangen, dass WDR-23 (*WD Repeat protein 23*) dessen Rolle übernimmt [344, 575]. Des Weiteren kann SKN-1 direkt mit PGAM-5 interagieren und die mitochondriale ROS-Produktion ermitteln [162, 344]. In Abwesenheit von WDR-23 gelangt das Nrf2-Homolog SKN-1 in den Zellkern und führt neben Stressresistenz auch zu einer Verlängerung der Lebensspanne [368, 575]. Es ist allerdings zu vermuten, dass die unter *pgam-5* RNAi stattgefundenen erhöhte nukleäre Translokation von SKN-1 und die damit einhergehende Aktivierung antioxidativer Enzyme, nicht ausreicht, die unter *pgam-5* RNAi eintretende verminderte Elimination geschädigter Mitochondrien zu kompensieren. Daher kommt es offenbar in der *mev-1*-Mutante nach dem Knockdown von *pgam-5* zu erhöhten ROS-Spiegeln und einer Verkürzung der Überlebenszeit unter Hitzestress.

Auch wenn bisher keine Studien über die ROS-Konzentration in *C. elegans* unter *pgam-5* existieren, kam es in einer Mausstudie durch die Depletion von PGAM5 ebenfalls zu einer erhöhten ROS-Produktion [580]. Demnach schützt PGAM5 die Zellen vor einer Nekroptose (einer spezifischen Form von programmierter Nekrose [581]) und ermöglicht somit die Elimination von geschädigten Mitochondrien durch Autophagie, wodurch die Überproduktion von ROS verhindert wird [580].

5.3.6 Das Fehlen von DCT-1 in *mev-1* führt zu einer Reduktion der Rezeptor-vermittelten Mitophagie und der Lebensspanne

DCT-1 stellt ein Homolog zu den Rezeptoren der mitochondrialen Außenmembran BNIP3 und BNIP3L/NIX dar, welche die Mitophagie unter Wachstums- oder Stressbedingungen fördern [163]. In Mäusen kam es durch die Abwesenheit von NIX zu einer verminderten Elimination von Mitochondrien, da das DCT-1-Homolog durch die Interaktion mit LC3/GABARAP für die Aufnahme dieser Organellen durch Autophagosomen von wesentlicher Bedeutung ist [582, 583]. Des Weiteren fanden Palikaras *et al.* heraus, dass SKN-1 in *C. elegans* die Mitophagie über die Expression von *dct-1* reguliert [368]. Der Transkriptionsfaktor hingegen wird durch oxidativen Stress bzw. ROS aktiviert, die durch die Ansammlung von geschädigten Mitochondrien erzeugt werden [162, 344, 368]. In den Nematoden führte der Knockdown von *dct-1*, wie bei einem SKN-1-Mangel, zu einer Depolarisation der Mitochondrienmembran, einer Störung der Morphologie des mitochondrialen Netzwerkes sowie einem Anstieg der cytoplasmatischen Calcium-Konzentration [368]. Letztere gilt in Mitophagie-defizienten Tieren als Maß mitochondrialer Dysfunktion [162].

Während die Lebensspanne von Wildtyp-Nematoden nach dem Knockdown von *dct-1* im Vergleich zur Kontrolle unverändert blieb, nahm diese bei Würmern mit einer moderaten mitochondrialen Dysfunktion ab [368]. Auch lebten die N2-Nematoden unter *dct-1* RNAi in Anwesenheit von Stressoren wie Hitze (37 °C) oder Paraquat kürzer [368]. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der vorliegenden Arbeit überein und unterstreichen die Bedeutung der Mitophagie-relevanten Gene für die Stressresistenz insbesondere unter Stressbedingungen. In Übereinstimmung mit den Befunden der vorliegenden Arbeit ging der Knockdown von BNIP3 (Homolog zu DCT-1 [163]) auch *in vitro* mit einer stark erhöhten ROS-Produktion einher, was durch die Autoren auf die Akkumulation von geschädigten Mitochondrien zurückgeführt wurde [584].

In langlebenden *daf-2*-Mutanten kam es unter *dct-1* RNAi neben der Verringerung der Lebensspanne auch zur Aufhebung der Steigerung der Autophagie [368]. Weiterhin lebten

eat-2-Mutanten, die eine Kalorienrestriktion und eine verlängerte Lebensspanne aufweisen [525], in Abwesenheit von DCT-1 kürzer, was zeigt, dass die Mitophagie für die protektiven Effekte von Langlebigkeitsgenen eine essentielle Rolle spielt [368, 525].

Schiavi *et al.* fanden heraus, dass es in *C. elegans* in Abhängigkeit von *hif-1* zu einer erhöhten Expression von *dct-1* und einer Abnahme des SQST-1-Proteins kommt [370]. Dies zeigt, dass die Induktion von *dct-1* in einer erhöhten Autophagie resultiert, durch die u.a. das Adaptorprotein SQST-1 abgebaut wird [370]. Demnach müsste die Hemmung von *dct-1* in einer Abnahme der Autophagie bzw. der Mitophagie resultieren, was mit der hier festgestellten erhöhten SQST-1::GFP-Fluoreszenz und der verminderten Lysosomenbildung in *mev-1* übereinstimmt. Auch bewirkte das Fehlen von DCT-1 in Nematoden, wie in Abwesenheit von BEC-1, einen Anstieg der mitochondrialen Masse [162], was als ein Indikator für die Akkumulation von geschädigten Mitochondrien [585] und somit auch für die Abnahme der Mitophagie gilt [586]. Schließlich führen diese Störungen zu dem ermittelten Anstieg der Proteinaggregation und vermindern die Stressresistenz von *mev-1*.

5.3.7 Der funktionelle Verlust des Mitophagie-relevanten Gens *pdr-1* wird durch andere Gene kompensiert

Seit ihrer Entdeckung im Jahr 2008 steht die PINK1/Parkin-vermittelte Mitophagie im Fokus der Mitophagie-Forschung [587]. Wie bereits erwähnt, bewirkt die Serin/Threonin-Kinase PINK1 nach ihrer Akkumulation auf geschädigten Mitochondrien die Rekrutierung von Parkin [588]. Nach der Phosphorylierung der UBL-Domäne durch PINK1 katalysiert die E3-Ubiquitin-Ligase die Übertragung von Ubiquitinmolekülen auf mitochondriale Substrate [589]. Laut Untersuchungen kann eine Störung des PINK1/Parkin-Signalweges, beispielsweise bei Diabetes-Patienten, Kardiomyopathien verursachen, bei denen die Herzmuskelzellen durch mitochondriale Dysfunktion geschädigt werden [590]. Auch wenn generell von einer PINK1/Parkin-vermittelten Mitophagie berichtet wird, deuten die Untersuchungen bzw. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass beide Komponenten auch unabhängig voneinander agieren können, da die *pink-1* RNAi zu verminderter Mitophagie und Überlebenszeit unter Hitzestress führte, während der Knockdown des Parkin-Homologs *pdr-1* die Mitophagie steigerte und somit eine Verkürzung der Überlebenszeit von *mev-1* bei 37 °C verhinderte.

Auch in verschiedenen Studien resultierte der Knockdown von *pink1* in einer Abnahme der Stress-induzierten Autophagie, einer vermehrten ROS-Produktion und einem erhöhten Zelltod [591–593]. Weiterhin führte das funktionelle Fehlen von *pink1* zu einer Verkürzung der Lebensspanne von *Drosophila* [594]. Untersuchungen an Säugetierzellen zeigten, dass

der dauerhafte Verlust bzw. der Knockdown von *pink1* zu mitochondrialen Störungen, wie z.B. einer Dysfunktion der Elektronentransportkette, einem verminderten Membranpotential, einer Fehlregulation der Calcium-Homöostase und einer erhöhten ROS-Produktion führt [588]. Palikaras *et al.* fanden heraus, dass unter *pink-1* RNAi die Lebensspanne von lang lebenden *daf-2*-Mutanten von *C. elegans* abnimmt und eine moderate mitochondriale Dysfunktion auftritt [368]. Die RNAi von *pink-1* hatte den gleichen lebensverkürzenden Effekt in Nematoden mit einer Mutation von *isp-1* (*iron-sulfur protein*) [368]. Bei *isp-1* handelt es sich um ein Gen, das für eine Untereinheit des Komplex III kodiert [595]. Seine Störung geht mit einer erhöhten mitochondrialen ROS-Produktion einher, die zur Mitohormesis führt, wodurch eine Aktivierung von antioxidativen Enzymen (wie z.B. Superoxiddismutase) stattfindet und die Würmer eine erhöhte Stressresistenz zeigen [595, 596]. Auch im Hinblick auf die Mitohormesis scheint es somit ein Optimum des Stressreizes zu geben [597], der offenbar aber in funktioneller Abwesenheit von *pink-1* eine Anpassung an den Stress verhindert. Im Einklang hiermit wurde in einer Studie, in der Nematoden mit Paraquat, einem ROS-induzierenden Herbizid [598], behandelt wurden, unter Funktionsverlust von *pink-1* eine Zunahme der Sensitivität gegenüber oxidativem Stress beobachtet [371]. Die erhöhte Stressempfindlichkeit ist in *mev-1* aufgrund der erhöhten ROS-Produktion evident [318] und tritt unter *pink-1* RNAi in Form einer gesteigerten ROS-Konzentration und einer verkürzten Überlebenszeit bei Hitzestress auf.

Des Weiteren weist auch der Anstieg der Proteinaggregation und die Abnahme der Proteasomaktivität in *mev-1* darauf hin, dass unter *pink-1* RNAi keine Kompensation der ausgelösten mitochondrialen Schäden mehr möglich ist. Die Hypothese, dass in funktioneller Abwesenheit von PINK-1 die Degradation von geschädigten Mitochondrien abnimmt, die daraufhin vermehrt ROS produzieren [453], wurde in der vorliegenden Arbeit absolut unterstützt, da nicht nur die mitochondriale ROS-Konzentration zunahm, sondern auch die Elimination geschädigter Mitochondrien über Autophagie und lysosomalen Abbau deutlich reduziert war. Tatsächlich wurde herausgefunden, dass eine Fehlfunktion des PINK1-Gens als ein Risikofaktor für Diabetes mellitus Typ 2 gilt [599, 600]. Dies verdeutlicht somit die irreversible Schädigung von Zellen unter Bedingungen des erhöhten ROS-Stresses, wie er auch in *mev-1* vorliegt und in funktioneller Abwesenheit von PINK-1 zunimmt.

Parkin stellt eine RGR (*RING-in-between-RING*) E3-Ubiquitin-Ligase dar, die Ubiquitinmoleküle im Rahmen von zwei Reaktionsschritten auf die Substrate überträgt, wobei die K63-Polyubiquitinierung die Elimination durch Autophagosomen fördert [60, 601]. Für seine Translokation zu den geschädigten Mitochondrien ist Parkin auf PINK1 angewiesen [151]. *Pdr-1* ist ortholog zu Parkin in Säugetierzellen und kommt in den meisten Neuronen von *C. elegans* vor [602]. In *Drosophila* resultierte der Knockdown von Parkin in Bewegungsstörungen, einer Verkürzung der Lebensspanne sowie Sterilität bei den

Männchen [603]. Bei Mäusen kam es durch den Knockdown von *parkin* zu einer Störung der Mitophagie und somit auch zu einer Akkumulation von geschädigten Mitochondrien, woraufhin die Tiere kardiale Funktionsstörungen sowie eine verminderte Lebensspanne aufwiesen [559]. Die Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit vorkommenden Ergebnissen, da in *mev-1* in funktioneller Abwesenheit von *pdr-1* zwar eine erhöhte ROS-Produktion stattfand, jedoch die Überlebenszeit der Nematoden bei 37 °C nicht beeinflusst wurde. Auch oxidativer Stress zählt zu den Effekten eines Parkin-Knockouts [604]. Da PDR-1 stromabwärts von PINK-1 wirkt [376], besteht die Möglichkeit, dass PINK-1 in Abwesenheit von PDR-1 andere E3-Ubiquitin-Ligasen zu den geschädigten Mitochondrien rekrutiert und so die Mitophagie in den Nematoden induziert. Dementsprechend fanden Lazarou *et al.* heraus, dass Parkin lediglich das Signal zur Induktion der Mitophagie verstärkt, welches durch das PINK1-generierte Phospho-Ubiquitinmolekül erzeugt wird [605]. Interessanterweise war trotz der erhöhten ROS-Spiegel die Proteinaggregation in *mev-1* unverändert. Erklärbar ist dies durch die in funktioneller Abwesenheit von *pdr-1* gesteigerte Autophagosomen- und Lysosomenbildung, die offensichtlich unter *pdr-1* RNAi unabhängig von PINK-1 erfolgt. Unter Bedingungen, unter denen weder *pdr-1* noch *dct-1* RNAi alleine eine Überlebenszeitverkürzung verursachen, deutet die Abnahme der Überlebenszeit der Nematoden unter Doppel-RNAi von *dct-1* und *pdr-1* darauf hin, dass in funktioneller Abwesenheit von PDR-1 die BNIP-3- bzw. DCT-1-vermittelte Mitophagie vermehrt aktiviert wird (Abbildung 5.2).

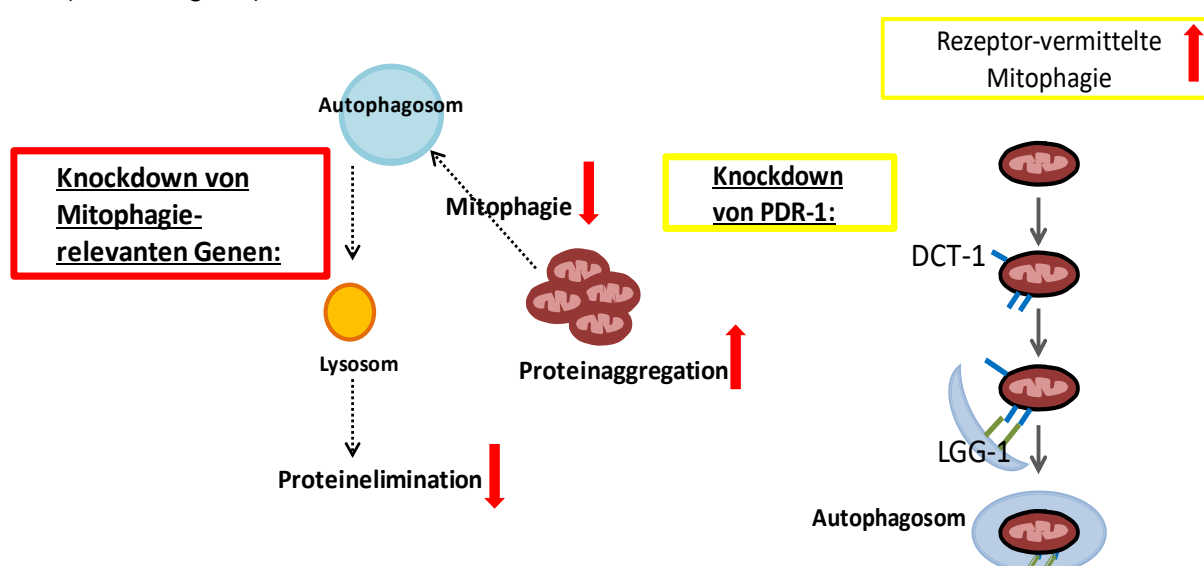


Abbildung 5.2 In Abwesenheit von Mitophagie-relevanten Genen nimmt die Autophagie ab

Der Knockdown von Mitophagie-relevanten Genen, mit Ausnahme von *pdr-1*, führt zu einer Hemmung der Autophagie. In funktioneller Abwesenheit von PDR-1 kommt es zu einer Aktivierung der DCT-1-vermittelten Mitophagie, wodurch ein Anstieg der Proteinaggregation trotz erhöhter mitochondrialer ROS-Spiegel verhindert wird. Modifiziert nach [226].

Dass im Vergleich zu den anderen Mitophagie-relevanten Genen die Lebensspanne und die Proteinaggregation unter *pdr-1* RNAi in der *mev-1*-Mutante im Vergleich zur Kontrolle gleich blieben, deutet auf die Aktivierung von Kompensationsmechanismen hin (Abbildung 5.2). Hierbei kommt jedoch das Proteasom nicht in Frage, da sich dessen Aktivität nach dem Knockdown von *pdr-1* nicht veränderte. Im Gegensatz dazu lässt jedoch die Abnahme der Überlebenszeit der Nematoden unter Doppel-RNAi von *dct-1* und *pdr-1* vermuten, dass in funktioneller Abwesenheit von *pdr-1* die BNIP3- bzw. DCT-1-vermittelte Mitophagie vermehrt aktiviert wird.

6 Zusammenfassung

Weltweit nimmt die durchschnittliche Lebenserwartung und damit auch die Häufigkeit von altersbedingten Gesundheitsstörungen wie Diabetes mellitus Typ 2 zu. Diabetische Spätfolgen sind dabei die Konsequenz längerfristiger Hyperglykämien. Neben der akkuraten Kontrolle des Blutzuckers bzw. der konventionellen Therapie sind auch adjuvante Behandlungsmöglichkeiten, wie die Applikation sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, zu denen die Polyphenole zählen, von besonderem Interesse. Zur Gruppe der Polyphenole gehört auch das am besten untersuchte Flavonol Quercetin aus Äpfeln und Zwiebeln.

Studien am Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) zeigten bereits, dass die Inkubation mit Glucose die Lebensspanne der Nematoden verkürzt. Als einer der hierfür verantwortlichen Mechanismen wurde in der *mev-1*-Mutante, die durch erhöhte Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffkonzentrationen (ROS) in den Mitochondrien gekennzeichnet ist, die Senkung der Aktivität des Proteasoms identifiziert. Durch zusätzliche Behandlung mit Quercetin konnte sowohl die Proteasomaktivität als auch die Überlebenszeit unter Hitzestress wieder auf den Wert der Kontrolle zurückgeführt werden, was mit einer Hemmung der Glucosetoxizität einhergeht. So war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Bedeutung des Aggresoms als potentielle Zielstruktur von Quercetin im Rahmen der Glucose-induzierten Schädigungen in der *mev-1*-Mutante zu erforschen.

Bei dem sogenannten Aggresom handelt es sich um ein Einschlusskörperchen, das bei einer Überlastung oder Störung des Ubiquitin-Proteasom-Systems aus aggregierten Proteinen zusammengesetzt wird, um deren toxischen Einfluss auf die Zellfunktionen zunächst durch Speicherung und schließlich durch Elimination via Autophagie zu verhindern. An der Bildung von Aggresomen sind verschiedene Adaptorproteine wie *ubq1-1* oder *sqst-1* beteiligt, welche die polyubiquitinierten Proteine mithilfe des Dyneinmotorkomplexes, dessen wichtiger Bestandteil *dnc-1* ist, zunächst entlang der Mikrotubuli in die Nähe des Zellkerns transportieren.

Nach dem mittels RNA-Interferenz (RNAi) erzielten Knockdown der Aggresom-relevanten Gene *ubq1-1* bzw. *dnc-1* kam es zu einer Erhöhung der Proteinaggregation und einer Verkürzung der Überlebenszeit unter Hitzestress bei 37 °C. Unter RNAi der beiden Gene führte Glucose nicht zu einer weiteren Verkürzung der Überlebenszeit, wobei Quercetin diese unter Glucoseexposition auch nicht mehr verlängern konnte. Dies weist darauf hin, dass Glucose durch Hemmung und Quercetin durch Aktivierung dieser Aggresom-relevanten Gene die Stressresistenz und die Überlebenszeit von *mev-1* gegenteilig beeinflussen. Der Knockdown von *sqst-1* hingegen hatte trotz der Verringerung der Autophagie keinen Effekt auf die Überlebenszeit der Nematoden, die Verkürzung der Überlebenszeit durch Glucose

oder die Verlängerung der Überlebenszeit durch Quercetin in Gegenwart von Glucose. Demnach wurde *sqst-1* im Gegensatz zu *ubql-1* und *dnc-1* nicht als Zielgen von Glucose und Quercetin ermittelt. Aufgrund des Anstiegs der Proteasomaktivität unter *sqst-1* RNAi konnte das Proteasom als kompensatorischer Mechanismus für die reduzierte Aggresombildung identifiziert werden.

Da die Mitochondrien unter hyperglykämischen Bedingungen durch die vermehrte ROS-Produktion an diabetischen Spätfolgen beteiligt sind, wurde noch die spezifische Elimination dieser Organellen durch die Mitophagie untersucht. Unter RNAi von Mitophagie-relevanten Genen (*dct-1*, *drp-1*, *eat-3*, *fis-1*, *fzo1*, *glb-1*, *pink-1* und *pgam-5*) kam es nicht nur zu einer Verkürzung der Überlebenszeit von *mev-1* bei 37 °C, sondern auch zur Verringerung der Proteasomaktivität, der Autophagie und der Bildung von Lysosomen, wohingegen die mitochondrialen ROS-Spiegel und die Proteinaggregation zunahmen. Nur in funktioneller Abwesenheit von PDR-1 blieben trotz des Anstiegs der ROS-Konzentration die Überlebenszeit der Nematoden, die spezifische Aktivität des Proteasoms sowie die Proteinaggregation im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Dies liegt offenbar an der kompensatorischen Induktion der Mitophagie im Falle des Knockdowns von *pdr-1*.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Zunahme der Proteinaggregation durch die Störung der Bestandteile des Proteostase-Netzwerkes die Überlebenszeit von *C. elegans* unter Stressbedingungen beim Fehlen von Kompensationsmechanismen beeinträchtigt. Diese fanden nur in funktioneller Abwesenheit von *sqst-1* und *pdr-1* statt. Somit besitzt neben der Degradation der Mitochondrien über Autophagosomen auch die Elimination von geschädigten Proteinen über die Aggresomen eine wesentliche Bedeutung für die Lebensspanne der Nematoden. Hierbei konnten in der *mev-1*-Mutante *ubql-1* und *dnc-1* als Aggresom-relevante Zielgene von Quercetin in Bezug auf die Verlängerung der Lebensspanne unter glucotoxischen Bedingungen identifiziert werden.

7 Summary

Along with the globally increasing life expectancy the frequency of age-related health problems like type 2 diabetes mellitus increases as well. Complications of diabetes are a consequence of longer-term hyperglycemia. Apart from an accurate blood sugar control or conventional therapy there is also an interest in adjuvant treatment options like the application of secondary plant products which include polyphenols. The best studied flavonol quercetin from apples and onions belongs to the polyphenols, too.

Research studies using the model organism *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) already showed that incubation with glucose decreases survival of the nematodes. One of the responsible mechanisms is the reduction of proteasomal activity in the *mev-1* mutant, which is characterized by increased concentrations of reactive oxygen species (ROS) in mitochondria. By the additional treatment with quercetin proteasome activity as well as survival under heat stress was on the control level again indicating an inhibition of glucotoxicity. So, the aim of the current thesis was the examination of the meaning of the aggresome as a molecular target for the preventive effects of the polyphenol quercetin regarding the glucose-induced damage in the *mev-1* mutant.

The so-called aggresomes are inclusion bodies composed of aggregated proteins when the ubiquitin-proteasome-system is overloaded or impaired to inhibit their toxic effects on cell function by storage and elimination *via* autophagy. Different adaptor proteins like *ubql-1* or *sqst-1* are involved in the formation of aggresomes by binding polyubiquitinated proteins and transporting them with the dynein motor complex, containing the important component *dnc-1*, initially along the microtubules to the vicinity of the nucleus.

After the knockdown of aggresome-related genes *ubql-1* and *dnc-1* by RNA interference (RNAi), protein aggregation increased and survival measured under heat stress at 37 °C was decreased. Under RNAi versus both genes, glucose did not lead to a further reduction of survival, whereas quercetin could not prolong it under glucose exposition. This shows that glucose-induced inhibition and quercetin-induced activation of aggresome-related genes influence the stress resistance and survival of *mev-1* conversely. However, despite the reduction of autophagy, knockdown of *sqst-1* had no effects on the survival of the nematodes, on the survival reduction by glucose or the survival prolongation by quercetin in the presence of glucose. So, in opposite to *ubql-1* and *dnc-1*, *sqst-1* was not detected as a target gene of glucose and quercetin. Because of the increase of proteasome activity under RNAi versus *sqst-1* the proteasome could be identified as a compensatory mechanism against the reduced aggresome formation.

As mitochondria are involved in diabetic complications through the increased ROS production under hyperglycemic conditions, the specific elimination of these organelles *via* mitophagy was also examined. Under RNAi versus mitophagy-related genes (*dct-1*, *drp-1*, *eat-3*, *fis-1*, *fzo1*, *glb-1*, *pink-1* und *pgam-5*) survival of *mev-1* at 37 °C, proteasome activity, autophagy as well as the formation of lysosomes were reduced, whereas the mitochondrial ROS levels and protein aggregation were increased. Only in functional absence of PDR-1, survival of the nematodes, proteasome activity and protein aggregation were not influenced compared to the control group despite the increased ROS concentration. This is apparently achieved by the compensatory induction of mitophagy after knockdown of *pdr-1*.

In summary, it can be established that the increase of the protein aggregation by the disturbance of members of the proteostasis-network without compensatory mechanisms impairs survival of *C. elegans* under heat stress conditions. These mechanisms occurred solely in functional absence of *sqst-1* and *pdr-1*. Therefore, besides the degradation of mitochondria *via* autophagosomes also the elimination of damaged proteins through aggresomes is important for survival of the nematodes. Here, *ubq1-1* and *dnc-1* could be identified as aggresome-relevant molecular targets in the *mev-1* mutant regarding the survival prolongation under glucotoxic conditions.

8 Literatur

1. Klenk J, Keil U, Jaensch A, Christiansen MC, Nagel G (2016) Changes in life expectancy 1950-2010: contributions from age- and disease-specific mortality in selected countries. *Popul Health Metr* 14:20. doi:10.1186/s12963-016-0089-x
2. Fang EF, Waltz TB, Kassahun H, Lu Q, Kerr JS, Morevati M, Fivenson EM, Wollman BN, Marosi K, Wilson MA, Iser WB, Eckley DM, Zhang Y, Lehrmann E, Goldberg IG, Scheibye-Knudsen M, Mattson MP, Nilsen H, Bohr VA, Becker KG (2017) Tomatidine enhances lifespan and healthspan in *C. elegans* through mitophagy induction via the SKN-1/Nrf2 pathway. *Sci Rep* 7:46208. doi:10.1038/srep46208
3. Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU (2018) Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J Cell Biol* 217(1):51–63. doi:10.1083/jcb.201709072
4. Webster CP, Smith EF, Shaw PJ, Vos KJ de (2017) Protein Homeostasis in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Therapeutic Opportunities? *Front Mol Neurosci* 10:123. doi:10.3389/fnmol.2017.00123
5. Amm I, Sommer T, Wolf DH (2014) Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 1843(1):182–196. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.031
6. Noormohammadi A, Calculli G, Gutierrez-Garcia R, Khodakarami A, Koyuncu S, Vilchez D (2018) Mechanisms of protein homeostasis (proteostasis) maintain stem cell identity in mammalian pluripotent stem cells. *Cell Mol Life Sci* 75(2):275–290. doi:10.1007/s00018-017-2602-1
7. Labbadia J, Morimoto RI (2015) The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev Biochem* 84:435–464. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-033955
8. Sin O, Nollen EAA (2015) Regulation of protein homeostasis in neurodegenerative diseases: the role of coding and non-coding genes. *Cell Mol Life Sci* 72(21):4027–4047. doi:10.1007/s00018-015-1985-0
9. Buchberger A, Bukau B, Sommer T (2010) Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum. Brothers in arms. *Mol Cell* 40(2):238–252. doi:10.1016/j.molcel.2010.10.001
10. Tyedmers J, Mogk A, Bukau B (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(11):777–788. doi:10.1038/nrm2993

11. Miguel RN (2004) Sequence patterns derived from the automated prediction of functional residues in structurally-aligned homologous protein families. *Bioinformatics* 20(15):2380–2389. doi:10.1093/bioinformatics/bth255
12. Hipp MS, Park S-H, Hartl FU (2014) Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol* 24(9):506–514. doi:10.1016/j.tcb.2014.05.003
13. Bernstein LH (2017) Diabetes is a Disease Characterized by Impaired Proteostasis. *OAJTMR* 1(3). doi:10.15406/oajtmr.2017.01.00018
14. Kaushik S, Cuervo AM (2015) Proteostasis and aging. *Nat Med* 21(12):1406–1415. doi:10.1038/nm.4001
15. Sala AJ, Bott LC, Morimoto RI (2017) Shaping proteostasis at the cellular, tissue, and organismal level. *J Cell Biol* 216(5):1231–1241. doi:10.1083/jcb.201612111
16. Chen B, Retzlaff M, Roos T, Frydman J (2011) Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(8):a004374. doi:10.1101/cshperspect.a004374
17. Jovaisaite V, Mouchiroud L, Auwerx J (2014) The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. *J Exp Biol* 217(Pt 1):137–143. doi:10.1242/jeb.090738
18. Shinkai Y, Masuda A, Akiyama M, Xian M, Kumagai Y (2017) Cadmium-Mediated Activation of the HSP90/HSF1 Pathway Regulated by Reactive Persulfides/Polysulfides. *Toxicol Sci* 156(2):412–421. doi:10.1093/toxsci/kfw268
19. Dubey A, Prajapati KS, Swamy M, Pachauri V (2015) Heat shock proteins. A therapeutic target worth to consider. *Vet World* 8(1):46–51. doi:10.14202/vetworld.2015.46-51
20. Al-Whaibi MH (2011) Plant heat-shock proteins. A mini review. *Journal of King Saud University - Science* 23(2):139–150. doi:10.1016/j.jksus.2010.06.022
21. Vandewynckel Y-P, Laukens D, Geerts A, Bogaerts E, Paridaens A, Verhelst X, Janssens S, Heindryckx F, van Vlierberghe H (2013) The paradox of the unfolded protein response in cancer. *Anticancer Res* 33(11):4683–4694
22. Haynes CM, Ron D (2010) The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *J Cell Sci* 123(Pt 22):3849–3855. doi:10.1242/jcs.075119
23. Pellegrino MW, Nargund AM, Haynes CM (2013) Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta* 1833(2):410–416. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.02.019

24. Horibe T, Hoogenraad NJ (2007) The chop gene contains an element for the positive regulation of the mitochondrial unfolded protein response. *PLoS ONE* 2(9):e835. doi:10.1371/journal.pone.0000835
25. Kang S, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2013) A novel role for the mitochondrial HTRA2/OMI protease in aging. *Autophagy* 9(3):420–421. doi:10.4161/auto.22920
26. Osowski CM, Urano F (2011) Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Meth Enzymol* 490:71–92. doi:10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0
27. Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7):519–529. doi:10.1038/nrm2199
28. Yang L, Zhao D, Ren J, Yang J (2015) Endoplasmic reticulum stress and protein quality control in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 1852(2):209–218. doi:10.1016/j.bbadis.2014.05.006
29. Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296(5575):1991–1995. doi:10.1126/science.1067122
30. Milisav I, Šuput D, Ribarič S (2015) Unfolded Protein Response and Macroautophagy in Alzheimer's, Parkinson's and Prion Diseases. *Molecules* 20(12):22718–22756. doi:10.3390/molecules201219865
31. Lee AS (2005) The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 35(4):373–381. doi:10.1016/j.ymeth.2004.10.010
32. Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS (2009) Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxid Redox Signal* 11(9):2307–2316. doi:10.1089/ars.2009.2485
33. Cao SS, Kaufman RJ (2012) Unfolded protein response. *Curr Biol* 22(16):R622-6. doi:10.1016/j.cub.2012.07.004
34. Chen Y, Brandizzi F (2013) IRE1. ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol* 23(11):547–555. doi:10.1016/j.tcb.2013.06.005
35. Oakes SA (2017) Endoplasmic reticulum proteostasis. A key checkpoint in cancer. *Am J Physiol , Cell Physiol* 312(2):C93-C102. doi:10.1152/ajpcell.00266.2016
36. Fribley A, Zhang K, Kaufman RJ (2009) Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Methods Mol Biol* 559:191–204. doi:10.1007/978-1-60327-017-5_14

37. Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P (2013) Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(3):a013169. doi:10.1101/cshperspect.a013169
38. Zolk O, Schenke C, Sarikas A (2006) The ubiquitin-proteasome system. Focus on the heart. *Cardiovasc Res* 70(3):410–421. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.021
39. Vilchez D, Saez I, Dillin A (2014) The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nat Commun* 5:5659. doi:10.1038/ncomms6659
40. Wang C, Wang X (2015) The interplay between autophagy and the ubiquitin-proteasome system in cardiac proteotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1852(2):188–194. doi:10.1016/j.bbadis.2014.07.028
41. Li W, Ye Y (2008) Polyubiquitin chains. Functions, structures, and mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 65(15):2397–2406. doi:10.1007/s00018-008-8090-6
42. Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD (2009) Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 78:363–397. doi:10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526
43. Lee I, Schindelin H (2008) Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes. *Cell* 134(2):268–278. doi:10.1016/j.cell.2008.05.046
44. Ronchi VP, Haas AL (2012) Measuring rates of ubiquitin chain formation as a functional readout of ligase activity. *Methods Mol Biol* 832:197–218. doi:10.1007/978-1-61779-474-2_14
45. Hamilton KS, Ellison MJ, Barber KR, Williams RS, Huzil JT, McKenna S, Ptak C, Glover M, Shaw GS (2001) Structure of a Conjugating Enzyme-Ubiquitin Thiolester Intermediate Reveals a Novel Role for the Ubiquitin Tail. *Structure* 9(10):897–904. doi:10.1016/S0969-2126(01)00657-8
46. Jadhav T, Wooten MW (2009) Defining an Embedded Code for Protein Ubiquitination. *J Proteomics Bioinform* 2:316. doi:10.4172/jpb.1000091
47. Zhang L, Xu M, Scotti E, Chen ZJ, Tontonoz P (2013) Both K63 and K48 ubiquitin linkages signal lysosomal degradation of the LDL receptor. *J Lipid Res* 54(5):1410–1420. doi:10.1194/jlr.M035774
48. Tanaka K (2009) The proteasome. Overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 85(1):12–36. doi:10.2183/pjab.85.12

49. Isono E, Nishihara K, Saeki Y, Yashiroda H, Kamata N, Ge L, Ueda T, Kikuchi Y, Tanaka K, Nakano A, Toh-e A (2007) The assembly pathway of the 19S regulatory particle of the yeast 26S proteasome. *Molecular Biology of the Cell* 18(2):569–580. doi:10.1091/mbc.e06-07-0635
50. Ehlinger A, Walters KJ (2013) Structural insights into proteasome activation by the 19S regulatory particle. *Biochemistry* 52(21):3618–3628. doi:10.1021/bi400417a
51. Bar-Nun S, Glickman MH (2012) Proteasomal AAA-ATPases. Structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1823(1):67–82. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.07.009
52. Wlodawer A (1995) Proteasome. A complex protease with a new fold and a distinct mechanism. *Structure* 3(5):417–420. doi:10.1016/S0969-2126(01)00172-1
53. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR (1998) Aggresomes. A Cellular Response to Misfolded Proteins. *J Cell Biol* 143(7):1883–1898. doi:10.1083/jcb.143.7.1883
54. Hao R, Nanduri P, Rao Y, Panichelli RS, Ito A, Yoshida M, Yao T-P (2013) Proteasomes activate aggresome disassembly and clearance by producing unanchored ubiquitin chains. *Mol Cell* 51(6):819–828. doi:10.1016/j.molcel.2013.08.016
55. García-Mata R, Bebök Z, Sorscher EJ, Sztul ES (1999) Characterization and Dynamics of Aggresome Formation by a Cytosolic Gfp-Chimera⁺. *J Cell Biol* 146(6):1239–1254. doi:10.1083/jcb.146.6.1239
56. Taylor JP (2003) Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Hum Mol Genet* 12(7):749–757. doi:10.1093/hmg/ddg074
57. Olzmann JA, Li L, Chin LS (2008) Aggresome formation and neurodegenerative diseases: therapeutic implications. *Curr Med Chem* 15(1):47–60
58. Meriin AB, Wang Y, Sherman MY (2010) Isolation of aggresomes and other large aggregates. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3:Unit 3.38.1-9. doi:10.1002/0471143030.cb0338s48
59. Taylor RC, Dillin A (2011) Aging as an event of proteostasis collapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(5). doi:10.1101/cshperspect.a004440
60. Olzmann JA, Li L, Chudaev MV, Chen J, Perez FA, Palmiter RD, Chin L-S (2007) Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6. *J Cell Biol* 178(6):1025–1038. doi:10.1083/jcb.200611128

61. Pai M-T, Tzeng S-R, Kovacs JJ, Keaton MA, Li SS-C, Yao T-P, Zhou P (2007) Solution structure of the Ubp-M BUZ domain, a highly specific protein module that recognizes the C-terminal tail of free ubiquitin. *J Mol Biol* 370(2):290–302. doi:10.1016/j.jmb.2007.04.015
62. Viswanathan J, Haapasalo A, Böttcher C, Miettinen R, Kurkinen KMA, Lu A, Thomas A, Maynard CJ, Romano D, Hyman BT, Berezovska O, Bertram L, Soininen H, Dantuma NP, Tanzi RE, Hiltunen M (2011) Alzheimer's disease-associated ubiquilin-1 regulates presenilin-1 accumulation and aggresome formation. *Traffic* 12(3):330–348. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01149.x
63. Zhang C, Saunders AJ (2009) An emerging role for Ubiquilin 1 in regulating protein quality control system and in disease pathogenesis. *Discov Med* 8(40):18–22
64. Lee DY, Brown EJ (2012) Ubiquilins in the crosstalk among proteolytic pathways. *Biol Chem* 393(6):441–447. doi:10.1515/hsz-2012-0120
65. Cohen-Kaplan V, Ciechanover A, Livneh I (2016) p62 at the crossroad of the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Oncotarget* 7(51):83833–83834. doi:10.18632/oncotarget.13805
66. Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, Johansen T (2009) Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. In: Klionsky DJ (Hrsg) *Autophagy in mammalian systems. Part B*, Bd 452. Academic, San Diego, Calif, London, S 181–197
67. Seibenhener ML, Babu JR, Geetha T, Wong HC, Krishna NR, Wooten MW (2004) Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol* 24(18):8055–8068. doi:10.1128/MCB.24.18.8055-8068.2004
68. Sample A, Zhao B, Qiang L, He Y-Y (2017) Adaptor protein p62 promotes skin tumor growth and metastasis and is induced by UVA radiation. *J Biol Chem* 292(36):14786–14795. doi:10.1074/jbc.M117.786160
69. Zhou L, Wang H, Chen D, Gao F, Ying Z, Wang G (2014) p62/sequestosome 1 regulates aggresome formation of pathogenic ataxin-3 with expanded polyglutamine. *Int J Mol Sci* 15(9):14997–15010. doi:10.3390/ijms150914997
70. Matsumoto G, Inobe T, Amano T, Murai K, Nukina N, Mori N (2018) N-Acetyldopamine induces aggresome formation without proteasome inhibition and enhances protein aggregation via p62/SQSTM1 expression. *Sci Rep* 8(1):9585. doi:10.1038/s41598-018-27872-6

71. Roberts AJ, Kon T, Knight PJ, Sutoh K, Burgess SA (2013) Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(11):713–726. doi:10.1038/nrm3667
72. Calderilla-Barbosa L, Seibenhener ML, Du Y, Diaz-Meco M-T, Moscat J, Yan J, Wooten MW, Wooten MC (2014) Interaction of SQSTM1 with the motor protein dynein--SQSTM1 is required for normal dynein function and trafficking. *J Cell Sci* 127(Pt 18):4052–4063. doi:10.1242/jcs.152363
73. Jia B, Wu Y, Zhou Y (2014) 14-3-3 and aggresome formation. Implications in neurodegenerative diseases. *Prion* 8(2):173–177. doi:10.4161/pri.28123
74. Lee I-G, Olenick MA, Boczkowska M, Franzini-Armstrong C, Holzbaur ELF, Dominguez R (2018) A conserved interaction of the dynein light intermediate chain with dynein-dynactin effectors necessary for processivity. *Nat Commun* 9(1):986. doi:10.1038/s41467-018-03412-8
75. Urnavicius L, Zhang K, Diamant AG, Motz C, Schlager MA, Yu M, Patel NA, Robinson CV, Carter AP (2015) The structure of the dynactin complex and its interaction with dynein. *Science* 347(6229):1441–1446. doi:10.1126/science.aaa4080
76. Park J, Park Y, Ryu I, Choi M-H, Lee HJ, Oh N, Kim K, Kim KM, Choe J, Lee C, Baik J-H, Kim YK (2017) Misfolded polypeptides are selectively recognized and transported toward aggresomes by a CED complex. *Nat Commun* 8:15730. doi:10.1038/ncomms15730
77. Burnett BG, Pittman RN (2005) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(12):4330–4335. doi:10.1073/pnas.0407252102
78. Garcia-Mata R, Gao Y-S, Sztul E (2002) Hassles with taking out the garbage. Aggravating aggresomes. *Traffic* 3(6):388–396
79. Zaarur N, Meriin AB, Gabai VL, Sherman MY (2008) Triggering aggresome formation. Dissecting aggresome-targeting and aggregation signals in synphilin 1. *J. Biol. Chem.* 283(41):27575–27584. doi:10.1074/jbc.M802216200
80. Chin L-S, Olzmann JA, Li L (2010) Parkin-mediated ubiquitin signalling in aggresome formation and autophagy. *Biochem Soc Trans* 38(Pt 1):144–149. doi:10.1042/BST0380144
81. Duncan JE, Goldstein LSB (2006) The genetics of axonal transport and axonal transport disorders. *PLoS Genet* 2(9):e124. doi:10.1371/journal.pgen.0020124

82. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 282(33):24131–24145. doi:10.1074/jbc.M702824200
83. Yan J, Seibenhener ML, Calderilla-Barbosa L, Diaz-Meco M-T, Moscat J, Jiang J, Wooten MW, Wooten MC (2013) SQSTM1/p62 interacts with HDAC6 and regulates deacetylase activity. *PLoS ONE* 8(9):e76016. doi:10.1371/journal.pone.0076016
84. Lee J-Y, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao Y-S, Pandey UB, Kaushik S, Tresse E, Lu J, Taylor JP, Cuervo AM, Yao T-P (2010) HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J* 29(5):969–980. doi:10.1038/emboj.2009.405
85. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao T-P (2003) The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress. *Cell* 115(6):727–738. doi:10.1016/S0092-8674(03)00939-5
86. Das G, Shrivage BV, Baehrecke EH (2012) Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(6). doi:10.1101/cshperspect.a008813
87. Bejarano E, Cuervo AM (2010) Chaperone-mediated autophagy. *Proc Am Thorac Soc* 7(1):29–39. doi:10.1513/pats.200909-102JS
88. Youle RJ, Narendra DP (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(1):9–14. doi:10.1038/nrm3028
89. Klionsky DJ (2005) The molecular machinery of autophagy. Unanswered questions. *J Cell Sci* 118(Pt 1):7–18. doi:10.1242/jcs.01620
90. Kaushik S, Singh R, Cuervo AM (2010) Autophagic pathways and metabolic stress. *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2:4–14. doi:10.1111/j.1463-1326.2010.01263.x
91. Kim B-W, Kwon DH, Song HK (2016) Structure biology of selective autophagy receptors. *BMB Rep* 49(2):73–80. doi:10.5483/BMBRep.2016.49.2.265
92. Zheng L, Terman A, Hallbeck M, Dehvari N, Cowburn RF, Benedikz E, Kågedal K, Cedazo-Minguez A, Marcusson J (2014) Macroautophagy-generated increase of lysosomal amyloid β -protein mediates oxidant-induced apoptosis of cultured neuroblastoma cells. *Autophagy* 7(12):1528–1545. doi:10.4161/auto.7.12.18051

93. Yang R, Gao G, Mao Z, Yang Q (2016) Chaperone-Mediated Autophagy and Mitochondrial Homeostasis in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* 2016:2613401. doi:10.1155/2016/2613401
94. Kaushik S, Cuervo AM (2012) Chaperones in autophagy. *Pharmacol Res* 66(6):484–493. doi:10.1016/j.phrs.2012.10.002
95. Ghosh R, Pattison JS (2018) Macroautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy in Heart Failure. *The Known and the Unknown. Oxid Med Cell Longev* 2018:8602041. doi:10.1155/2018/8602041
96. Cuervo AM, Wong E (2014) Chaperone-mediated autophagy. Roles in disease and aging. *Cell Res* 24(1):92–104. doi:10.1038/cr.2013.153
97. Kundu M, Thompson CB (2005) Macroautophagy versus mitochondrial autophagy. A question of fate? *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1484–1489. doi:10.1038/sj.cdd.4401780
98. Fujiwara Y, Wada K, Kabuta T (2017) Lysosomal degradation of intracellular nucleic acids-multiple autophagic pathways. *J Biochem* 161(2):145–154. doi:10.1093/jb/mvw085
99. Oku M, Maeda Y, Kagohashi Y, Kondo T, Yamada M, Fujimoto T, Sakai Y (2017) Evidence for ESCRT- and clathrin-dependent microautophagy. *J Cell Biol* 216(10):3263–3274. doi:10.1083/jcb.201611029
100. Li W-w, Li J, Bao J-k (2012) Microautophagy. Lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* 69(7):1125–1136. doi:10.1007/s00018-011-0865-5
101. Jin M, Liu X, Klionsky DJ (2013) SnapShot. Selective autophagy. *Cell* 152(1-2):368-368.e2. doi:10.1016/j.cell.2013.01.004
102. Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, Potolicchio I, Nieves E, Cuervo AM, Santambrogio L (2011) Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Developmental Cell* 20(1):131–139. doi:10.1016/j.devcel.2010.12.003
103. Mukherjee A, Patel B, Koga H, Cuervo AM, Jenny A (2016) Selective endosomal microautophagy is starvation-inducible in *Drosophila*. *Autophagy* 12(11):1984–1999. doi:10.1080/15548627.2016.1208887
104. Parzych KR, Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy. Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 20(3):460–473. doi:10.1089/ars.2013.5371
105. Zaffagnini G, Martens S (2016) Mechanisms of Selective Autophagy. *J Mol Biol* 428(9 Pt A):1714–1724. doi:10.1016/j.jmb.2016.02.004

106. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 24(1):24–41. doi:10.1038/cr.2013.168
107. Mizushima N (2007) Autophagy. Process and function. *Genes Dev* 21(22):2861–2873. doi:10.1101/gad.1599207
108. Abounit K, Scarabelli TM, McCauley RB (2012) Autophagy in mammalian cells. *World J Biol Chem* 3(1):1–6. doi:10.4331/wjbc.v3.i1.1
109. Mizushima N (2010) The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22(2):132–139. doi:10.1016/j.ceb.2009.12.004
110. Wong P-M, Puente C, Ganley IG, Jiang X (2013) The ULK1 complex. Sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy* 9(2):124–137. doi:10.4161/auto.23323
111. Yang Z, Klionsky DJ (2010) Mammalian autophagy. Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22(2):124–131. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.014
112. Farré J-C, Subramani S (2016) Mechanistic insights into selective autophagy pathways. Lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17(9):537–552. doi:10.1038/nrm.2016.74
113. Jung CH, Seo M, Otto NM, Kim D-H (2011) ULK1 inhibits the kinase activity of mTORC1 and cell proliferation. *Autophagy* 7(10):1212–1221. doi:10.4161/auto.7.10.16660
114. Jung CH, Ro S-H, Cao J, Otto NM, Kim D-H (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters* 584(7):1287–1295. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017
115. Wong P-M, Feng Y, Wang J, Shi R, Jiang X (2015) Regulation of autophagy by coordinated action of mTORC1 and protein phosphatase 2A. *Nat Commun* 6:8048. doi:10.1038/ncomms9048
116. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13(2):132–141. doi:10.1038/ncb2152
117. Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang Y-Y, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan K-L (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* 15(7):741–750. doi:10.1038/ncb2757
118. Pyo JO, Nah J, Jung YK (2012) Molecules and their functions in autophagy. *Exp Mol Med* 44(2):73–80. doi:10.3858/emm.2012.44.2.029

119. Boutouja F, Brinkmeier R, Mastalski T, El Magraoui F, Platta HW (2017) Regulation of the Tumor-Suppressor BECLIN 1 by Distinct Ubiquitination Cascades. *Int J Mol Sci* 18(12). doi:10.3390/ijms18122541
120. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D (2011) The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 18(4):571–580. doi:10.1038/cdd.2010.191
121. Marquez RT, Xu L (2012) Bcl-2. Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am J Cancer Res* 2(2):214–221
122. McKnight NC, Zhenyu Y (2013) Beclin 1, an Essential Component and Master Regulator of PI3K-III in Health and Disease. *Curr Pathobiol Rep* 1(4):231–238. doi:10.1007/s40139-013-0028-5
123. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122(6):927–939. doi:10.1016/j.cell.2005.07.002
124. Decuypere J-P, Parys JB, Bultynck G (2012) Regulation of the autophagic bcl-2/beclin 1 interaction. *Cells* 1(3):284–312. doi:10.3390/cells1030284
125. Geng J, Klionsky DJ (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications. Beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* 9(9):859–864. doi:10.1038/embor.2008.163
126. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 27(6):421–429
127. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 117(Pt 13):2805–2812. doi:10.1242/jcs.01131
128. Kadowaki M, Karim MR (2009) Chapter 13 Cytosolic LC3 Ratio as a Quantitative Index of Macroautophagy. In: Klionsky DJ (Hrsg) *Autophagy in mammalian systems*. Part B, Bd 452. Academic, San Diego, Calif, London, S 199–213
129. Appelqvist H, Wäster P, Kågedal K, Öllinger K (2013) The lysosome. From waste bag to potential therapeutic target. *J Mol Cell Biol* 5(4):214–226. doi:10.1093/jmcb/mjt022
130. Nissanka N, Moraes CT (2018) Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. *FEBS Letters* 592(5):728–742. doi:10.1002/1873-3468.12956

131. Ricci J-E, Muñoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, Scheffler IE, Ellisman MH, Green DR (2004) Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 117(6):773–786. doi:10.1016/j.cell.2004.05.008
132. Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417(1):1–13. doi:10.1042/BJ20081386
133. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM (2016) Harmful and Beneficial Role of ROS. *Oxid Med Cell Longev* 2016:7909186. doi:10.1155/2016/7909186
134. Schieber M, Chandel NS (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 24(10):R453-62. doi:10.1016/j.cub.2014.03.034
135. Mittler R (2017) ROS Are Good. *Trends Plant Sci* 22(1):11–19. doi:10.1016/j.tplants.2016.08.002
136. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* 2012(1):1–26. doi:10.1155/2012/217037
137. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5(1):9–19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
138. Taylor RW, Turnbull DM (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 6(5):389–402. doi:10.1038/nrg1606
139. Madabhushi R, Pan L, Tsai L-H (2014) DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron* 83(2):266–282. doi:10.1016/j.neuron.2014.06.034
140. Baumann K (2016) Ageing. The yin and yang of mitochondrial dysfunction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17(6):331. doi:10.1038/nrm.2016.71
141. Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Hernandez-Mijares A, Rocha M, Victor VM (2017) Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes. Pathophysiological implications. *Redox Biol* 11:637–645. doi:10.1016/j.redox.2017.01.013
142. Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH (2017) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta* 1863(5):1066–1077. doi:10.1016/j.bbadis.2016.11.010
143. Mishra P, Chan DC (2016) Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol* 212(4):379–387. doi:10.1083/jcb.201511036

144. Romanello V, Sandri M (2010) Mitochondrial biogenesis and fragmentation as regulators of muscle protein degradation. *Curr Hypertens Rep* 12(6):433–439. doi:10.1007/s11906-010-0157-8
145. Wang C, Du W, Su QP, Zhu M, Feng P, Li Y, Zhou Y, Mi N, Zhu Y, Jiang D, Zhang S, Zhang Z, Sun Y, Yu L (2015) Dynamic tubulation of mitochondria drives mitochondrial network formation. *Cell Res* 25(10):1108–1120. doi:10.1038/cr.2015.89
146. Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J (2011) Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(25):10190–10195. doi:10.1073/pnas.1107402108
147. Le Chen, Winger AJ, Knowlton AA (2014) Mitochondrial dynamic changes in health and genetic diseases. *Mol Biol Rep* 41(11):7053–7062. doi:10.1007/s11033-014-3663-y
148. Scott I, Youle RJ (2010) Mitochondrial fission and fusion. *Essays Biochem* 47:85–98. doi:10.1042/bse0470085
149. Kanamaru Y, Sekine S, Ichijo H, Takeda K (2012) The phosphorylation-dependent regulation of mitochondrial proteins in stress responses. *J Signal Transduct* 2012:931215. doi:10.1155/2012/931215
150. Imai Y, Kanao T, Sawada T, Kobayashi Y, Moriwaki Y, Ishida Y, Takeda K, Ichijo H, Lu B, Takahashi R (2010) The loss of PGAM5 suppresses the mitochondrial degeneration caused by inactivation of PINK1 in *Drosophila*. *PLoS Genet* 6(12):e1001229. doi:10.1371/journal.pgen.1001229
151. Ziviani E, Tao RN, Whitworth AJ (2010) *Drosophila* parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(11):5018–5023. doi:10.1073/pnas.0913485107
152. Baker MJ, Tatsuta T, Langer T (2011) Quality control of mitochondrial proteostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(7). doi:10.1101/cshperspect.a007559
153. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K (2007) Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* 282(15):11521–11529. doi:10.1074/jbc.M607279200
154. Anton F, Fres JM, Schauss A, Pinson B, Praefcke GJK, Langer T, Escobar-Henriques M (2011) Ugo1 and Mdm30 act sequentially during Fzo1-mediated mitochondrial outer membrane fusion. *J Cell Sci* 124(Pt 7):1126–1135. doi:10.1242/jcs.073080

155. Mishra P, Carelli V, Manfredi G, Chan DC (2014) Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 19(4):630–641. doi:10.1016/j.cmet.2014.03.011
156. Balog J, Mehta SL, Vemuganti R (2016) Mitochondrial fission and fusion in secondary brain damage after CNS insults. *J Cereb Blood Flow Metab* 36(12):2022–2033. doi:10.1177/0271678X16671528
157. Choi S-G, Kim H, Jeong EI, Lee H-J, Park S, Lee S-Y, Lee H-J, Lee SW, Chung CH, Jung Y-K (2017) SUMO-Modified FADD Recruits Cytosolic Drp1 and Caspase-10 to Mitochondria for Regulated Necrosis. *Mol Cell Biol* 37(2). doi:10.1128/MCB.00254-16
158. Moriwaki K, Farias Luz N, Balaji S, Rosa MJ de, O'Donnell CL, Gough PJ, Bertin J, Welsh RM, Chan FK-M (2016) The Mitochondrial Phosphatase PGAM5 Is Dispensable for Necroptosis but Promotes Inflammasome Activation in Macrophages. *J Immunol* 196(1):407–415. doi:10.4049/jimmunol.1501662
159. Liu L, Sakakibara K, Chen Q, Okamoto K (2014) Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Res* 24(7):787–795. doi:10.1038/cr.2014.75
160. Losón OC, Song Z, Chen H, Chan DC (2013) Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular Biology of the Cell* 24(5):659–667. doi:10.1091/mbc.E12-10-0721
161. Twig G, Hyde B, Shirihai OS (2008) Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis. The bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* 1777(9):1092–1097. doi:10.1016/j.bbabi.2008.05.001
162. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N (2015) Coupling mitogenesis and mitophagy for longevity. *Autophagy* 11(8):1428–1430. doi:10.1080/15548627.2015.1061172
163. Palikaras K, Daskalaki I, Markaki M, Tavernarakis N (2017) Mitophagy and age-related pathologies. Development of new therapeutics by targeting mitochondrial turnover. *Pharmacol Ther* 178:157–174. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.04.005
164. Fukuda T, Kanki T (2018) Mechanisms and Physiological Roles of Mitophagy in Yeast. *Mol Cells* 41(1):35–44. doi:10.14348/molcells.2018.2214
165. Wu H, Xue D, Chen G, Han Z, Huang L, Zhu C, Wang X, Jin H, Wang J, Zhu Y, Liu L, Chen Q (2014) The BCL2L1 and PGAM5 axis defines hypoxia-induced receptor-mediated mitophagy. *Autophagy* 10(10):1712–1725. doi:10.4161/auto.29568
166. Malena A, Pantic B, Borgia D, Sgarbi G, Solaini G, Holt IJ, Spinazzola A, Perissinotto E, Sandri M, Baracca A, Vergani L (2016) Mitochondrial quality control: Cell-type-

- dependent responses to pathological mutant mitochondrial DNA. *Autophagy* 12(11):2098–2112. doi:10.1080/15548627.2016.1226734
167. Crow MT (2002) Hypoxia, BNip3 Proteins, and the Mitochondrial Death Pathway in Cardiomyocytes. *Circ Res* 91(3):183–185. doi:10.1161/01.RES.0000030195.38795.CF
168. Ney PA (2015) Mitochondrial autophagy. Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochim Biophys Acta* 1853(10 Pt B):2775–2783. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.02.022
169. Zhu Y, Massen S, Terenzio M, Lang V, Chen-Lindner S, Eils R, Novak I, Dikic I, Hamacher-Brady A, Brady NR (2013) Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis. *J Biol Chem* 288(2):1099–1113. doi:10.1074/jbc.M112.399345
170. Shi R-Y, Zhu S-H, Li V, Gibson SB, Xu X-S, Kong J-M (2014) BNIP3 interacting with LC3 triggers excessive mitophagy in delayed neuronal death in stroke. *CNS Neurosci Ther* 20(12):1045–1055. doi:10.1111/cns.12325
171. Zhang J, Ney PA (2009) Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ* 16(7):939–946. doi:10.1038/cdd.2009.16
172. Lee Y, Lee H-Y, Hanna RA, Gustafsson ÅB (2011) Mitochondrial autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301(5):H1924-31. doi:10.1152/ajpheart.00368.2011
173. Chen M, Chen Z, Wang Y, Tan Z, Zhu C, Li Y, Han Z, Chen L, Gao R, Liu L, Chen Q (2016) Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy* 12(4):689–702. doi:10.1080/15548627.2016.1151580
174. Jin SM, Youle RJ (2012) PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *J Cell Sci* 125(Pt 4):795–799. doi:10.1242/jcs.093849
175. Eiyama A, Okamoto K (2015) PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 33:95–101. doi:10.1016/j.ceb.2015.01.002
176. Narendra D, Walker JE, Youle R (2012) Mitochondrial quality control mediated by PINK1 and Parkin. Links to parkinsonism. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(11). doi:10.1101/cshperspect.a011338
177. Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 12(2):119–131. doi:10.1038/ncb2012

178. Ivankovic D, Chau K-Y, Schapira AHV, Gegg ME (2016) Mitochondrial and lysosomal biogenesis are activated following PINK1/parkin-mediated mitophagy. *J Neurochem* 136(2):388–402. doi:10.1111/jnc.13412
179. Mul JD, Stanford KI, Hirshman MF, Goodyear LJ (2015) Exercise and Regulation of Carbohydrate Metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci* 135:17–37. doi:10.1016/bs.pmbts.2015.07.020
180. Asp NG (1994) Nutritional classification and analysis of food carbohydrates. *Am J Clin Nutr* 59(3 Suppl):679S-681S. doi:10.1093/ajcn/59.3.679Sa
181. (2011) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 34 Suppl 1:S62-9. doi:10.2337/dc11-S062
182. Legro RS, Kunesman AR, Dodson WC, Dunaif A (1999) Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 84(1):165–169. doi:10.1210/jcem.84.1.5393
183. Triplitt CL (2012) Examining the mechanisms of glucose regulation. *Am J Manag Care* 18(1 Suppl):S4-10
184. Sha S, Devineni D, Ghosh A, Polidori D, Chien S, Wexler D, Shalayda K, Demarest K, Rothenberg P (2011) Canagliflozin, a novel inhibitor of sodium glucose co-transporter 2, dose dependently reduces calculated renal threshold for glucose excretion and increases urinary glucose excretion in healthy subjects. *Diabetes Obes Metab* 13(7):669–672. doi:10.1111/j.1463-1326.2011.01406.x
185. Karamanou M, Protogerou A, Tsoucalas G, Androutsos G, Poulakou-Rebelakou E (2016) Milestones in the history of diabetes mellitus. The main contributors. *World J Diabetes* 7(1):1–7. doi:10.4239/wjd.v7.i1.1
186. Dagogo-Jack SE, Craft S, Cryer PE (1993) Hypoglycemia-associated autonomic failure in insulin-dependent diabetes mellitus. Recent antecedent hypoglycemia reduces autonomic responses to, symptoms of, and defense against subsequent hypoglycemia. *J Clin Invest* 91(3):819–828. doi:10.1172/JCI116302
187. Florez JC (2008) Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: where are the insulin resistance genes? *Diabetologia* 51(7):1100–1110. doi:10.1007/s00125-008-1025-9

188. Kahn SE (2003) The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46(1):3–19. doi:10.1007/s00125-002-1009-0
189. Tomita T (2016) Apoptosis in pancreatic β -islet cells in Type 2 diabetes. *Bosn J Basic Med Sci* 16(3):162–179. doi:10.17305/bjbms.2016.919
190. Fowler MJ (2008) Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes* 26(2):77–82. doi:10.2337/diaclin.26.2.77
191. Kawahito S, Kitahata H, Oshita S (2009) Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *WJG* 15(33):4137–4142. doi:10.3748/wjg.15.4137
192. Campos C (2012) Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: pathology and clinical sequelae. *Postgrad Med* 124(6):90–97. doi:10.3810/pgm.2012.11.2615
193. Giacco F, Brownlee M (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 107(9):1058–1070. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223545
194. Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865):813–820. doi:10.1038/414813a
195. Leloup C, Tourrel-Cuzin C, Magnan C, Karaca M, Castel J, Carneiro L, Colombani A-L, Ktorza A, Casteilla L, Pénicaud L (2009) Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58(3):673–681. doi:10.2337/db07-1056
196. Jaisson S, Gillery P (2014) Impaired proteostasis: role in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetologia* 57(8):1517–1527. doi:10.1007/s00125-014-3257-1
197. Devalaraja-Narashimha K, Padanilam BJ (2009) PARP-1 inhibits glycolysis in ischemic kidneys. *J Am Soc Nephrol* 20(1):95–103. doi:10.1681/ASN.2008030325
198. Banerjee M, Vats P (2014) Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biol* 2:170–177. doi:10.1016/j.redox.2013.12.001
199. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T (2015) Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules* 5(1):194–222. doi:10.3390/biom5010194
200. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS (2014) Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol* 18(1):1–14. doi:10.4196/kjpp.2014.18.1.1

201. Hatzioannou A, Kanistras I, Mantzou E, Anastasiou E, Peppas M, Sarantopoulou V, Lymberi P, Alevizaki M (2015) Effect of Advanced Glycation End Products on Human Thyroglobulin's Antigenicity as Identified by the Use of Sera from Patients with Hashimoto's Thyroiditis and Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Endocrinol* 2015:849615. doi:10.1155/2015/849615
202. Torreggiani M, Liu H, Wu J, Zheng F, Cai W, Striker G, Vlassara H (2009) Advanced glycation end product receptor-1 transgenic mice are resistant to inflammation, oxidative stress, and post-injury intimal hyperplasia. *Am J Pathol* 175(4):1722–1732. doi:10.2353/ajpath.2009.090138
203. Taguchi T, Sugiura M, Hamada Y, Miwa I (1999) Inhibition of advanced protein glycation by a Schiff base between aminoguanidine and pyridoxal. *European Journal of Pharmacology* 378(3):283–289. doi:10.1016/S0014-2999(99)00471-9
204. Li C, Wang H, Juárez M, Ruan ED (2014) Structural Characterization of Amadori Rearrangement Product of Glucosylated N α -Acetyl-Lysine by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *International Journal of Spectroscopy* 2014(2):1–6. doi:10.1155/2014/789356
205. Choi S-Y, Jung S-H, Lee H-S, Park K-W, Yun B-S, Lee K-W (2008) Glycation inhibitory activity and the identification of an active compound in *Plantago asiatica* extract. *Phytother Res* 22(3):323–329. doi:10.1002/ptr.2316
206. Li X, Zheng T, Sang S, Lv L (2014) Quercetin inhibits advanced glycation end product formation by trapping methylglyoxal and glyoxal. *J Agric Food Chem* 62(50):12152–12158. doi:10.1021/jf504132x
207. Price CL, Knight SC (2009) Methylglyoxal. Possible link between hyperglycaemia and immune suppression? *Trends Endocrinol Metab* 20(7):312–317. doi:10.1016/j.tem.2009.03.010
208. Queisser MA, Yao D, Geisler S, Hammes H-P, Lochnit G, Schleicher ED, Brownlee M, Preissner KT (2010) Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal. *Diabetes* 59(3):670–678. doi:10.2337/db08-1565
209. Jia X, Olson DJH, Ross ARS, Wu L (2006) Structural and functional changes in human insulin induced by methylglyoxal. *FASEB J* 20(9):1555–1557. doi:10.1096/fj.05-5478fje
210. Fu M-X, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR (1996) The Advanced Glycation End Product, N-(Carboxymethyl)lysine, Is a Product of both Lipid

Peroxidation and Glycoxidation Reactions. *J. Biol. Chem.* 271(17):9982–9986.

doi:10.1074/jbc.271.17.9982

211. Sherwani SI, Khan HA, Ekhzaimy A, Masood A, Sakharkar MK (2016) Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomark Insights* 11:95–104. doi:10.4137/BMI.S38440
212. Kim HJ, Kim YG, Park JS, Ahn YH, Ha KH, Kim DJ (2016) Association between blood glucose level derived using the oral glucose tolerance test and glycated hemoglobin level. *Korean J Intern Med* 31(3):535–542. doi:10.3904/kjim.2015.075
213. Makita Z, Vlassara H, Rayfield E, Cartwright K, Friedman E, Rodby R, Cerami A, Bucala R (1992) Hemoglobin-AGE. A circulating marker of advanced glycosylation. *Science* 258(5082):651–653. doi:10.1126/science.1411574
214. Nakamura S, Makita Z, Ishikawa S, Yasumura K, Fujii W, Yanagisawa K, Kawata T, Koike T (1997) Progression of Nephropathy in Spontaneous Diabetic Rats Is Prevented by OPB-9195, a Novel Inhibitor of Advanced Glycation. *Diabetes* 46(5):895–899. doi:10.2337/diab.46.5.895
215. Raghu G, Akileshwari C, Reddy VS, Reddy GB (2017) Attenuation of diabetic retinopathy in rats by ellagic acid through inhibition of AGE formation. *J Food Sci Technol* 54(8):2411–2421. doi:10.1007/s13197-017-2683-8
216. Semba RD, Ferrucci L, Sun K, Beck J, Dalal M, Varadhan R, Walston J, Guralnik JM, Fried LP (2009) Advanced glycation end products and their circulating receptors predict cardiovascular disease mortality in older community-dwelling women. *Aging Clin Exp Res* 21(2):182–190
217. Nah S-S, Choi I-Y, Lee CK, Oh JS, Kim YG, Moon H-B, Yoo B (2008) Effects of advanced glycation end products on the expression of COX-2, PGE2 and NO in human osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)* 47(4):425–431. doi:10.1093/rheumatology/kem376
218. Suga T, Iso T, Shimizu T, Tanaka T, Yamagishi S-i, Takeuchi M, Imaizumi T, Kurabayashi M (2011) Activation of receptor for advanced glycation end products induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb* 18(8):670–683
219. Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Kloting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt A-M, Stern DM, Haring H-U, Schleicher E, Nawroth PP

- (2001) Diabetes-Associated Sustained Activation of the Transcription Factor Nuclear Factor- κ B. *Diabetes* 50(12):2792–2808. doi:10.2337/diabetes.50.12.2792
220. Chuong C, Katz J, Pauley KM, Bulosan M, Cha S (2009) RAGE expression and NF- κ B activation attenuated by extracellular domain of RAGE in human salivary gland cell line. *J Cell Physiol* 221(2):430–434. doi:10.1002/jcp.21873
221. Stock AJ, Kasus-Jacobi A, Wren JD, Sjoelund VH, Prestwich GD, Pereira HA (2016) The Role of Neutrophil Proteins on the Amyloid Beta-RAGE Axis. *PLoS ONE* 11(9):e0163330. doi:10.1371/journal.pone.0163330
222. Bhansali S, Bhansali A, Walia R, Saikia UN, Dhawan V (2017) Alterations in Mitochondrial Oxidative Stress and Mitophagy in Subjects with Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:347. doi:10.3389/fendo.2017.00347
223. Zhu W, Yuan Y, Liao G, Li L, Liu J, Chen Y, Zhang J, Cheng J, Lu Y (2018) Mesenchymal stem cells ameliorate hyperglycemia-induced endothelial injury through modulation of mitophagy. *Cell Death Dis* 9(8):837. doi:10.1038/s41419-018-0861-x
224. Wang W, Wang Y, Long J, Wang J, Haudek SB, Overbeek P, Chang BHJ, Schumacker PT, Danesh FR (2012) Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells. *Cell Metab* 15(2):186–200. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.009
225. Kobayashi S, Liang Q (2015) Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 1852(2):252–261. doi:10.1016/j.bbadis.2014.05.020
226. Tang C, He L, Liu J, Dong Z (2015) Mitophagy: Basic Mechanism and Potential Role in Kidney Diseases. *Kidney Dis (Basel)* 1(1):71–79. doi:10.1159/000381510
227. Xiao L, Xu X, Zhang F, Wang M, Xu Y, Tang D, Wang J, Qin Y, Liu Y, Tang C, He L, Greka A, Zhou Z, Liu F, Dong Z, Sun L (2017) The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorated tubular injury mediated by mitophagy in diabetic kidney disease via Nrf2/PINK1. *Redox Biol* 11:297–311. doi:10.1016/j.redox.2016.12.022
228. Petersen B, Egert S, Bosy-Westphal A, Müller MJ, Wolfram S, Hubbermann EM, Rimbach G, Schwarz K (2016) Bioavailability of quercetin in humans and the influence of food matrix comparing quercetin capsules and different apple sources. *Food Res Int* 88(Pt A):159–165. doi:10.1016/j.foodres.2016.02.013
229. Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT (2000) Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 130(11):2765–2771

230. Padma VV, Lalitha G, Shirony NP, Baskaran R (2012) Effect of quercetin against lindane induced alterations in the serum and hepatic tissue lipids in wistar rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(11):910–915. doi:10.1016/S2221-1691(12)60252-4
231. Yang L-L, Xiao N, Li X-W, Fan Y, Alolga RN, Sun X-Y, Wang S-L, Li P, Qi L-W (2016) Pharmacokinetic comparison between quercetin and quercetin 3-O- β -glucuronide in rats by UHPLC-MS/MS. *Sci Rep* 6:35460. doi:10.1038/srep35460
232. Erlund I, Silaste ML, Alfthan G, Rantala M, Kesäniemi YA, Aro A (2002) Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *Eur J Clin Nutr* 56(9):891–898. doi:10.1038/sj.ejcn.1601409
233. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB (1992) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* 40(12):2379–2383. doi:10.1021/jf00024a011
234. Egert S, Wolfram S, Bosy-Westphal A, Boesch-Saadatmandi C, Wagner AE, Frank J, Rimbach G, Mueller MJ (2008) Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *J Nutr* 138(9):1615–1621
235. Anand David AV, Arulmoli R, Parasuraman S (2016) Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacogn Rev* 10(20):84–89. doi:10.4103/0973-7847.194044
236. Russo N, Toscano M, Uccella N (2000) Semiempirical Molecular Modeling into Quercetin Reactive Site. Structural, Conformational, and Electronic Features. *J. Agric. Food Chem.* 48(8):3232–3237. doi:10.1021/jf990469h
237. Moalin M, van Strijdonck GPF, Beckers M, Hagemen G, Borm P, Bast A, Haenen GRMM (2011) A planar conformation and the hydroxyl groups in the B and C rings play a pivotal role in the antioxidant capacity of quercetin and quercetin derivatives. *Molecules* 16(11):9636–9650. doi:10.3390/molecules16119636
238. Seiva FRF, Chuffa LGA, Braga CP, Amorim JPA, Fernandes AAH (2012) Quercetin ameliorates glucose and lipid metabolism and improves antioxidant status in postnatally monosodium glutamate-induced metabolic alterations. *Food Chem Toxicol* 50(10):3556–3561. doi:10.1016/j.fct.2012.07.009
239. Kampkötter A, Timpel C, Zurawski RF, Ruhl S, Chovolou Y, Proksch P, Wätjen W (2008) Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by

- quercetin. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol* 149(2):314–323.
doi:10.1016/j.cbpb.2007.10.004
240. Link P, Roth K, Sporer F, Wink M (2016) *Carlina acaulis* Exhibits Antioxidant Activity and Counteracts A β Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules* 21(7).
doi:10.3390/molecules21070871
241. Youl E, Bardy G, Magous R, Cros G, Sejalon F, Virsolvy A, Richard S, Quignard JF, Gross R, Petit P, Bataille D, Oiry C (2010) Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic β -cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *Br J Pharmacol* 161(4):799–814. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00910.x
242. Pietsch K, Saul N, Menzel R, Stürzenbaum SR, Steinberg CEW (2009) Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology* 10(5):565–578. doi:10.1007/s10522-008-9199-6
243. Shi Y, Williamson G (2015) Comparison of the urinary excretion of quercetin glycosides from red onion and aglycone from dietary supplements in healthy subjects: a randomized, single-blinded, cross-over study. *Food Funct* 6(5):1443–1448.
doi:10.1039/c5fo00155b
244. Jeong J-H, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ (2009) Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J Cell Biochem* 106(1):73–82.
doi:10.1002/jcb.21977
245. Vidya Priyadarsini R, Senthil Murugan R, Maitreyi S, Ramalingam K, Karunagaran D, Nagini S (2010) The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- κ B inhibition. *European Journal of Pharmacology* 649(1-3):84–91.
doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.020
246. Tanigawa S, Fujii M, Hou D-X (2008) Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 72(3):797–804. doi:10.1271/bbb.70680
247. Kleemann R, Verschuren L, Morrison M, Zadelaar S, van Erk MJ, Wielinga PY, Kooistra T (2011) Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. *Atherosclerosis* 218(1):44–52.
doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.023
248. Ganesan S, Faris AN, Comstock AT, Chattoraj SS, Chattoraj A, Burgess JR, Curtis JL, Martinez FJ, Zick S, Hershenson MB, Sajjan US (2010) Quercetin prevents

- progression of disease in elastase/LPS-exposed mice by negatively regulating MMP expression. *Respir Res* 11:131. doi:10.1186/1465-9921-11-131
249. Brüll V, Burak C, Stoffel-Wagner B, Wolfram S, Nickenig G, Müller C, Langguth P, Alteheld B, Fimmers R, Naaf S, Zimmermann BF, Stehle P, Egert S (2015) Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-)hypertension: a randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. *Br J Nutr* 114(8):1263–1277. doi:10.1017/S0007114515002950
250. Romero M, Jiménez R, Sánchez M, López-Sepúlveda R, Zarzuelo MJ, O'Valle F, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J (2009) Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis* 202(1):58–67. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.03.007
251. Cervantes-Laurean D, Schramm DD, Jacobson EL, Halaweish I, Bruckner GG, Boissonneault GA (2006) Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. *J Nutr Biochem* 17(8):531–540. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.10.002
252. Kim J-H, Kang M-J, Choi H-N, Jeong S-M, Lee Y-M, Kim J-I (2011) Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. *Nutr Res Pract* 5(2):107–111. doi:10.4162/nrp.2011.5.2.107
253. Schulze C, Bangert A, Kottra G, Geillinger KE, Schwanck B, Vollert H, Blaschek W, Daniel H (2014) Inhibition of the intestinal sodium-coupled glucose transporter 1 (SGLT1) by extracts and polyphenols from apple reduces postprandial blood glucose levels in mice and humans. *Mol Nutr Food Res* 58(9):1795–1808. doi:10.1002/mnfr.201400016
254. Eid HM, Nachar A, Thong F, Sweeney G, Haddad PS (2015) The molecular basis of the antidiabetic action of quercetin in cultured skeletal muscle cells and hepatocytes. *Pharmacogn Mag* 11(41):74–81. doi:10.4103/0973-1296.149708
255. Xu M, Hu J, Zhao W, Gao X, Jiang C, Liu K, Liu B, Huang F (2014) Quercetin differently regulates insulin-mediated glucose transporter 4 translocation under basal and inflammatory conditions in adipocytes. *Mol Nutr Food Res* 58(5):931–941. doi:10.1002/mnfr.201300510
256. Fitzenberger E, Deusing DJ, Marx C, Boll M, Lüersen K, Wenzel U (2014) The polyphenol quercetin protects the mev-1 mutant of *Caenorhabditis elegans* from glucose-induced reduction of survival under heat-stress depending on SIR-2.1, DAF-12, and proteasomal activity. *Mol Nutr Food Res* 58(5):984–994. doi:10.1002/mnfr.201300718

257. Caccia S (2006) Main Active Components of St. Johns Wort (*Hypericum Perforatum*) Extracts. *Current Analytical Procedures for Pharmacokinetics and Concentration-Response Studies*. CPA 2(1):59–68. doi:10.2174/157341206775474052
258. Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling A-K, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H, Veit M (2001) Pharmacokinetics and Bioavailability of Quercetin Glycosides in Humans. *The Journal of Clinical Pharmacology* 41(5):492–499. doi:10.1177/00912700122010366
259. Lesser S, Cermak R, Wolfram S (2004) Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *J Nutr* 134(6):1508–1511
260. Wolfram S, Blöck M, Ader P (2002) Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *J Nutr* 132(4):630–635. doi:10.1093/jn/132.4.630
261. Walgren RA, Lin JT, Kinne RK, Walle T (2000) Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J Pharmacol Exp Ther* 294(3):837–843
262. Sesink ALA, Arts ICW, Faassen-Peters M, Hollman PCH (2003) Intestinal uptake of quercetin-3-glucoside in rats involves hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase. *J Nutr* 133(3):773–776
263. Kaşıkçı M, Bağdatlıoğlu N (2016) Bioavailability of Quercetin. *Curr Res Nutr Food Sci* 4(Special-Issue-October):146–151. doi:10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue-October.20
264. Murota K, Terao J (2003) Antioxidative flavonoid quercetin. Implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys* 417(1):12–17. doi:10.1016/S0003-9861(03)00284-4
265. Herranz-López M, Borrás-Linares I, Olivares-Vicente M, Gálvez J, Segura-Carretero A, Micol V (2017) Correlation between the cellular metabolism of quercetin and its glucuronide metabolite and oxidative stress in hypertrophied 3T3-L1 adipocytes. *Phytomedicine* 25:25–28. doi:10.1016/j.phymed.2016.12.008
266. Wong CC, Akiyama Y, Abe T, Lippiat JD, Orfila C, Williamson G (2012) Carrier-mediated transport of quercetin conjugates: involvement of organic anion transporters and organic anion transporting polypeptides. *Biochem Pharmacol* 84(4):564–570. doi:10.1016/j.bcp.2012.05.011

267. Jan AT, Kamli MR, Murtaza I, Singh JB, Ali A, Haq QMR (2010) Dietary Flavonoid Quercetin and Associated Health Benefits—An Overview. *Food Reviews International* 26(3):302–317. doi:10.1080/87559129.2010.484285
268. Boer VCJ de, Dihal AA, van der Woude H, Arts ICW, Wolffram S, Alink GM, Rietjens IMCM, Keijer J, Hollman PCH (2005) Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr* 135(7):1718–1725
269. Li N, Sun C, Zhou B, Xing H, Ma D, Chen G, Weng D (2014) Low concentration of quercetin antagonizes the cytotoxic effects of anti-neoplastic drugs in ovarian cancer. *PLoS ONE* 9(7):e100314. doi:10.1371/journal.pone.0100314
270. Hollman PCH (2009) Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology* 42(sup1):74–83. doi:10.3109/13880200490893492
271. Guo Y, Bruno RS (2015) Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. *J Nutr Biochem* 26(3):201–210. doi:10.1016/j.jnutbio.2014.10.008
272. Bolling BW, Court MH, Blumberg JB, Chen C-YO (2010) The kinetic basis for age-associated changes in quercetin and genistein glucuronidation by rat liver microsomes. *J Nutr Biochem* 21(6):498–503. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.02.006
273. Caswell-Chen EP, Chen J, Lewis EE, Douhan GW, Nadler SA, Carey JR (2005) Revising the standard wisdom of *C. elegans* natural history. *Ecology of longevity. Sci Aging Knowledge Environ* 2005(40):pe30. doi:10.1126/sageke.2005.40.pe30
274. Esnard J (2001) Implications of sequencing the nematode *Caenorhabditis elegans* genome for plant methodology. *PHI*. doi:10.1094/PHI-I-2001-0328-01
275. Huang R-E, Ren X, Qiu Y, Zhao Z (2014) Description of *Caenorhabditis sinica* sp. n. (Nematoda, Rhabditidae), a nematode species used in comparative biology for *C. elegans*. *PLoS ONE* 9(11):e110957. doi:10.1371/journal.pone.0110957
276. Diogo J, Bratanich A (2014) The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model to study viruses. *Arch Virol* 159(11):2843–2851. doi:10.1007/s00705-014-2168-2
277. Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1):71–94
278. Corsi AK (2006) A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*. *Anal Biochem* 359(1):1–17. doi:10.1016/j.ab.2006.07.033
279. Leung MCK, Williams PL, Benedetto A, Au C, Helmcke KJ, Aschner M, Meyer JN (2008) *Caenorhabditis elegans*. An emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol Sci* 106(1):5–28. doi:10.1093/toxsci/kfn121

280. Zheng J, Greenway FL (2012) *Caenorhabditis elegans* as a model for obesity research. *Int J Obes (Lond)* 36(2):186–194. doi:10.1038/ijo.2011.93
281. Kaletta T, Hengartner MO (2006) Finding function in novel targets. *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov* 5(5):387–398. doi:10.1038/nrd2031
282. Park H-EH, Jung Y, Lee S-JV (2017) Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells* 40(2):90–99. doi:10.14348/molcells.2017.0017
283. Maher KN, Catanese M, Chase DL (2013) Large-scale gene knockdown in *C. elegans* using dsRNA feeding libraries to generate robust loss-of-function phenotypes. *J Vis Exp* (79):e50693. doi:10.3791/50693
284. Baird SE, Fitch DH, Kassem IA, Emmons SW (1991) Pattern formation in the nematode epidermis. Determination of the arrangement of peripheral sense organs in the *C. elegans* male tail. *Development* 113(2):515–526
285. Altun, Z.F. and Hall, D.H. (2009) Introduction in *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.1
286. Park S-J, Goodman MB, Pruitt BL (2007) Analysis of nematode mechanics by piezoresistive displacement clamp. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(44):17376–17381. doi:10.1073/pnas.0702138104
287. Altun, Z.F. and Hall, D.H. (2009). Pericellular structures in *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.20
288. Burkewitz K, Choe KP, Lee EC-H, Deonaraine A, Strange K (2012) Characterization of the proteostasis roles of glycerol accumulation, protein degradation and protein synthesis during osmotic stress in *C. elegans*. *PLoS ONE* 7(3):e34153. doi:10.1371/journal.pone.0034153
289. Johnstone IL (1994) The cuticle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. A complex collagen structure. *Bioessays* 16(3):171–178. doi:10.1002/bies.950160307
290. Page, A.P. and Johnstone, I.L. The cuticle (2007), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.138.1
291. Lints, R. and Hall, D.H. (2009). The cuticle in *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.12
292. Ibsen S, Tong A, Schutt C, Esener S, Chalasani SH (2015) Sonogenetics is a non-invasive approach to activating neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* 6:8264. doi:10.1038/ncomms9264

293. Altun, Z.F. and Hall, D.H. (2011) Nervous system, general description. In WormAtlas. doi:10.3908/wormatlas.1.18
294. Bargmann CI Chemosensation in *C. elegans* (2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.123.1
295. Avery, L. and You, Y.J. *C. elegans* feeding (2012), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.150.1
296. Song B-M, Avery L (2013) The pharynx of the nematode *C. elegans*. A model system for the study of motor control. *Worm* 2(1):e21833. doi:10.4161/worm.21833
297. Altun, Z.F. and Hall, D.H. (2009) Alimentary System, Pharynx. In WormAtlas. doi:10.3908/wormatlas.1.3
298. McGhee JD The *C. elegans* intestine (2007), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.133.1
299. Gusarov I, Pani B, Gautier L, Smolentseva O, Eremina S, Shamovsky I, Katkova-Zhukotskaya O, Mironov A, Nudler E (2017) Glycogen controls *Caenorhabditis elegans* lifespan and resistance to oxidative stress. *Nat Commun* 8:15868. doi:10.1038/ncomms15868
300. Srinivasan S (2015) Regulation of body fat in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Physiol* 77:161–178. doi:10.1146/annurev-physiol-021014-071704
301. Estes KA, Szumowski SC, Troemel ER (2011) Non-lytic, actin-based exit of intracellular parasites from *C. elegans* intestinal cells. *PLoS Pathog* 7(9):e1002227. doi:10.1371/journal.ppat.1002227
302. Pukkila-Worley R, Ausubel FM (2012) Immune defense mechanisms in the *Caenorhabditis elegans* intestinal epithelium. *Curr Opin Immunol* 24(1):3–9. doi:10.1016/j.coi.2011.10.004
303. Battisti JM, Watson LA, Naung MT, Drobish AM, Voronina E, Minnick MF (2017) Analysis of the *Caenorhabditis elegans* innate immune response to *Coxiella burnetii*. *Innate Immun* 23(2):111–127. doi:10.1177/1753425916679255
304. Lints, R. and Hall, D.H. (2009) Reproductive system, overview. In WormAtlas. doi:10.3908/wormatlas.1.21
305. Lints, R. and Hall, D.H. (2009) Male introduction. In WormAtlas. doi:10.3908/wormatlas.2.1

306. Maduro MF (2010) Cell fate specification in the *C. elegans* embryo. *Dev Dyn* 239(5):1315–1329. doi:10.1002/dvdy.22233
307. Nance J, Lee J-Y, Goldstein B (2005) Gastrulation in *C. elegans*. *WormBook*:1–13. doi:10.1895/wormbook.1.23.1
308. Nelson CM (2009) Geometric control of tissue morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1793(5):903–910. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.12.014
309. Hu PJ (2007) Dauer. *WormBook*:1–19. doi:10.1895/wormbook.1.144.1
310. Schlotterer A, Kukudov G, Bozorgmehr F, Hutter H, Du X, Oikonomou D, Ibrahim Y, Pfisterer F, Rabbani N, Thornalley P, Sayed A, Fleming T, Humpert P, Schwenger V, Zeier M, Hamann A, Stern D, Brownlee M, Bierhaus A, Nawroth P, Morcos M (2009) *C. elegans* as Model for the Study of High Glucose- Mediated Life Span Reduction. *Diabetes* 58(11):2450–2456. doi:10.2337/db09-0567
311. Liggett MR, Hoy MJ, Mastroianni M, Mondoux MA (2015) High-glucose diets have sex-specific effects on aging in *C. elegans*: toxic to hermaphrodites but beneficial to males. *Aging (Albany NY)* 7(6):383–388. doi:10.18632/aging.100759
312. Alcántar-Fernández J, Navarro RE, Salazar-Martínez AM, Pérez-Andrade ME, Miranda-Ríos J (2018) *Caenorhabditis elegans* respond to high-glucose diets through a network of stress-responsive transcription factors. *PLoS ONE* 13(7):e0199888. doi:10.1371/journal.pone.0199888
313. Lee S-J, Murphy CT, Kenyon C (2009) Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell Metab* 10(5):379–391. doi:10.1016/j.cmet.2009.10.003
314. Fitzenberger E, Boll M, Wenzel U (2013) Impairment of the proteasome is crucial for glucose-induced lifespan reduction in the *mev-1* mutant of *Caenorhabditis elegans*. *Biochim Biophys Acta* 1832(4):565–573. doi:10.1016/j.bbadis.2013.01.012
315. Ishii T, Miyazawa M, Hartman PS, Ishii N (2011) Mitochondrial superoxide anion (O₂⁽⁻⁾) inducible "mev-1" animal models for aging research. *BMB Rep* 44(5):298–305. doi:10.5483/BMBRep.2011.44.5.298
316. Fiorentino T, Prioleta A, Zuo P, Folli F (2013) Hyperglycemia-induced Oxidative Stress and its Role in Diabetes Mellitus Related Cardiovascular Diseases. *CPD* 19(32):5695–5703. doi:10.2174/1381612811319320005

317. Li W, Wang D, Wang D (2018) Regulation of the Response of *Caenorhabditis elegans* to Simulated Microgravity by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Sci Rep* 8(1):857. doi:10.1038/s41598-018-19377-z
318. Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ayusawa D, Suzuki K (1998) A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* 394(6694):694–697. doi:10.1038/29331
319. Ishii N, Goto S, Hartman PS (2002) Protein oxidation during aging of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine* 33(8):1021–1025. doi:10.1016/S0891-5849(02)00857-2
320. Senoo-Matsuda N, Yasuda K, Tsuda M, Ohkubo T, Yoshimura S, Nakazawa H, Hartman PS, Ishii N (2001) A defect in the cytochrome b large subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 276(45):41553–41558. doi:10.1074/jbc.M104718200
321. Zhou KI, Pincus Z, Slack FJ (2011) Longevity and stress in *Caenorhabditis elegans*. *Aging (Albany NY)* 3(8):733–753. doi:10.18632/aging.100367
322. Ishii N, Takahashi K, Tomita S, Keino T, Honda S, Yoshino K, Suzuki K (1990) A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mutat Res* 237(3-4):165–171
323. Zamberlan DC, Amaral GP, Arantes LP, Machado ML, Mizdal CR, Campos MMA, Soares FAA (2016) *Rosmarinus officinalis* L. increases *Caenorhabditis elegans* stress resistance and longevity in a DAF-16, HSF-1 and SKN-1-dependent manner. *Braz J Med Biol Res* 49(9):e5235. doi:10.1590/1414-431X20165235
324. Fujii M, Yasuda K, Hartman PS, Ayusawa D, Ishii N (2011) A mutation in a mitochondrial dehydrogenase/reductase gene causes an increased sensitivity to oxidative stress and mitochondrial defects in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells* 16(10):1022–1034. doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01547.x
325. Liochev SI (2013) Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med* 60:1–4. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011
326. Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka T-a (2010) Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2010:453892. doi:10.1155/2010/453892

327. Della David C, Ollikainen N, Trinidad JC, Cary MP, Burlingame AL, Kenyon C (2010) Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*. *PLoS Biol* 8(8):e1000450. doi:10.1371/journal.pbio.1000450
328. Walther DM, Kasturi P, Zheng M, Pinkert S, Vecchi G, Ciryam P, Morimoto RI, Dobson CM, Vendruscolo M, Mann M, Hartl FU (2015) Widespread Proteome Remodeling and Aggregation in Aging *C. elegans*. *Cell* 161(4):919–932. doi:10.1016/j.cell.2015.03.032
329. Ben-Zvi A, Miller EA, Morimoto RI (2009) Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(35):14914–14919. doi:10.1073/pnas.0902882106
330. Shpilka T, Haynes CM (2018) The mitochondrial UPR. Mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(2):109–120. doi:10.1038/nrm.2017.110
331. Bennett CF, Vander Wende H, Simko M, Klum S, Barfield S, Choi H, Pineda VV, Kaeberlein M (2014) Activation of the mitochondrial unfolded protein response does not predict longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* 5:3483. doi:10.1038/ncomms4483
332. Qureshi MA, Haynes CM, Pellegrino MW (2017) The mitochondrial unfolded protein response. Signaling from the powerhouse. *J Biol Chem* 292(33):13500–13506. doi:10.1074/jbc.R117.791061
333. Kapulkin WJ, Kapulkin V, Hiester BG, Link CD (2005) Compensatory regulation among ER chaperones in *C. elegans*. *FEBS Letters* 579(14):3063–3068. doi:10.1016/j.febslet.2005.04.062
334. Pyrko P, Schönthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS (2007) The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res* 67(20):9809–9816. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0625
335. Henis-Korenblit S, Zhang P, Hansen M, McCormick M, Lee S-J, Cary M, Kenyon C (2010) Insulin/IGF-1 signaling mutants reprogram ER stress response regulators to promote longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(21):9730–9735. doi:10.1073/pnas.1002575107
336. Richardson CE, Kinkel S, Kim DH (2011) Physiological IRE-1-XBP-1 and PEK-1 signaling in *Caenorhabditis elegans* larval development and immunity. *PLoS Genet* 7(11):e1002391. doi:10.1371/journal.pgen.1002391

337. Glover-Cutter KM, Lin S, Blackwell TK (2013) Integration of the unfolded protein and oxidative stress responses through SKN-1/Nrf. *PLoS Genet* 9(9):e1003701. doi:10.1371/journal.pgen.1003701
338. Bertolotti A, Ron D (2001) Alterations in an IRE1-RNA complex in the mammalian unfolded protein response. *J Cell Sci* 114(Pt 17):3207–3212
339. Taylor RC, Dillin A (2013) XBP-1 is a cell-nonautonomous regulator of stress resistance and longevity. *Cell* 153(7):1435–1447. doi:10.1016/j.cell.2013.05.042
340. Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415(6867):92–96. doi:10.1038/415092a
341. Wei X, Howell AS, Dong X, Taylor CA, Cooper RC, Zhang J, Zou W, Sherwood DR, Shen K (2015) The unfolded protein response is required for dendrite morphogenesis. *Elife* 4:e06963. doi:10.7554/eLife.06963
342. Shen X, Ellis RE, Sakaki K, Kaufman RJ (2005) Genetic interactions due to constitutive and inducible gene regulation mediated by the unfolded protein response in *C. elegans*. *PLoS Genet* 1(3):e37. doi:10.1371/journal.pgen.0010037
343. Sood R, Porter AC, Ma K, Quilliam LA, Wek RC (2000) Pancreatic eukaryotic initiation factor-2 α kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem J* 346 Pt 2:281–293
344. Blackwell TK, Steinbaugh MJ, Hourihan JM, Ewald CY, Isik M (2015) SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 88(Pt B):290–301. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.008
345. Ferraz RC, Camara H, De-Souza EA, Pinto S, Pinca APF, Silva RC, Sato VN, Castilho BA, Mori MA (2016) IMPACT is a GCN2 inhibitor that limits lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Biol* 14(1):87. doi:10.1186/s12915-016-0301-2
346. Sakaki K, Yoshina S, Shen X, Han J, DeSantis MR, Xiong M, Mitani S, Kaufman RJ (2012) RNA surveillance is required for endoplasmic reticulum homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(21):8079–8084. doi:10.1073/pnas.1110589109
347. Liu W, Zhu X, Wang Q, Wang L (2013) Hyperglycemia induces endoplasmic reticulum stress-dependent CHOP expression in osteoblasts. *Exp Ther Med* 5(5):1289–1292. doi:10.3892/etm.2013.978

348. Back SH, Kaufman RJ (2012) Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem* 81:767–793. doi:10.1146/annurev-biochem-072909-095555
349. Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf DH (1997) The Active Sites of the Eukaryotic 20 S Proteasome and Their Involvement in Subunit Precursor Processing. *J. Biol. Chem.* 272(40):25200–25209. doi:10.1074/jbc.272.40.25200
350. Nayak S, Fiaschi M, King D, Tabakin ER, Wood L, Hunt DA (2014) Development of Small Molecular Proteasome Inhibitors Using a *Caenorhabditis elegans* Screen. *Int J Med Chem* 2014:237286. doi:10.1155/2014/237286
351. Papaevgeniou N, Chondrogianni N (2014) The ubiquitin proteasome system in *Caenorhabditis elegans* and its regulation. *Redox Biol* 2:333–347. doi:10.1016/j.redox.2014.01.007
352. Hamer G, Matilainen O, Holmberg CI (2010) A photoconvertible reporter of the ubiquitin-proteasome system in vivo. *Nat Methods* 7(6):473–478. doi:10.1038/nmeth.1460
353. Kipreos ET (2005) Ubiquitin-mediated pathways in *C. elegans*. *WormBook*:1–24. doi:10.1895/wormbook.1.36.1
354. Baptista MS, Duarte CB, Maciel P (2012) Role of the ubiquitin-proteasome system in nervous system function and disease. Using *C. elegans* as a dissecting tool. *Cell Mol Life Sci* 69(16):2691–2715. doi:10.1007/s00018-012-0946-0
355. Mikkonen E, Haglund C, Holmberg CI (2017) Immunohistochemical analysis reveals variations in proteasome tissue expression in *C. elegans*. *PLoS ONE* 12(8):e0183403. doi:10.1371/journal.pone.0183403
356. Zimmerman SM, Kim SK (2016) New insights into old worm proteomes. *Worm* 5(3):e1184391. doi:10.1080/21624054.2016.1184391
357. Kaniuk NA, Kiraly M, Bates H, Vranic M, Volchuk A, Brumell JH (2007) Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta-cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. *Diabetes* 56(4):930–939. doi:10.2337/db06-1160
358. Puri R, Jain N, Ganesh S (2011) Increased glucose concentration results in reduced proteasomal activity and the formation of glycogen positive aggresomal structures. *FEBS J* 278(19):3688–3698. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08287.x
359. Terasawa M, Toya M, Motegi F, Mana M, Nakamura K, Sugimoto A (2010) *Caenorhabditis elegans* ortholog of the p24/p22 subunit, DNC-3, is essential for the

- formation of the dynactin complex by bridging DNC-1/p150(Glued) and DNC-2/dynamitin. *Genes Cells* 15(11):1145–1157. doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01451.x
360. Hirayama S, Sugihara M, Morito D, Iemura S-i, Natsume T, Murata S, Nagata K (2018) Nuclear export of ubiquitinated proteins via the UBIN-POST system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(18):E4199-E4208. doi:10.1073/pnas.1711017115
361. Guo B, Huang X, Zhang P, Qi L, Liang Q, Zhang X, Huang J, Fang B, Hou W, Han J, Zhang H (2014) Genome-wide screen identifies signaling pathways that regulate autophagy during *Caenorhabditis elegans* development. *EMBO Rep* 15(6):705–713. doi:10.1002/embr.201338310
362. Meléndez A, Levine B (2009) Autophagy in *C. elegans*. *WormBook*:1–26. doi:10.1895/wormbook.1.147.1
363. Zhang H, Chang JT, Guo B, Hansen M, Jia K, Kovács AL, Kumsta C, Lapierre LR, Legouis R, Lin L, Lu Q, Meléndez A, O'Rourke EJ, Sato K, Sato M, Wang X, Wu F (2015) Guidelines for monitoring autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* 11(1):9–27. doi:10.1080/15548627.2014.1003478
364. Chen Y, Scarcelli V, Legouis R (2017) Approaches for Studying Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Cells* 6(3). doi:10.3390/cells6030027
365. WormBase website (2018) WormBase. (Version WS267). <https://www.wormbase.org/#012-34-5>. Zugegriffen: 16. Dezember 2018
366. Takacs-Vellai K, Vellai T, Puoti A, Passannante M, Wicky C, Streit A, Kovacs AL, Müller F (2005) Inactivation of the autophagy gene *bec-1* triggers apoptotic cell death in *C. elegans*. *Curr Biol* 15(16):1513–1517. doi:10.1016/j.cub.2005.07.035
367. Palmisano NJ, Meléndez A (2018) Autophagy in *C. elegans* development. *Dev Biol*. doi:10.1016/j.ydbio.2018.04.009
368. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N (2015) Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature* 521(7553):525–528. doi:10.1038/nature14300
369. Charmpilas N, Kounakis K, Tavernarakis N (2018) Monitoring Mitophagy During Aging in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Mol Biol* 1759:151–160. doi:10.1007/7651_2017_18
370. Schiavi A, Maglioni S, Palikaras K, Shaik A, Strappazzon F, Brinkmann V, Torgovnick A, Castelein N, Henau S de, Braeckman BP, Cecconi F, Tavernarakis N, Ventura N (2015) Iron-Starvation-Induced Mitophagy Mediates Lifespan Extension upon

- Mitochondrial Stress in *C. elegans*. *Curr Biol* 25(14):1810–1822.
doi:10.1016/j.cub.2015.05.059
371. Sämman J, Hegermann J, Gromoff E von, Eimer S, Baumeister R, Schmidt E (2009) *Caenorhabditis elegans* LRK-1 and PINK-1 act antagonistically in stress response and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 284(24):16482–16491. doi:10.1074/jbc.M808255200
372. Kim H, Perentis RJ, Caldwell GA, Caldwell KA (2018) Gene-by-environment interactions that disrupt mitochondrial homeostasis cause neurodegeneration in *C. elegans* Parkinson's models. *Cell Death Dis* 9(5):555. doi:10.1038/s41419-018-0619-5
373. Rolland SG, Conradt B (2010) New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 22(6):852–858.
doi:10.1016/j.ceb.2010.07.014
374. Megalou EV, Tavernarakis N (2009) Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Biochim Biophys Acta* 1793(9):1444–1451. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.12.010
375. Shen Q, Yamano K, Head BP, Kawajiri S, Cheung JTM, Wang C, Cho J-H, Hattori N, Youle RJ, van der Bliek AM (2014) Mutations in Fis1 disrupt orderly disposal of defective mitochondria. *Molecular Biology of the Cell* 25(1):145–159. doi:10.1091/mbc.E13-09-0525
376. Bess AS, Crocker TL, Ryde IT, Meyer JN (2012) Mitochondrial dynamics and autophagy aid in removal of persistent mitochondrial DNA damage in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res* 40(16):7916–7931. doi:10.1093/nar/gks532
377. Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*:1–11.
doi:10.1895/wormbook.1.101.1
378. Matyash V, Geier C, Henske A, Mukherjee S, Hirsh D, Thiele C, Grant B, Maxfield FR, Kurzchalia TV (2001) Distribution and transport of cholesterol in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell* 12(6):1725–1736. doi:10.1091/mbc.12.6.1725
379. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806–811. doi:10.1038/35888
380. Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahringer J (2001) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* 2(1):RESEARCH0002. doi:10.1186/gb-2000-2-1-research0002

381. Min K, Kang J, Lee J (2010) A modified feeding RNAi method for simultaneous knock-down of more than one gene in *Caenorhabditis elegans*. *BioTechniques* 48(3):229–232. doi:10.2144/000113365
382. Timmons L, Court DL, Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263(1-2):103–112
383. Timmons L, Tabara H, Mello CC, Fire AZ (2003) Inducible systemic RNA silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell* 14(7):2972–2983. doi:10.1091/mbc.e03-01-0858
384. Gavrillov K, Saltzman WM (2012) Therapeutic siRNA. Principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med* 85(2):187–200
385. ALDER MN (2003) Gene silencing in *Caenorhabditis elegans* by transitive RNA interference. *RNA* 9(1):25–32. doi:10.1261/rna.2650903
386. Lochmatter D, Mullis P-E (2011) RNA interference in mammalian cell systems. *Horm Res Paediatr* 75(1):63–69. doi:10.1159/000322817
387. Pare JM, Tahbaz N, Lopez-Orozco J, LaPointe P, Lasko P, Hobman TC (2009) Hsp90 Regulates the Function of Argonaute 2 and Its Recruitment to Stress Granules and P-Bodies. *Molecular Biology of the Cell* 20(14):3273–3284. doi:10.1091/mbc.E09-01-0082
388. Wang H-W, Noland C, Siridechadilok B, Taylor DW, Ma E, Felderer K, Doudna JA, Nogales E (2009) Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nat Struct Mol Biol* 16(11):1148–1153. doi:10.1038/nsmb.1673
389. Ambrus AM, Frolov MV (2009) The diverse roles of RNA helicases in RNAi. *Cell Cycle* 8(21):3500–3505. doi:10.4161/cc.8.21.9887
390. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* 115(2):209–216. doi:10.1016/S0092-8674(03)00801-8
391. Li Z, Rana TM (2012) Molecular mechanisms of RNA-triggered gene silencing machineries. *Acc Chem Res* 45(7):1122–1131. doi:10.1021/ar200253u
392. Kim K, Lee YS, Carthew RW (2007) Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. *RNA* 13(1):22–29. doi:10.1261/rna.283207

393. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song J-J, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305(5689):1437–1441. doi:10.1126/science.1102513
394. Leuschner PJF, Ameres SL, Kueng S, Martinez J (2006) Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* 7(3):314–320. doi:10.1038/sj.embor.7400637
395. MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA (2008) In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(2):512–517. doi:10.1073/pnas.0710869105
396. Takahashi T, Zenno S, Ishibashi O, Takizawa T, Saigo K, Ui-Tei K (2014) Interactions between the non-seed region of siRNA and RNA-binding RLC/RISC proteins, Ago and TRBP, in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 42(8):5256–5269. doi:10.1093/nar/gku153
397. Deerberg A, Willkomm S, Restle T (2013) Minimal mechanistic model of siRNA-dependent target RNA slicing by recombinant human Argonaute 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(44):17850–17855. doi:10.1073/pnas.1217838110
398. Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS (2015) siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids* 4:e252. doi:10.1038/mtna.2015.23
399. Gill MS, Olsen A, Sampayo JN, Lithgow GJ (2003) An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine* 35(6):558–565. doi:10.1016/S0891-5849(03)00328-9
400. Lebaron P, Catala P, Parthuisot N (1998) Effectiveness of SYTOX Green Stain for Bacterial Viability Assessment. *Appl Environ Microbiol* 64(7):2697–2700
401. Singh J, Aballay A (2017) Endoplasmic Reticulum Stress Caused by Lipoprotein Accumulation Suppresses Immunity against Bacterial Pathogens and Contributes to Immunosenescence. *MBio* 8(3). doi:10.1128/mBio.00778-17
402. Shen X, Ellis RE, Lee K, Liu C-Y, Yang K, Solomon A, Yoshida H, Morimoto R, Kurnit DM, Mori K, Kaufman RJ (2001) Complementary Signaling Pathways Regulate the Unfolded Protein Response and Are Required for *C. elegans* Development. *Cell* 107(7):893–903. doi:10.1016/S0092-8674(01)00612-2
403. Ient B, Edwards R, Mould R, Hannah M, Holden-Dye L, O'Connor V (2012) HSP-4 endoplasmic reticulum (ER) stress pathway is not activated in a *C. elegans* model of

- ethanol intoxication and withdrawal. *Invert Neurosci* 12(2):93–102. doi:10.1007/s10158-012-0136-7
404. Eisermann DJ, Wenzel U, Fitzenberger E (2016) PEK-1 is crucial for hormesis induced by inhibition of the IRE-1/XBP-1 pathway in the *Caenorhabditis elegans* mev-1 mutant. *Biochem Biophys Res Commun* 473(4):1052–1057. doi:10.1016/j.bbrc.2016.04.014
405. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59(3):223–239. doi:10.1002/jcp.1030590302
406. Chalfie M (1995) GREEN FLUORESCENT PROTEIN. *Photochem Photobiol* 62(4):651–656. doi:10.1111/j.1751-1097.1995.tb08712.x
407. Yoshii SR, Mizushima N (2017) Monitoring and Measuring Autophagy. *Int J Mol Sci* 18(9). doi:10.3390/ijms18091865
408. Wei S, Chen W, Qin J, Huangli Y, Wang L, Shen Y, Tang H (2016) Multitarget-directed oxoisoaporphine derivatives. Anti-acetylcholinesterase, anti- β -amyloid aggregation and enhanced autophagy activity against Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem* 24(22):6031–6039. doi:10.1016/j.bmc.2016.09.061
409. Yang Z-Z, Yu Y-T, Lin H-R, Liao D-C, Cui X-H, Wang H-B (2018) *Lonicera japonica* extends lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 129:310–322. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.035
410. Zhitomirsky B, Farber H, Assaraf YG (2018) LysoTracker and MitoTracker Red are transport substrates of P-glycoprotein: implications for anticancer drug design evading multidrug resistance. *J Cell Mol Med* 22(4):2131–2141. doi:10.1111/jcmm.13485
411. Clausen A, McClanahan T, Ji SG, Weiss JH (2013) Mechanisms of rapid reactive oxygen species generation in response to cytosolic Ca²⁺ or Zn²⁺ loads in cortical neurons. *PLoS ONE* 8(12):e83347. doi:10.1371/journal.pone.0083347
412. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
413. Compton SJ, Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151(2):369–374
414. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685

415. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76(9):4350–4354
416. Chen H, Hopper SL, Cerniglia CE (2005) Biochemical and molecular characterization of an azoreductase from *Staphylococcus aureus*, a tetrameric NADPH-dependent flavoprotein. *Microbiology* 151(Pt 5):1433–1441. doi:10.1099/mic.0.27805-0
417. Dráb T, Kračmerová J, Tichá I, Hanzlíková E, Tichá M, Liberda J (2011) Native polyacrylamide electrophoresis in the presence of Ponceau Red to study oligomeric states of protein complexes. *J Sep Sci* 34(14):1692–1695. doi:10.1002/jssc.201000869
418. Thorpe GH, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP (1985) Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction. Application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem* 31(8):1335–1341
419. Cercek B, Roby K, Cercek L (1994) Effect of oxygen abstraction on the peroxidase-luminol-perborate system. Relevance to the HRP enhanced chemiluminescence mechanism. *J Biolumin Chemilumin* 9(4):273–277. doi:10.1002/bio.1170090405
420. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78(5):761–771
421. Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Le Bot N, Moreno S, Sohrmann M, Welchman DP, Zipperlen P, Ahringer J (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421(6920):231–237. doi:10.1038/nature01278
422. Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp* (62). doi:10.3791/3923
423. Chan MK, Fadzil NA, Chew AL, Khoo BY (2013) New molecular biologist perspective and insight: DNA topoisomerases production by recombinant DNA technology for medical laboratory application and pharmaceutical industry. *Electron. J. Biotechnol.* 16(6). doi:10.2225/vol16-issue6-fulltext-6
424. Langley KE, Villarejo MR, Fowler AV, Zamenhof PJ, Zabin I (1975) Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72(4):1254–1257

425. Haase S, McCarthy CB, Ferrelli ML, Pidre ML, Sciocco-Cap A, Romanowski V (2015) Development of a recombination system for the generation of occlusion positive genetically modified *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Viruses* 7(4):1599–1612. doi:10.3390/v7041599
426. Cherepanov AV, Vries S de (2003) Kinetics and thermodynamics of nick sealing by T4 DNA ligase. *Eur J Biochem* 270(21):4315–4325
427. Fischer M (2011) Die Bedeutung Östrogen-responsiver Vitellogenine für die angeborene Immunität des Nematoden *Caenorhabditis elegans* und ihre Beeinflussung durch Phytoöstrogene. Diss. JLU Gießen. urn:nbn:de:hebis:26-opus-84616. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2011/8461/>(Stand: 16. Dezember 2018)
428. Hajieva P (2017) The Effect of Polyphenols on Protein Degradation Pathways: Implications for Neuroprotection. *Molecules* 22(1). doi:10.3390/molecules22010159
429. Ikenaka K, Kawai K, Katsuno M, Huang Z, Jiang Y-M, Iguchi Y, Kobayashi K, Kimata T, Waza M, Tanaka F, Mori I, Sobue G (2013) *dnc-1*/dynactin 1 knockdown disrupts transport of autophagosomes and induces motor neuron degeneration. *PLoS ONE* 8(2):e54511. doi:10.1371/journal.pone.0054511
430. Eisermann DJ (2016) Aktivierung der Proteostase durch Quercetin als molekularer Mechanismus der Prävention Glukoseinduzierter Schädigungen - Untersuchungen an der *mev-1* Mutante des Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Diss. JLU Gießen. urn:nbn:de:hebis:26-opus-120816. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2016/12081/> (Zugegriffen: 16. Dezember 2018)
431. Rao RV, Bredesen DE (2004) Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr Opin Cell Biol* 16(6):653–662. doi:10.1016/j.ceb.2004.09.012
432. Prischi F, Nowak PR, Carrara M, Ali MMU (2014) Phosphoregulation of Ire1 RNase splicing activity. *Nat Commun* 5:3554. doi:10.1038/ncomms4554
433. Lee S-H, Wong R-R, Chin C-Y, Lim T-Y, Eng S-A, Kong C, Ijap NA, Lau M-S, Lim M-P, Gan Y-H, He F-L, Tan M-W, Nathan S (2013) *Burkholderia pseudomallei* suppresses *Caenorhabditis elegans* immunity by specific degradation of a GATA transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(37):15067–15072. doi:10.1073/pnas.1311725110
434. Liu H, Dai C, Fan Y, Guo B, Ren K, Sun T, Wang W (2017) From autophagy to mitophagy. The roles of P62 in neurodegenerative diseases. *J Bioenerg Biomembr* 49(5):413–422. doi:10.1007/s10863-017-9727-7

435. Hyttinen JMT, Amadio M, Viiri J, Pascale A, Salminen A, Kaarniranta K (2014) Clearance of misfolded and aggregated proteins by aggrephagy and implications for aggregation diseases. *Ageing Res Rev* 18:16–28. doi:10.1016/j.arr.2014.07.002
436. Lee J-Y, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL, Yao T-P (2010) Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol* 189(4):671–679. doi:10.1083/jcb.201001039
437. Gomes LC, Scorrano L (2013) Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy. *Biochim Biophys Acta* 1833(1):205–212. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.02.012
438. Chen H, Chan DC (2009) Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18(R2):R169-76. doi:10.1093/hmg/ddp326
439. Frank M, Duvezin-Caubet S, Koob S, Occhipinti A, Jagasia R, Petcherski A, Ruonala MO, Priault M, Salin B, Reichert AS (2012) Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochim Biophys Acta* 1823(12):2297–2310. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.08.007
440. Yang S, Xia C, Li S, Du L, Zhang L, Zhou R (2014) Defective mitophagy driven by dysregulation of rheb and KIF5B contributes to mitochondrial reactive oxygen species (ROS)-induced nod-like receptor 3 (NLRP3) dependent proinflammatory response and aggravates lipotoxicity. *Redox Biol* 3:63–71. doi:10.1016/j.redox.2014.04.001
441. Reddy PH (2009) Role of mitochondria in neurodegenerative diseases. Mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *CNS Spectr* 14(8 Suppl 7):8-13; discussion 16-8
442. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, Cavan D, Shaw JE, Makaroff LE (2017) IDF Diabetes Atlas. Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract* 128:40–50. doi:10.1016/j.diabres.2017.03.024
443. Chaudhury A, Duvoor C, Reddy Dendi VS, Kraleti S, Chada A, Ravilla R, Marco A, Shekhawat NS, Montales MT, Kuriakose K, Sasapu A, Beebe A, Patil N, Musham CK, Lohani GP, Mirza W (2017) Clinical Review of Antidiabetic Drugs. Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:6. doi:10.3389/fendo.2017.00006

444. García-Pérez L-E, Alvarez M, Dilla T, Gil-Guillén V, Orozco-Beltrán D (2013) Adherence to therapies in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Ther* 4(2):175–194. doi:10.1007/s13300-013-0034-y
445. Birdee GS, Yeh G (2010) Complementary and Alternative Medicine Therapies for Diabetes. A Clinical Review. *Clinical Diabetes* 28(4):147–155. doi:10.2337/diaclin.28.4.147
446. Kikis EA, Gidalevitz T, Morimoto RI (2010) Protein homeostasis in models of aging and age-related conformational disease. *Adv Exp Med Biol* 694:138–159
447. Gregersen N, Bross P, Vang S, Christensen JH (2006) Protein misfolding and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7:103–124. doi:10.1146/annurev.genom.7.080505.115737
448. Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol. From nascent chain to folded protein. *Science* 295(5561):1852–1858. doi:10.1126/science.1068408
449. Niforou K, Cheimonidou C, Trougakos IP (2014) Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biol* 2:323–332. doi:10.1016/j.redox.2014.01.017
450. Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C (2003) Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 304(3):505–512. doi:10.1016/S0006-291X(03)00623-5
451. Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC (2010) Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Letters* 584(7):1393–1398. doi:10.1016/j.febslet.2009.12.047
452. Wei H, Liu L, Chen Q (2015) Selective removal of mitochondria via mitophagy. Distinct pathways for different mitochondrial stresses. *Biochim Biophys Acta* 1853(10 Pt B):2784–2790. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.03.013
453. Stefanatos R, Sanz A (2018) The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS Letters* 592(5):743–758. doi:10.1002/1873-3468.12902
454. Sanz A, Caro P, Gómez J, Barja G (2006) Testing the vicious cycle theory of mitochondrial ROS production. Effects of H₂O₂ and cumene hydroperoxide treatment on heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 38(2):121–127. doi:10.1007/s10863-006-9011-8

455. Grey ADNJ de (2005) Reactive oxygen species production in the mitochondrial matrix. Implications for the mechanism of mitochondrial mutation accumulation. *Rejuvenation Res* 8(1):13–17. doi:10.1089/rej.2005.8.13
456. Pinto M, Moraes CT (2015) Mechanisms linking mtDNA damage and aging. *Free Radic Biol Med* 85:250–258. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.005
457. Lemasters JJ (2014) Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). *Redox Biol* 2:749–754. doi:10.1016/j.redox.2014.06.004
458. Cosson E, Catargi B, Cheisson G, Jacqueminet S, Ichai C, Leguerrier A-M, Ouattara A, Tauveron I, Bismuth E, Benhamou D, Valensi P (2018) Practical management of diabetes patients before, during and after surgery: A joint French diabetology and anaesthesiology position statement. *Diabetes Metab* 44(3):200–216. doi:10.1016/j.diabet.2018.01.014
459. Rolo AP, Palmeira CM (2006) Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 212(2):167–178. doi:10.1016/j.taap.2006.01.003
460. Hofmeister-Brix A, Lenzen S, Baltrusch S (2013) The ubiquitin-proteasome system regulates the stability and activity of the glucose sensor glucokinase in pancreatic β -cells. *Biochem J* 456(2):173–184. doi:10.1042/BJ20130262
461. Kobayashi S, Xu X, Chen K, Liang Q (2012) Suppression of autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury. *Autophagy* 8(4):577–592. doi:10.4161/auto.18980
462. Williams T, Forsberg LJ, Viollet B, Brenman JE (2009) Basal autophagy induction without AMP-activated protein kinase under low glucose conditions. *Autophagy* 5(8):1155–1165
463. Kubli DA, Gustafsson ÅB (2012) Mitochondria and mitophagy. The yin and yang of cell death control. *Circ Res* 111(9):1208–1221. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.265819
464. Moulis M, Vindis C (2018) Autophagy in Metabolic Age-Related Human Diseases. *Cells* 7(10). doi:10.3390/cells7100149
465. Moheimani F, Kim CHJ, Rahmanto AS, van Reyk DM, Davies MJ (2012) Inhibition of lysosomal function in macrophages incubated with elevated glucose concentrations: a potential contributory factor in diabetes-associated atherosclerosis. *Atherosclerosis* 223(1):144–151. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.04.026

466. Sheikh-Ali M, Sultan S, Alamir A-R, Haas MJ, Mooradian AD (2010) Hyperglycemia-induced endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. *Nutrition* 26(11-12):1146–1150. doi:10.1016/j.nut.2009.08.019
467. Lai E, Zhang L, Volchuk A (2008) Chronic Hyperglycemia Induces ER Stress which may Contribute to Pancreatic β -Cell Dysfunction. *Canadian Journal of Diabetes* 32(4):338. doi:10.1016/S1499-2671(08)24153-5
468. Lei J, Zhao L, Zhang Y, Wu Y, Liu Y (2018) High Glucose-Induced Podocyte Injury Involves Activation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Induced Endoplasmic Reticulum (ER) Stress. *Cell Physiol Biochem* 45(6):2431–2443. doi:10.1159/000488231
469. Chen F, Qian L-H, Deng B, Liu Z-M, Zhao Y, Le Y-Y (2013) Resveratrol protects vascular endothelial cells from high glucose-induced apoptosis through inhibition of NADPH oxidase activation-driven oxidative stress. *CNS Neurosci Ther* 19(9):675–681. doi:10.1111/cns.12131
470. Kittl M, Beyreis M, Tumurkhuu M, Fürst J, Helm K, Pitschmann A, Gaisberger M, Glasl S, Ritter M, Jakab M (2016) Quercetin Stimulates Insulin Secretion and Reduces the Viability of Rat INS-1 Beta-Cells. *Cell Physiol Biochem* 39(1):278–293. doi:10.1159/000445623
471. Della David C (2012) Aging and the aggregating proteome. *Front Genet* 3:247. doi:10.3389/fgene.2012.00247
472. Hartl FU (2017) Protein Misfolding Diseases. *Annu Rev Biochem* 86:21–26. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044518
473. Cuanalo-Contreras K, Park K-W, Mukherjee A, Millán-Pérez Peña L, Soto C (2017) Delaying aging in *Caenorhabditis elegans* with protein aggregation inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 482(1):62–67. doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.143
474. Dhondt I, Petyuk VA, Bauer S, Brewer HM, Smith RD, Depuydt G, Braeckman BP (2017) Changes of Protein Turnover in Aging *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Proteomics* 16(9):1621–1633. doi:10.1074/mcp.RA117.000049
475. Kurlawala Z, Shah PP, Shah C, Beverly LJ (2017) The STI and UBA domains of UBQLN1 are critical determinants of substrate interaction and proteostasis. *J Cell Biochem* 118(8):2261–2270. doi:10.1002/jcb.25880
476. Lim PJ, Danner R, Liang J, Doong H, Harman C, Srinivasan D, Rothenberg C, Wang H, Ye Y, Fang S, Monteiro MJ (2009) Ubiquilin and p97/VCP bind erasin, forming a complex involved in ERAD. *J Cell Biol* 187(2):201–217. doi:10.1083/jcb.200903024

477. Safren N, El Ayadi A, Chang L, Terrillion CE, Gould TD, Boehning DF, Monteiro MJ (2014) Ubiquilin-1 overexpression increases the lifespan and delays accumulation of Huntingtin aggregates in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS ONE* 9(1):e87513. doi:10.1371/journal.pone.0087513
478. Li A, Xie Z, Dong Y, McKay KM, McKee ML, Tanzi RE (2007) Isolation and characterization of the *Drosophila* ubiquilin ortholog dUbqln. In vivo interaction with early-onset Alzheimer disease genes. *Hum Mol Genet* 16(21):2626–2639. doi:10.1093/hmg/ddm219
479. El Ayadi A, Stieren ES, Barral JM, Boehning D (2013) Ubiquilin-1 and protein quality control in Alzheimer disease. *Prion* 7(2):164–169. doi:10.4161/pri.23711
480. Madsen L, Schulze A, Seeger M, Hartmann-Petersen R (2007) Ubiquitin domain proteins in disease. *BMC Biochem* 8 Suppl 1:S1. doi:10.1186/1471-2091-8-S1-S1
481. Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292(5521):1552–1555. doi:10.1126/science.292.5521.1552
482. Kim T-Y, Kim E, Yoon SK, Yoon J-B (2008) Herp enhances ER-associated protein degradation by recruiting ubiquilins. *Biochem Biophys Res Commun* 369(2):741–746. doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.086
483. Olsen A, Vantipalli MC, Lithgow GJ (2006) Lifespan extension of *Caenorhabditis elegans* following repeated mild hormetic heat treatments. *Biogerontology* 7(4):221–230. doi:10.1007/s10522-006-9018-x
484. Rothenberg C, Srinivasan D, Mah L, Kaushik S, Peterhoff CM, Ugolino J, Fang S, Cuervo AM, Nixon RA, Monteiro MJ (2010) Ubiquilin functions in autophagy and is degraded by chaperone-mediated autophagy. *Hum Mol Genet* 19(16):3219–3232. doi:10.1093/hmg/ddq231
485. N'Diaye E-N, Kajihara KK, Hsieh I, Morisaki H, Debnath J, Brown EJ (2009) PLIC proteins or ubiquilins regulate autophagy-dependent cell survival during nutrient starvation. *EMBO Rep* 10(2):173–179. doi:10.1038/embor.2008.238
486. Rothenberg C, Monteiro MJ (2010) Ubiquilin at a crossroads in protein degradation pathways. *Autophagy* 6(7):979–980. doi:10.4161/auto.6.7.13118
487. Lee DY, Arnott D, Brown EJ (2013) Ubiquilin4 is an adaptor protein that recruits Ubiquilin1 to the autophagy machinery. *EMBO Rep* 14(4):373–381. doi:10.1038/embor.2013.22

488. Koushika SP, Schaefer AM, Vincent R, Willis JH, Bowerman B, Nonet ML (2004) Mutations in *Caenorhabditis elegans* cytoplasmic dynein components reveal specificity of neuronal retrograde cargo. *J Neurosci* 24(16):3907–3916. doi:10.1523/JNEUROSCI.5039-03.2004
489. Byers HR, Dykstra SG, Boissel SJS (2007) Requirement of dynactin p150(Glued) subunit for the functional integrity of the keratinocyte microparasol. *J Invest Dermatol* 127(7):1736–1744. doi:10.1038/sj.jid.5700760
490. Kim H, Ling S-C, Rogers GC, Kural C, Selvin PR, Rogers SL, Gelfand VI (2007) Microtubule binding by dynactin is required for microtubule organization but not cargo transport. *J Cell Biol* 176(5):641–651. doi:10.1083/jcb.200608128
491. Kumar S, Zhou Y, Plamann M (2001) Dynactin–membrane interaction is regulated by the C-terminal domains of p150Glued. *EMBO Rep* 2(10):939–944. doi:10.1093/embo-reports/kve202
492. Fu M-m, Nirschl JJ, Holzbaur ELF (2014) LC3 Binding to the Scaffolding Protein JIP1 Regulates Processive Dynein-Driven Transport of Autophagosomes. *Developmental Cell* 29(5):577–590. doi:10.1016/j.devcel.2014.04.015
493. Yu J, Lai C, Shim H, Xie C, Sun L, Long C-X, Ding J, Li Y, Cai H (2018) Genetic ablation of dynactin p150Glued in postnatal neurons causes preferential degeneration of spinal motor neurons in aged mice. *Mol Neurodegener* 13. doi:10.1186/s13024-018-0242-z
494. Ihara S, Nakayama S, Murakami Y, Suzuki E, Asakawa M, Kinoshita T, Sawa H (2017) PIGN prevents protein aggregation in the endoplasmic reticulum independently of its function in the GPI synthesis. *J Cell Sci* 130(3):602–613. doi:10.1242/jcs.196717
495. Levy JR, Sumner CJ, Caviston JP, Tokito MK, Ranganathan S, Ligon LA, Wallace KE, LaMonte BH, Harmison GG, Puls I, Fischbeck KH, Holzbaur ELF (2006) A motor neuron disease-associated mutation in p150Glued perturbs dynactin function and induces protein aggregation. *J Cell Biol* 172(5):733–745. doi:10.1083/jcb.200511068
496. Chen S, Zhou L, Zhang Y, Leng Y, Pei X-Y, Lin H, Jones R, Orlowski RZ, Dai Y, Grant S (2014) Targeting SQSTM1/p62 induces cargo loading failure and converts autophagy to apoptosis via NBK/Bik. *Mol Cell Biol* 34(18):3435–3449. doi:10.1128/MCB.01383-13
497. Demishtein A, Fraiberg M, Berko D, Tirosh B, Elazar Z, Navon A (2017) SQSTM1/p62-mediated autophagy compensates for loss of proteasome polyubiquitin recruiting capacity. *Autophagy* 13(10):1697–1708. doi:10.1080/15548627.2017.1356549

498. Wilhelm T, Byrne J, Medina R, Kolundžić E, Geisinger J, Hajduskova M, Tursun B, Richly H (2017) Neuronal inhibition of the autophagy nucleation complex extends life span in post-reproductive *C. elegans*. *Genes Dev* 31(15):1561–1572. doi:10.1101/gad.301648.117
499. Itakura E, Mizushima N (2011) p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J Cell Biol* 192(1):17–27. doi:10.1083/jcb.201009067
500. Duran A, Amanchy R, Linares JF, Joshi J, Abu-Baker S, Porollo A, Hansen M, Moscat J, Diaz-Meco MT (2011) p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell* 44(1):134–146. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.038
501. Ciuffa R, Lamark T, Tarafder AK, Guesdon A, Rybina S, Hagen WJH, Johansen T, Sachse C (2015) The selective autophagy receptor p62 forms a flexible filamentous helical scaffold. *Cell Rep* 11(5):748–758. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.062
502. Paine MG, Babu JR, Seibenhener ML, Wooten MW (2005) Evidence for p62 aggregate formation. Role in cell survival. *FEBS Letters* 579(22):5029–5034. doi:10.1016/j.febslet.2005.08.010
503. Ren F, Shu G, Liu G, Liu D, Zhou J, Yuan L, Zhou J (2014) Knockdown of p62/sequestosome 1 attenuates autophagy and inhibits colorectal cancer cell growth. *Mol Cell Biochem* 385(1-2):95–102. doi:10.1007/s11010-013-1818-0
504. Tominaga T, Goto M, Onoue T, Mizoguchi A, Sugiyama M, Tsunekawa T, Hagiwara D, Morishita Y, Ito Y, Iwama S, Suga H, Banno R, Arima H (2017) Sequestosome 1 (SQSTM1/p62) maintains protein folding capacity under endoplasmic reticulum stress in mouse hypothalamic organotypic culture. *Neurosci Lett* 656:103–107. doi:10.1016/j.neulet.2017.06.014
505. Zhang Y-Q, Shen X, Xiao X-L, Liu M-Y, Li S-L, Yan J, Jin J, Gao J-L, Zhen C-L, Hu N, Zhang X-Z, Tai Y, Zhang L-S, Bai Y-L, Dong D-L (2016) Mitochondrial uncoupler carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone induces vasorelaxation without involving KATP channel activation in smooth muscle cells of arteries. *Br J Pharmacol* 173(21):3145–3158. doi:10.1111/bph.13578
506. Lam HC, Baglini CV, Lope AL, Parkhitko AA, Liu H-J, Alesi N, Malinowska IA, Ebrahimi-Fakhari D, Saffari A, Yu JJ, Pereira A, Khabibullin D, Ogorek B, Nijmeh J, Kavanagh T, Handen A, Chan SY, Asara JM, Oldham WM, Diaz-Meco MT, Moscat J, Sahin M, Priolo C, Henske EP (2017) p62/SQSTM1 Cooperates with Hyperactive mTORC1 to Regulate Glutathione Production, Maintain Mitochondrial Integrity, and

- Promote Tumorigenesis. *Cancer Res* 77(12):3255–3267. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2458
507. Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM, Rubinsztein DC (2009) Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell* 33(4):517–527. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.021
508. Michalik A, van Broeckhoven C (2003) Pathogenesis of polyglutamine disorders. Aggregation revisited. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2:R173-86. doi:10.1093/hmg/ddg295
509. Taniguchi K, Yamachika S, He F, Karin M (2016) p62/SQSTM1-Dr. Jekyll and Mr. Hyde that prevents oxidative stress but promotes liver cancer. *FEBS Letters* 590(15):2375–2397. doi:10.1002/1873-3468.12301
510. Qiao Q, Sun C, Han C, Han N, Zhang M, Li G (2017) Endoplasmic reticulum stress pathway PERK-eIF2 α confers radioresistance in oropharyngeal carcinoma by activating NF- κ B. *Cancer Sci* 108(7):1421–1431. doi:10.1111/cas.13260
511. B'chir W, Maurin A-C, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A (2013) The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res* 41(16):7683–7699. doi:10.1093/nar/gkt563
512. Sha Z, Schnell HM, Ruoff K, Goldberg A (2018) Rapid induction of p62 and GABARAPL1 upon proteasome inhibition promotes survival before autophagy activation. *J Cell Biol* 217(5):1757–1776. doi:10.1083/jcb.201708168
513. Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC (2009) A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Autophagy* 5(6):862–863
514. Beskow A, Grimberg KB, Bott LC, Salomons FA, Dantuma NP, Young P (2009) A conserved unfoldase activity for the p97 AAA-ATPase in proteasomal degradation. *J Mol Biol* 394(4):732–746. doi:10.1016/j.jmb.2009.09.050
515. Locke M, Toth JI, Petroski MD (2014) Lys11- and Lys48-linked ubiquitin chains interact with p97 during endoplasmic-reticulum-associated degradation. *Biochem J* 459(1):205–216. doi:10.1042/BJ20120662
516. van den Boom J, Meyer H (2018) VCP/p97-Mediated Unfolding as a Principle in Protein Homeostasis and Signaling. *Mol Cell* 69(2):182–194. doi:10.1016/j.molcel.2017.10.028

517. Wong E, Cuervo AM (2010) Integration of clearance mechanisms. The proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(12):a006734. doi:10.1101/cshperspect.a006734
518. Park C, Cuervo AM (2013) Selective autophagy. Talking with the UPS. *Cell Biochem Biophys* 67(1):3–13. doi:10.1007/s12013-013-9623-7
519. Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC (2007) OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* 178(5):749–755. doi:10.1083/jcb.200704110
520. Patten DA, Wong J, Khacho M, Soubannier V, Mailloux RJ, Pilon-Larose K, MacLaurin JG, Park DS, McBride HM, Trinkle-Mulcahy L, Harper M-E, Germain M, Slack RS (2014) OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. *EMBO J* 33(22):2676–2691. doi:10.15252/emboj.201488349
521. Cogliati S, Enriquez JA, Scorrano L (2016) Mitochondrial Cristae. Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem Sci* 41(3):261–273. doi:10.1016/j.tibs.2016.01.001
522. Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, Strooper B de, Scorrano L (2006) OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126(1):177–189. doi:10.1016/j.cell.2006.06.025
523. Kanazawa T, Zappaterra MD, Hasegawa A, Wright AP, Newman-Smith ED, Buttle KF, McDonald K, Mannella CA, van der Blik AM (2008) The *C. elegans* Opa1 homologue EAT-3 is essential for resistance to free radicals. *PLoS Genet* 4(2):e1000022. doi:10.1371/journal.pgen.1000022
524. Mörck C, Pilon M (2006) *C. elegans* feeding defective mutants have shorter body lengths and increased autophagy. *BMC Dev Biol* 6:39. doi:10.1186/1471-213X-6-39
525. Lakowski B, Hekimi S (1998) The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(22):13091–13096
526. Bansal A, Zhu LJ, Yen K, Tissenbaum HA (2015) Uncoupling lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* longevity mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(3):E277-86. doi:10.1073/pnas.1412192112
527. Hansen M, Chandra A, Mitic LL, Onken B, Driscoll M, Kenyon C (2008) A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS Genet* 4(2):e24. doi:10.1371/journal.pgen.0040024

528. Chaudhari SN, Kipreos ET (2017) Increased mitochondrial fusion allows the survival of older animals in diverse *C. elegans* longevity pathways. *Nat Commun* 8(1):182. doi:10.1038/s41467-017-00274-4
529. Szabo A, Sumegi K, Fekete K, Hocsak E, Debreceni B, Setalo G, Kovacs K, Deres L, Kengyel A, Kovacs D, Mandl J, Nyitrai M, Febbraio MA, Gallyas F, Sumegi B (2018) Activation of mitochondrial fusion provides a new treatment for mitochondria-related diseases. *Biochem Pharmacol* 150:86–96. doi:10.1016/j.bcp.2018.01.038
530. Kenyon C (2011) The first long-lived mutants: discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing. *Philos Trans R Soc Lond , B, Biol Sci* 366(1561):9–16. doi:10.1098/rstb.2010.0276
531. Depuydt G, Xie F, Petyuk VA, Smolders A, Brewer HM, Camp DG, Smith RD, Braeckman BP (2014) LC-MS proteomics analysis of the insulin/IGF-1-deficient *Caenorhabditis elegans* *daf-2(e1370)* mutant reveals extensive restructuring of intermediary metabolism. *J Proteome Res* 13(4):1938–1956. doi:10.1021/pr401081b
532. Mörck C, Pilon M (2014) Caloric Restriction and Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* 3(1):51–53. doi:10.4161/auto.3418
533. Bergamini E, Cavallini G, Donati A, Gori Z (2003) The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57(5-6):203–208. doi:10.1016/S0753-3322(03)00048-9
534. Jia K, Levine B (2014) Autophagy is Required for Dietary Restriction-Mediated Life Span Extension in *C. elegans*. *Autophagy* 3(6):597–599. doi:10.4161/auto.4989
535. Kamei S, Chen-Kuo-Chang M, Cazevieille C, Lenaers G, Olichon A, Bélanguer P, Roussignol G, Renard N, Eybalin M, Michelin A, Delettre C, Brabet P, Hamel CP (2005) Expression of the Opa1 mitochondrial protein in retinal ganglion cells. Its downregulation causes aggregation of the mitochondrial network. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(11):4288–4294. doi:10.1167/iovs.03-1407
536. Hall AR, Burke N, Dongworth RK, Kalkhoran SB, Dyson A, Vicencio JM, Dorn GW, Yellon DM, Hausenloy DJ (2016) Hearts deficient in both Mfn1 and Mfn2 are protected against acute myocardial infarction. *Cell Death Dis* 7:e2238. doi:10.1038/cddis.2016.139
537. Ishihara N, Eura Y, Mihara K (2004) Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* 117(Pt 26):6535–6546. doi:10.1242/jcs.01565

538. Johnson D, Nehrke K (2010) Mitochondrial fragmentation leads to intracellular acidification in *Caenorhabditis elegans* and mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell* 21(13):2191–2201. doi:10.1091/mbc.e09-10-0874
539. Luz AL, Rooney JP, Kubik LL, Gonzalez CP, Song DH, Meyer JN (2015) Mitochondrial Morphology and Fundamental Parameters of the Mitochondrial Respiratory Chain Are Altered in *Caenorhabditis elegans* Strains Deficient in Mitochondrial Dynamics and Homeostasis Processes. *PLoS ONE* 10(6):e0130940. doi:10.1371/journal.pone.0130940
540. Phypers B, Pierce JT (2006) Lactate physiology in health and disease. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 6(3):128–132. doi:10.1093/bjaceaccp/mkl018
541. Kurashima K, Chae M, Inoue H, Hatakeyama S, Tanaka S (2013) A *uvs-5* strain is deficient for a mitofusin gene homologue, *fzo1*, involved in maintenance of long life span in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* 12(2):233–243. doi:10.1128/EC.00226-12
542. Hoppins S (2014) The regulation of mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 29:46–52. doi:10.1016/j.ceb.2014.03.005
543. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160(2):189–200. doi:10.1083/jcb.200211046
544. Willems PHGM, Rossignol R, Dieteren CEJ, Murphy MP, Koopman WJH (2015) Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics. *Cell Metab* 22(2):207–218. doi:10.1016/j.cmet.2015.06.006
545. Ishii T, Miyazawa M, Onouchi H, Yasuda K, Hartman PS, Ishii N (2013) Model animals for the study of oxidative stress from complex II. *Biochim Biophys Acta* 1827(5):588–597. doi:10.1016/j.bbabbio.2012.10.016
546. Rana A, Oliveira MP, Khamoui AV, Aparicio R, Rera M, Rossiter HB, Walker DW (2017) Promoting Drp1-mediated mitochondrial fission in midlife prolongs healthy lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Nat Commun* 8(1):448. doi:10.1038/s41467-017-00525-4
547. Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T (2015) Reactive oxygen species and mitochondria. A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol* 6:472–485. doi:10.1016/j.redox.2015.09.005

548. Reddy PH (2014) Inhibitors of mitochondrial fission as a therapeutic strategy for diseases with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J Alzheimers Dis* 40(2):245–256. doi:10.3233/JAD-132060
549. Kim H, Scimia MC, Wilkinson D, Trelles RD, Wood MR, Bowtell D, Dillin A, Mercola M, Ronai Z'eA (2011) Fine-tuning of Drp1/Fis1 availability by AKAP121/Siah2 regulates mitochondrial adaptation to hypoxia. *Mol Cell* 44(4):532–544. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.045
550. Reddy PH, Reddy TP, Manczak M, Calkins MJ, Shirendeb U, Mao P (2011) Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 67(1-2):103–118. doi:10.1016/j.brainresrev.2010.11.004
551. Koch A, Yoon Y, Bonekamp NA, McNiven MA, Schrader M (2005) A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell* 16(11):5077–5086. doi:10.1091/mbc.e05-02-0159
552. Cheng W-C, Leach KM, Hardwick JM (2008) Mitochondrial death pathways in yeast and mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1783(7):1272–1279. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.04.012
553. Cheng W-C, Teng X, Park HK, Tucker CM, Dunham MJ, Hardwick JM (2008) Fis1 deficiency selects for compensatory mutations responsible for cell death and growth control defects. *Cell Death Differ* 15(12):1838–1846. doi:10.1038/cdd.2008.117
554. Suen D-F, Norris KL, Youle RJ (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 22(12):1577–1590. doi:10.1101/gad.1658508
555. Twig G, Elorza A, Molina AJA, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27(2):433–446. doi:10.1038/sj.emboj.7601963
556. Huang P, Galloway CA, Yoon Y (2011) Control of mitochondrial morphology through differential interactions of mitochondrial fusion and fission proteins. *PLoS ONE* 6(5):e20655. doi:10.1371/journal.pone.0020655
557. Burman JL, Pickles S, Wang C, Sekine S, Vargas JNS, Zhang Z, Youle AM, Nezich CL, Wu X, Hammer JA, Youle RJ (2017) Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates. *J Cell Biol* 216(10):3231–3247. doi:10.1083/jcb.201612106

558. Westermann B (2012) Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta* 1817(10):1833–1838. doi:10.1016/j.bbabi.2012.02.033
559. Westermeier F, Navarro-Marquez M, López-Crisosto C, Bravo-Sagua R, Quiroga C, Bustamante M, Verdejo HE, Zalaquett R, Ibacache M, Parra V, Castro PF, Rothermel BA, Hill JA, Lavandero S (2015) Defective insulin signaling and mitochondrial dynamics in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 1853(5):1113–1118. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.02.005
560. Yang CC, Chen D, Lee SS, Walter L (2011) The dynamin-related protein DRP-1 and the insulin signaling pathway cooperate to modulate *Caenorhabditis elegans* longevity. *Aging Cell* 10(4):724–728. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00711.x
561. Twig G, Shirihai OS (2011) The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal* 14(10):1939–1951. doi:10.1089/ars.2010.3779
562. Tilleman L, Germani F, Henau S de, Geuens E, Hoogewijs D, Braeckman BP, Vanfleteren JR, Moens L, Dewilde S (2011) Globins in *Caenorhabditis elegans*. *IUBMB Life* 63(3):166–174. doi:10.1002/iub.443
563. Hoogewijs D, Geuens E, Dewilde S, Moens L, Vierstraete A, Vinogradov S, Vanfleteren J (2004) Genome-wide analysis of the globin gene family of *C. elegans*. *IUBMB Life* 56(11-12):697–702. doi:10.1080/15216540500037562
564. Geuens E, Hoogewijs D, Nardini M, Vinck E, Pesce A, Kiger L, Fago A, Tilleman L, Henau S de, Marden MC, Weber RE, van Doorslaer S, Vanfleteren J, Moens L, Bolognesi M, Dewilde S (2010) Globin-like proteins in *Caenorhabditis elegans*. In vivo localization, ligand binding and structural properties. *BMC Biochem* 11:17. doi:10.1186/1471-2091-11-17
565. Kaluz S, Kaluzová M, Stanbridge EJ (2008) Regulation of gene expression by hypoxia. Integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. *Clin Chim Acta* 395(1-2):6–13. doi:10.1016/j.cca.2008.05.002
566. Henau S de, Tilleman L, Vangheel M, Luyckx E, Trashin S, Pauwels M, Germani F, Vlaeminck C, Vanfleteren JR, Bert W, Pesce A, Nardini M, Bolognesi M, Wael K de, Moens L, Dewilde S, Braeckman BP (2015) A redox signalling globin is essential for reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* 6:8782. doi:10.1038/ncomms9782
567. Yoon J, Herzik MA, Winter MB, Tran R, Olea C, Marletta MA (2010) Structure and properties of a bis-histidyl ligated globin from *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry* 49(27):5662–5670. doi:10.1021/bi100710a

568. Kiger L, Tilleman L, Geuens E, Hoogewijs D, Lechauve C, Moens L, Dewilde S, Marden MC (2011) Electron transfer function versus oxygen delivery. A comparative study for several hexacoordinated globins across the animal kingdom. *PLoS ONE* 6(6):e20478. doi:10.1371/journal.pone.0020478
569. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N (2016) Mitophagy. In sickness and in health. *Mol Cell Oncol* 3(1):e1056332. doi:10.1080/23723556.2015.1056332
570. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL (2008) Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 283(16):10892–10903. doi:10.1074/jbc.M800102200
571. Leiser SF, Fletcher M, Begun A, Kaeberlein M (2013) Life-span extension from hypoxia in *Caenorhabditis elegans* requires both HIF-1 and DAF-16 and is antagonized by SKN-1. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68(10):1135–1144. doi:10.1093/gerona/glt016
572. Borch Jensen M, Qi Y, Riley R, Rabkina L, Jasper H (2017) PGAM5 promotes lasting FoxO activation after developmental mitochondrial stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Elife* 6. doi:10.7554/eLife.26952
573. Lu W, Karuppagounder SS, Springer DA, Allen MD, Zheng L, Chao B, Zhang Y, Dawson VL, Dawson TM, Lenardo M (2014) Genetic deficiency of the mitochondrial protein PGAM5 causes a Parkinson's-like movement disorder. *Nat Commun* 5:4930. doi:10.1038/ncomms5930
574. Ding W-X, Yin X-M (2012) Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem* 393(7):547–564. doi:10.1515/hsz-2012-0119
575. Lo JY, Spatola BN, Curran SP (2017) WDR23 regulates NRF2 independently of KEAP1. *PLoS Genet* 13(4):e1006762. doi:10.1371/journal.pgen.1006762
576. Xiong L, Xie J, Song C, Liu J, Zheng J, Liu C, Zhang X, Li P, Wang F (2015) The Activation of Nrf2 and Its Downstream Regulated Genes Mediates the Antioxidative Activities of Xueshuan Xinmaining Tablet in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015:187265. doi:10.1155/2015/187265
577. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen A-L (2013) The Keap1-Nrf2 pathway. Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol* 1:45–49. doi:10.1016/j.redox.2012.10.001
578. Lo S-C, Hannink M (2008) PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. *Exp Cell Res* 314(8):1789–1803. doi:10.1016/j.yexcr.2008.02.014

579. O'Mealey GB, Plafker KS, Berry WL, Janknecht R, Chan JY, Plafker SM (2017) A PGAM5-KEAP1-Nrf2 complex is required for stress-induced mitochondrial retrograde trafficking. *J Cell Sci* 130(20):3467–3480. doi:10.1242/jcs.203216
580. Lu W, Sun J, Yoon JS, Zhang Y, Zheng L, Murphy E, Mattson MP, Lenardo MJ (2016) Mitochondrial Protein PGAM5 Regulates Mitophagic Protection against Cell Necroptosis. *PLoS ONE* 11(1):e0147792. doi:10.1371/journal.pone.0147792
581. Galluzzi L, Kroemer G (2008) Necroptosis. A specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* 135(7):1161–1163. doi:10.1016/j.cell.2008.12.004
582. Novak I, Dikic I (2011) Autophagy receptors in developmental clearance of mitochondria. *Autophagy* 7(3):301–303
583. Rogov VV, Suzuki H, Marinković M, Lang V, Kato R, Kawasaki M, Buljubašić M, Šprung M, Rogova N, Wakatsuki S, Hamacher-Brady A, Dötsch V, Dikic I, Brady NR, Novak I (2017) Phosphorylation of the mitochondrial autophagy receptor Nix enhances its interaction with LC3 proteins. *Sci Rep* 7(1):1131. doi:10.1038/s41598-017-01258-6
584. Chourasia AH, Tracy K, Frankenberger C, Boland ML, Sharifi MN, Drake LE, Sachleben JR, Asara JM, Locasale JW, Karczmar GS, Macleod KF (2015) Mitophagy defects arising from BNip3 loss promote mammary tumor progression to metastasis. *EMBO Rep* 16(9):1145–1163. doi:10.15252/embr.201540759
585. Saito T, Sadoshima J (2015) Molecular mechanisms of mitochondrial autophagy/mitophagy in the heart. *Circ Res* 116(8):1477–1490. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303790
586. Andres AM, Tucker KC, Thomas A, Taylor DJR, Sengstock D, Jahania SM, Dabir R, Pourpirali S, Brown JA, Westbrook DG, Ballinger SW, Mentzer RM, Gottlieb RA (2017) Mitophagy and mitochondrial biogenesis in atrial tissue of patients undergoing heart surgery with cardiopulmonary bypass. *JCI Insight* 2(4):e89303. doi:10.1172/jci.insight.89303
587. Mouton-Liger F, Jacoupy M, Corvol J-C, Corti O (2017) PINK1/Parkin-Dependent Mitochondrial Surveillance. From Pleiotropy to Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci* 10:120. doi:10.3389/fnmol.2017.00120
588. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen D-F, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 8(1):e1000298. doi:10.1371/journal.pbio.1000298

589. Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H, Hirokawa T, Endo T, Fon EA, Trempe J-F, Saeki Y, Tanaka K, Matsuda N (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 510(7503):162–166. doi:10.1038/nature13392
590. Wang S, Zhao Z, Feng X, Cheng Z, Xiong Z, Wang T, Lin J, Zhang M, Hu J, Fan Y, Reiter RJ, Wang H, Sun D (2018) Melatonin activates Parkin translocation and rescues the impaired mitophagy activity of diabetic cardiomyopathy through Mst1 inhibition. *J Cell Mol Med* 22(10):5132–5144. doi:10.1111/jcmm.13802
591. Parganlija D, Klinkenberg M, Domínguez-Bautista J, Hetzel M, Gispert S, Chimi MA, Dröse S, Mai S, Brandt U, Auburger G, Jendrach M (2014) Loss of PINK1 impairs stress-induced autophagy and cell survival. *PLoS ONE* 9(4):e95288. doi:10.1371/journal.pone.0095288
592. Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Yao Z, Abramov AY, Abramov ASY, Miljan EA, Keen G, Stanyer L, Hargreaves I, Klupsch K, Deas E, Downward J, Mansfield L, Jat P, Taylor J, Heales S, Duchon MR, Latchman D, Tabrizi SJ, Wood NW (2008) PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PLoS ONE* 3(6):e2455. doi:10.1371/journal.pone.0002455
593. Heeman B, van den Haute C, Aelvoet S-A, Valsecchi F, Rodenburg RJ, Reumers V, Debyser Z, Callewaert G, Koopman WJH, Willems PHGM, Baekelandt V (2011) Depletion of PINK1 affects mitochondrial metabolism, calcium homeostasis and energy maintenance. *J Cell Sci* 124(Pt 7):1115–1125. doi:10.1242/jcs.078303
594. Yang Y, Gehrke S, Imai Y, Huang Z, Ouyang Y, Wang J-W, Yang L, Beal MF, Vogel H, Lu B (2006) Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(28):10793–10798. doi:10.1073/pnas.0602493103
595. Dues DJ, Schaar CE, Johnson BK, Bowman MJ, Winn ME, Senchuk MM, van Raamsdonk JM (2017) Uncoupling of oxidative stress resistance and lifespan in long-lived *isp-1* mitochondrial mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 108:362–373. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.004
596. Back P, Braeckman BP, Matthijssens F (2012) ROS in aging *Caenorhabditis elegans*: damage or signaling? *Oxid Med Cell Longev* 2012:608478. doi:10.1155/2012/608478

597. Ristow M, Schmeisser K (2014) Mitohormesis. Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose Response* 12(2):288–341. doi:10.2203/dose-response.13-035.Ristow
598. Wang X, Luo F, Zhao H (2014) Paraquat-induced reactive oxygen species inhibit neutrophil apoptosis via a p38 MAPK/NF- κ B-IL-6/TNF- α positive-feedback circuit. *PLoS ONE* 9(4):e93837. doi:10.1371/journal.pone.0093837
599. Deas E, Piipari K, Machhada A, Li A, Gutierrez-del-Arroyo A, Withers DJ, Wood NW, Abramov AY (2014) PINK1 deficiency in β -cells increases basal insulin secretion and improves glucose tolerance in mice. *Open Biol* 4:140051. doi:10.1098/rsob.140051
600. Bueno M, Lai Y-C, Romero Y, Brands J, St Croix CM, Kamga C, Corey C, Herazo-Maya JD, Sembrat J, Lee JS, Duncan SR, Rojas M, Shiva S, Chu CT, Mora AL (2015) PINK1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes lung fibrosis. *J Clin Invest* 125(2):521–538. doi:10.1172/JCI74942
601. Smit JJ, Sixma TK (2014) RBR E3-ligases at work. *EMBO Rep* 15(2):142–154. doi:10.1002/embr.201338166
602. Martinez-Finley EJ, Chakraborty S, Slaughter JC, Aschner M (2013) Early-life exposure to methylmercury in wildtype and pdr-1/parkin knockout *C. elegans*. *Neurochem Res* 38(8):1543–1552. doi:10.1007/s11064-013-1054-8
603. Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ (2003) Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(7):4078–4083. doi:10.1073/pnas.0737556100
604. Biosa A, Sanchez-Martinez A, Filograna R, Terriente-Felix A, Alam SM, Beltramini M, Bubacco L, Bisaglia M, Whitworth AJ (2018) Superoxide dismutating molecules rescue the toxic effects of PINK1 and parkin loss. *Hum Mol Genet* 27(9):1618–1629. doi:10.1093/hmg/ddy069
605. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, Sideris DP, Fogel AI, Youle RJ (2015) The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524(7565):309–314. doi:10.1038/nature14893
606. Takiff HE, Chen SM, Court DL (1989) Genetic analysis of the rnc operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171(5):2581–2590

607. Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 408(6810):325–330. doi:10.1038/35042517
608. Rual J-F, Ceron J, Koreth J, Hao T, Nicot A-S, Hirozane-Kishikawa T, Vandenhaute J, Orkin SH, Hill DE, 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. doi:10.1101/gr.2505604
609. Timmons L, Fire A (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395(6705):854. doi:10.1038/27579

9 Appendix: Material

9.1 Nematodenstämme

In Tabelle 9.1 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *C. elegans*-Stämme, die vom *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC, *University of Minnesota*, St. Paul, MN, USA) bezogen wurden, mit Angabe des jeweiligen Genotyps aufgeführt.

Tabelle 9.1 Nematodenstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
N2	Wildtyp	[277]
TK22	<i>mev-1(kn1)</i>	[322]
SJ4005xTK22 *	<i>zcls4 [hsp-4p::GFP] V; mev-1(kn1)</i>	[322, 333]
BC12921	<i>dpy-5(e907) I</i>	[370]

* Der transgene Wurmstamm SJ4005 (*zcls4 [hsp-4p::GFP] V*) wurde mit dem für die vorliegende Arbeit relevanten TK22-Nematoden (*mev-1*) von Dorothé Jenni Eisermann (Arbeitsgruppe Wenzel) gekreuzt [430].

9.2 Bakterienstämme

Tabelle 9.2 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme. Während der *E. coli*-Stamm OP50 vom CGC (*University of Minnesota*, St. Paul, MN, USA) zur Verfügung gestellt wurde, stammt der HT115-Klon von BioScience – Lifesciences (UK).

Tabelle 9.2 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> OP50	ura-	[277]
<i>E. coli</i> HT115	<i>F-, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, lambda-, rnc14::Tn10(DE3 lysogen: lavUV5 promoter -T7 polymerase)</i>	[606]
NovaBlue Giga Singles™ (<i>E. coli</i>)	<i>endA1 hsdR17 (rK12- mK12+) supE44 thi-1</i>	Merck

recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA+B+

lacIqZΔM15::Tn10] (TetR)

9.3 RNAi-Klone

Tabelle 9.3 gibt die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten RNAi-Klone wieder, die aus den RNAi-Bibliotheken von Ahringer (*C. elegans* RNAi Library) [380, 607] bzw. Vidal (*C. elegans* ORF RNAi Library) [608] stammen.

Tabelle 9.3 RNAi-Klone

Bezeichnung	Cosmidname	Beschreibung [365]
<i>dct-1</i>	C14F5.1	<i>DAF-16/FOXO controlled, germline tumor affecting</i>
<i>dnc-1</i>	ZK593.5	<i>dynactin complex component</i>
<i>drp-1</i>	T12E12.4	<i>dynamamin-related protein</i>
<i>eat-3</i>	D2013.5	<i>eating: abnormal pharyngeal pumping</i>
<i>fis-1</i>	F41G3.4	<i>S. cerevisiae FIS1-related</i>
<i>fzo-1</i>	ZK1248.14	<i>FZO (Fzo mitochondrial fusion protein) related</i>
<i>glb-1</i>	ZK637.13	<i>globin related</i>
<i>hsp-4</i>	F43E2.8	<i>heat shock protein</i>
<i>pek-1</i>	F46C3.1	<i>human PERK kinase homolog</i>
<i>pdr-1</i>	K08E3.7	<i>Parkinson's disease related</i>
<i>pgam-5</i>	R07G3.5	<i>phosphoglycerate mutase homolog</i>
<i>pink-1</i>	EEED8.9	<i>PINK (PTEN-induced kinase) homolog</i>
<i>sqst-1</i>	T12G3.1	<i>sequestosome related</i>
<i>ubq-1</i>	F25B5.4	<i>ubiquitin</i>
<i>ubql-1</i>	F15C11.2	<i>ubiquilin</i>

* Die *sqst-1*- und *dnc-1*-RNAi-Bakterien wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert (Kap. 3.7).

9.4 Verbrauchsmaterialien mit Hersteller

In Tabelle 9.4 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet. Bezogen wurden diese von Brand GmbH (Wertheim, D), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D), Duran Group GmbH (Wertheim/Main, D), Gilson Inc. (Middleton, USA), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D), Labcon North America (Petaluma, USA), Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA), Qiagen (Hilden, D), Sarstedt AG & Co. (Nürnbrecht, D) und VWR (früher: Peqlab) International GmbH (Erlangen, D).

Tabelle 9.4 Verbrauchsmaterialien mit Hersteller

Material	Hersteller
Amersham Hyperfilm ECL (18x24 cm)	GE Healthcare Life Sciences
Bechergläser	Duran
Deckel für 2 ml-Schraubdeckelgefäße	Carl Roth
Deckel für 384- <i>well</i> -Mikrotiterplatten	Brand
Deckgläser (24x50 mm)	Carl Roth
Edelstahlskalpell	Carl Roth
Erlenmeyerkolben (verschiedene Größen)	Duran
Gefrier- und Kochfolie	Carl Roth
Laborflaschen mit Schraubverschluss	Duran
Messzylinder	Brand
Mikrotiterplatten (96 <i>well</i> , 384 <i>well</i>)	Greiner Bio-One
Multi- <i>well</i> -Platten (24 <i>well</i>)	Greiner Bio-One
Objektträger (25x75 mm)	Carl Roth
Parafilm M (10,2 cmx38,1 m)	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten (mit/ohne Wattestopfen, 150 mm)	Carl Roth
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Labcon North America
Petrischalen (35x10 mm, 92x16 mm)	Sarstedt
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl 1000 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen <i>low retention</i> (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt

Polyvinylidenfluorid-Membran (Porengröße 0,45 µm)	Carl Roth
Precellys Keramikkügelchen (1,4 mm)	VWR
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Rotilabo® Abdeckfolie für Mikrotiterplatten	Carl Roth
Rotilabo® Aluminiumfolie	Carl Roth
Rotilabo® Cryoboxen	Carl Roth
Rotilabo® Einmalküvetten Halbmikro (1,5 ml) und Mikro (70 µl)	Carl Roth
Rotilabo® Impföse	Carl Roth
Schraubdeckelreaktionsgefäße (2 ml)	VWR
Seriosieraufsatz Distrip (125 ml, 1250 ml, 12500 ml)	Gilson
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Whatman-Papier (20x20 cm, 0,34 mm)	Carl Roth
Zahnstocher	Carl Roth
Zellkulturröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt

9.5 Geräte

Des Weiteren sind in Tabelle 9.5 die in der vorliegenden Arbeit genutzten Geräte und Laborhilfsmittel aufgeführt.

Tabelle 9.5 Geräte und Laborhilfsmittel

Geräte	Hersteller
Autoklav Systec DB23	Systec (Wettenberg, D)
Biophotometer Plus	Eppendorf (Hamburg, D)
Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene® Labware (Langenselbold, D)
Elektrophorese Komplettsystem Mini Protean 3 Cell	Biorad (München, D)
Elektrophorese System Perfect Blue Gelsystem™	VWR (Erlangen, D)

Fluoroskan Ascent FL	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Fluoreszenzmikroskop EVOS fl Colour	AMG (Bothell, USA)
Homogenisator, Precellys® 24	VWR (Erlangen, D)
Inkubator	WTB Binder (Tuttlingen, D)
Kaltlichtquelle KL200	Schott AG (Mainz, D)
Kühlzentrifuge Universal 320 R	Hettich (Tuttlingen, D)
Mikrowelle	Cinex (Ascheberg, D)
Moticam 2500 USB	Bayersdörfer (Saarbrücken-Eschringen, D)
Optimax X-Ray Film Processor	Protec Medizintechnik (Oberstenfeld, D)
pH-Meter	Schott Instruments (Mainz, D)
Pipetus®	Hirschmann (Eberstadt, D)
Präzisionswaage	Kern & Sohn (Balingen, D)
Röntgenfilmkassette	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Schüttler	Eppendorf (Hamburg, D)
Schüttler Unimax 1010 mit Inkubator	Heidolph (Hamburg, D)
Semi-Dry Blotter Modell HEP-1	Owl (Portsmouth, USA)
Seriendosierer DISTRIMAN	Gilson (Bad Camberg, D)
Stereomikroskop	Breukhoven Microscope Systems (Capelle a/d IJssel, NL)
Sterilisator	WTB Binder (Tuttlingen, D)
Sterilwerkbank (HS12/2)	Heraeus (Hanau, D)
Thermocycler Verit® 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
ThermoShaker (Biometra, TS1)	Analytik Jena AG (Jena, D)
Thermostatschrank	Lovibond (Dortmund, D)
Tischzentrifuge Universal 320R	Hettich (Tuttlingen, D)
Trockenschrank	Heraeus (Hanau, D)
Überkopfschüttler (Intelli-Mixer)	neoLab (Heidelberg, D)
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin electronic (Berlin, D)

Vakuum-Folienschweißer FS 6171-07	Siemssen Product Service GmbH (Münster, D)
Vakuumpumpe Laborport	neoLab (Heidelberg, D)
Variopipetten (2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson (Bad Camberg, D)
VisiBlue™ Transilluminator	UVP (Cambridge, UK)
Vortex Mixer Reax Control	Heidolph Instruments (Schwabach, D)
Wasseraufbereitungssystem Synergy	Merck Millipore (Burlington, USA)
Wasserbad	Bandelin electronic (Berlin, D)
Zentrifuge Mikro 120	Hettich (Tuttlingen, D)

9.6 Chemikalien und Reagenzien

In Tabelle 9.6 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des jeweiligen Herstellers und der entsprechenden Bestellnummer aufgeführt. Diese wurden von AppliChem (Darmstadt, D), Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D), Merck KGaA (Darmstadt, D), Promega (Madison, USA), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D) und Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Tabelle 9.6 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller	Bestellnummer
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth	6901.1
2-Mercaptoethanol	Carl Roth	4227.3
2-Methyl-1-Propanol	Sigma-Aldrich	58460
2x Yeast Tryptone (YT)-Medium	Carl Roth	X966.2
Acrylamid-Lösung (30 %)	Carl Roth	3029.1
Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz (ATP)	Carl Roth	HN35.1
Agar Agar SERVA Kobe I	Serva Electrophoresis	11392

Agarose	Carl Roth	T846.2
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma-Aldrich	A2153
Ammoniumpersulfat	Carl Roth	9592.3
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth	K029.1
Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat	Bio-Rad	500-0006
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	B0126
Calciumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth	5239.2
Carbenicillin-Dinatriumsalz	AppliChem	A1491
Cholesterol	Sigma-Aldrich	C8667
Coomassie® Brillant Blau R-250	Thermo Fisher Scientific	20278
Diethyldicarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich	D5758
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Carl Roth	P749.2
Dimethylsulfoxid (DMSO) ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)	Carl Roth	4720.2
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth	P030.1
DNA-Beladungspuffer (6x)	Thermo Fisher Scientific	R0611
Essigsäure	Carl Roth	7332.1
Ethanol (> 99.5 %)	Carl Roth	5054.3
Ethanol (70 %, vergällt)	Carl Roth	T913.3
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth	CN06.1
Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	SM0321
Glycerin	Carl Roth	3783.1
Glycin	Carl Roth	3908.2
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich	I3021
Isopropanol (2-Propanol, 99,8 %)	Carl Roth	6752.3
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth	2316.4
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth	3904.1
Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth	6751.1
Kanamycinsulfat	Carl Roth	T832.1

Levamisol Hydrochlorid	Sigma-Aldrich	31742
Luminol	Carl Roth	4203.1
LysoTracker® Red DND-99	Thermo Fisher Scientific	L7528
Magnesiumchloride Hexahydrat (MgCl ₂ *6 H ₂ O)	Carl Roth	2189.2
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ *7 H ₂ O)	Carl Roth	P027.2
Methanol	Carl Roth	4627.4
MG-132	Merck	474790
Milchpulver	Carl Roth	T145.1
MitoTracker Red CM-H ₂ XRos	Thermo Fisher Scientific	M7513
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin/TEMED	Carl Roth	2367.3
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth	9105.3
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth	3957.1
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth	6771.1
Natriumhypochloridlösung (NaClO in H ₂ O, 12 % Cl)	Carl Roth	9062.3
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth	4360.2
Nystatin Suspension	Sigma-Aldrich	N1638
<i>p</i> -Coumarinsäure	Sigma-Aldrich	C9008
Pepton aus Casein	Merck	111931
Ponceau S	Carl Roth	5938.1
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad	1610374S
Quercetin Dihydrat	Carl Roth	7138.1
N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido- 4-Methylcoumarin (Suc-LLVY-AMC)	Sigma-Aldrich	S6510
Roti®-Free Stripping-Puffer 2.0 (<i>ready-to-use</i>)	Carl Roth	3319.2
Roti®-Stock 10x PBS (<i>phosphate-buffered saline</i>)	Carl Roth	1058.1
SOC-Medium	New England BioLabs	B9020S

SYBR® Safe DNA Gel Stain	Thermo Fisher Scientific	S33102
SYTOX® Green Nucleic Acid Stain in DMSO	Thermo Fisher Scientific	S7020
Tetracyclin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich	T7660
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth	8789.2
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth	4855.2
TRIS-Hydrochlorid (TRIS-HCl)	Carl Roth	9090.3
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich	P2287
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30 %)	Carl Roth	CP26.1
α-D(+)-Glucose Monohydrat	Carl Roth	6780.1

9.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 9.7 zeigt die in dieser Arbeit eingesetzten Puffer und Lösungen mit der Angabe von der Konzentration, den einzelnen Bestandteilen sowie den entsprechenden Mengenangaben und dem jeweiligen Lösungsmittel.

Tabelle 9.7 Stammlösungen

Stammlösung	Konzentration	Lösungsmittel
Ampicillin ^{a)}	100 mg/ml	50 % Ethanol
CaCl ₂ ^{b)}	0,1 M	bidest. H ₂ O
CaCl ₂ ^{b)}	1 M	bidest. H ₂ O
Carbenicillin ^{a)}	25 mg/ml	50 % Ethanol
Cholesterol ^{a)}	5 mg/ml	Ethanol
EDTA ^{c)}	0,5 mg/ml	bidest. H ₂ O
IPTG ^{a)}	1 M	50 % Ethanol
IPTG ^{a)}	100 mM	bidest. H ₂ O
Kanamycin ^{b)}	25 mg/ml	bidest. H ₂ O
KCl ^{c)}	50 mM	bidest. H ₂ O
KH ₂ PO ₄ ^{b)}	1 M	bidest. H ₂ O
KOH ^{c)}	5 M	bidest. H ₂ O

Levamisol ^{b)}	2 mM	M9-Puffer
Luminol ^{a)}	250 mM	DMSO
LysoTracker® Red DND-99 ^{a)}	1 mM	DMSO
MG-132 ^{a)}	1 mM	DMSO
MgCl ₂ ^{b)}	0,1 M	bidest. H ₂ O
MgCl ₂ ^{b)}	2,5 mM	bidest. H ₂ O
MgSO ₄ ^{b)}	0,1 M	bidest. H ₂ O
MgSO ₄ ^{b)}	1 M	bidest. H ₂ O
MitoTracker Red CM-H ₂ XRos ^{a)}	300 µM	DMSO
Suc-LLVY-AMC ^{a)}	14 mM	DMSO
NaOH ^{c)}	5 M	bidest. H ₂ O
<i>p</i> -Coumarinsäure ^{a)}	90 mM	DMSO
Proteinase K ^{a)}	20 mg/ml	bidest. H ₂ O
Quercetin-Dihydrat ^{a)}	10 mM	Ethanol-Tween® 20 (92:8 v/v)
SDS ^{c)}	20 % w/v	bidest. H ₂ O
SYTOX® Green Nucleic Acid Stain in DMSO ^{a)}	5 mM	M9-Tween®20
Tetracyclin ^{a)}	12,5 mg/ml	50 % Ethanol
TRIS (pH 8,3) ^{c)}	1 mM	bidest. H ₂ O
TRIS (pH 8,5) ^{c)}	1 M	bidest. H ₂ O
TRIS (pH 8,8) ^{c)}	1,5 M	bidest. H ₂ O
TRIS-HCl (pH 6,8) ^{c)}	0,5 M	bidest. H ₂ O
TRIS-HCl (pH 6,8) ^{c)}	1 M	bidest. H ₂ O
X-Gal ^{a)}	40 mg/ml	DMSO
α-D(+)-Glucose Monohydrat	1 M	M9-Puffer

Die Stammlösungen wurden bei -20 °C ^{a)}, bei 4 °C ^{b)} oder bei Raumtemperatur ^{c)} gelagert. Im Gegensatz dazu wurde die Stammlösung für Glucose stets frisch angesetzt.

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

Tabelle 9.8 Bleichlösung

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

Die Bleichlösung wurde für jeden *EggPrep* frisch hergestellt.

Tabelle 9.9 Einfrierpuffer A

Einfrierpuffer A (pH 5,95)	
K ₂ HPO ₄ (50 mM)	64,5 ml
K ₂ HPO ₄ (50 mM)	435,5 ml
NaCl	2,9 g
bidest. H ₂ O	ad 500 ml

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Lagerung des Einfrierpuffers A bei 4 °C.

Tabelle 9.10 Einfrierpuffer B

Einfrierpuffer B	
Glycerin	300 ml
Einfrierpuffer A	700 ml

Der Einfrierpuffer B wurde nach dem Autoklavieren bei 4°C gelagert.

Tabelle 9.11 Ethanol-Tween®20

Ethanol-Tween®20	
Ethanol	92 ml
Tween®20	8 ml

Die Lagerung der Ethanol-Tween®20-Lösung fand bei 4 °C statt.

Tabelle 9.12 M9-Puffer

M9-Puffer	
KH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
NaCl	5 g
bidest. H ₂ O	999 ml

Nach dem Autoklavieren bei 121 °C wurde die Lösung auf 60 °C abgekühlt und unter sterilen Bedingungen mit 1 ml MgSO₄ (1 M) versetzt. Bei Raumtemperatur erfolgte die Lagerung des fertigen M9-Puffers.

Tabelle 9.13 M9-Tween®20

M9-Tween®20	
M9-Puffer	495 ml
Tween®20	5 ml

Bei Raumtemperatur wurde die M9-Tween®20-Lösung gelagert.

Tabelle 9.14 NaCl-Pepton

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

Die Lösung wurde nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 9.15 Levamisol

Levamisol (2 mM)	
Levamisol-Hydrochlorid	120,38 mg
M9-Puffer	250 ml

Die Lagerung der Levamisol-Lösung erfolgte bei 4 °C, wobei diese zur Betäubung der Nematoden für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen diente.

Puffer und Lösungen für biochemische Methoden

Tabelle 9.16 3x Lämmli-Puffer

3x Lämmli-Puffer	
Tris-HCl (1 M, pH 6,8)	2,4 ml
SDS (20 %, w/v)	3 ml
Glycerin (30 %, v/v)	3 ml
β-Mercaptoethanol	1,6 ml
Bromphenolblau	Spatelspitze

Die Lagerung des 3x Lämmli-Puffers fand bei -20 °C statt.

Tabelle 9.17 Blotpuffer nach Towbin

Blot-Puffer nach Towbin (pH 8,6)	
TRIS	3,03 g
Glycin	14,4 g
Methanol	200 ml
bidest. H ₂ O	ad 1000 ml

Gelagert wurde der Towbin-Puffer bei Raumtemperatur.

Tabelle 9.18 10x Laufpuffer

10x Laufpuffer	
TRIS	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
bidest. H ₂ O	ad 1000 ml

Die Lagerung des 10x Laufpuffers fand bei Raumtemperatur statt, wobei er vor Gebrauch 1:10 mit bidest. H₂O verdünnt wurde.

Tabelle 9.19 10x PBST-Puffer

10x PBST-Puffer	
Roti®-Stock 10x PBS	100 ml
Tween®20	500 µl

Wie der 10x PBS-Puffer war auch der 10x PBST-Puffer bei Raumtemperatur lagerfähig und musste ebenfalls vor Gebrauch 1:10 mit bidest. H₂O verdünnt werden.

Tabelle 9.20 Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Lösung

ECL-Lösung	
<u>Lösung A</u>	
TRIS (8,5, 1 M)	5 ml
<i>p</i> -Coumarinsäure	110 µl
Luminol	250 µl
bidest. H ₂ O	45 ml
<u>Lösung B</u>	
H ₂ O ₂ (30 %)	100 µl
bidest. H ₂ O	900 µl

Für den Nachweis von HRP-konjugierten Antikörpern wurden 10 ml der ECL-Lösung A mit 30 µl der ECL-Lösung B versetzt. Diese Mischung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt, wohingegen die verschiedenen Lösungen 1 Woche bei 4 °C gelagert werden konnten.

Tabelle 9.21 Blockpuffer

Blockpuffer	
Milchpulver	1 g
1x PBST-Puffer	100 ml

Bei 4 °C konnte der Blockpuffer 1 Woche gelagert werden.

Tabelle 9.22 Ponceau S

Ponceau S	
2 % Ponceau S	2 g
TCA	3 g
bidest. H ₂ O	<i>ad</i> 100 ml

Die Lagerung der Ponceau S-Lösung erfolgte bei Raumtemperatur, wobei sie vor Gebrauch 1:10 mit bidest. H₂O verdünnt wurde.

Tabelle 9.23 Coomassie-Färbelösung

Coomassie-Färbelösung	
Coomassie® Brillant Blau G-250 (0,25 %, w/v)	0,5 g
Methanol (50 %) (45,5 %, v/v)	<i>ad</i> 200 ml
Essigsäure (98 %) (9,2 %, v/v)	20 ml

Die Coomassie-Färbelösung war (nach dem Filtrieren) bei Raumtemperatur lagerfähig.

Tabelle 9.24 Entfärbelösung

Entfärbelösung (Coomassie-Färbung)	
Ethanol (30 % v/v)	300 ml
Essigsäure (98 %) (10 %, v/v)	100 ml
bidest. H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml

Die Lagerung der Entfärbelösung fand bei Raumtemperatur statt.

Tabelle 9.25 Lysepuffer I

Lysepuffer I (Wurm-Lysepuffer für die Proteinextraktion)	
HEPES (pH 7,4)	12 g
NaCl	9 g
EDTA	1,5 g
DTT	0,3 g
bidest. H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml

Der Lysepuffer I wurde bei 4 °C gelagert.

Tabelle 9.26 10x TBS-Puffer

10x TBS-Puffer (pH 7,5)	
NaCl	8,77 g
TRIS	6,06 g
bidest. H ₂ O	<i>ad</i> 100 ml

Der 10x TBS-Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert und vor Gebrauch 1:10 mit bidest. H₂O verdünnt.

Tabelle 9.27 Proteasomaktivitätspuffer

Proteasomaktivitätsmesspuffer	
HEPES (pH 7,4)	12 g
NaCl	9 g
EDTA	1,5 g
ATP	2,8 g
bidest. H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml

Bei -20 °C war der Proteasomaktivitätsmesspuffer lagerfähig.

Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

Tabelle 9.28 Lysepuffer II

Lysepuffer II (Wurm-Lysepuffer für die SW-PCR)	
TRIS (pH 8,3, 10 mM)	0,12 g
KCl	0,37 g
MgCl ₂	50,83 g
IGEPAL	450 µl
Tween®20	450 µl
Gelatine	100 µl
bidest. H ₂ O	<i>ad</i> 100 ml

Die Lagerung des Lysepuffers II erfolgte bei Raumtemperatur, wobei vor Gebrauch ein Gemisch aus 5 µl Proteinase K-Stammlösung (25 mg/ml) und 995 µl Puffer frisch hergestellt wurde.

Tabelle 9.29 50x TAE-Puffer

50x TAE-Puffer (Laufpuffer)	
TRIS	242 g
Essigsäure	57,1 ml
EDTA	100 ml
bidest. H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml

Bei Raumtemperatur war der 50x TAE-Puffer lagerfähig. Vor Gebrauch wurde er jedoch 1:50 mit bidest. H₂O verdünnt.

Tabelle 9.30 DEPC-H₂O

DEPC-H₂O	
DEPC	1 ml
bidest. H ₂ O	ad 1000 ml

Die Lagerung von DEPC-H₂O fand nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur statt.

Tabelle 9.31 MgCl₂/CaCl₂-Lösung

MgCl₂/CaCl₂-Lösung	
MgCl ₂ (80 mM)	8,13 g
CaCl ₂ (20 mM)	0,29 g
H ₂ O	ad 100 ml

Die MgCl₂/CaCl₂-Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

9.8 Medien

Die folgenden Tabellen zeigen die in dieser Arbeit verwendeten Medien bzw. deren Bestandteile mit entsprechenden Mengenangaben.

Tabelle 9.32 2x YT-Agar

2x YT-Agar	
2x YT-Medium	6,2 g
Agar	3 g
bidest. H ₂ O	ad 200 ml

Die 2x YT-Agarplatten dienten zur Kultivierung von *E. coli* OP50-Bakterien. Nach dem Autoklavieren bei 121 °C und dem Abkühlen auf 55 °C wurden die Agarplatten unter sterilen Bedingungen gegossen. Für die Kultivierung von HT115-Bakterien wurden dem Agar Ampicillin (100 µg/ml) und Tetracyclin (25 mg/µl) hinzugegeben. Die Lagerung dieser Platten erfolgte bei 4 °C.

Tabelle 9.33 2x YT-Medium

2x YT-Medium (pH 7)	
2x YT-Medium	31 g
bidest. H ₂ O	ad 1000 ml

Nach dem Autoklavieren wurde das 2x YT-Medium, das zur Kultivierung von OP50- und HT115-Bakterien diente, bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 9.34 NGM-Agar

NGM-Agar (Teil 1)	
Agar	6,8 g
Pepton	1,0 g
NaCl	1,2 g
bidest. H ₂ O	ad 500 ml

Die Lösung wurde bei 121 °C autoklaviert und im Wasserbad auf 55 °C abgekühlt. Unter sterilen Bedingungen erfolgte die Zugabe der folgenden Bestandteile:

NGM-Agar (Teil 2)	
KH ₂ PO ₄ (1 M, pH 6)	10 ml
MgSO ₄ (0,1 M)	400 µl
CaCl ₂ (0,1 M)	400 µl
Carbenicillin (25 mg/ml)	400 µl
Cholesterollösung (5 mg/100ml)	400 µl
Nystatin-Lösung (10000 U/ml)	10 ml

Unter sterilen Bedingungen wurde der NGM-Agar in Petrischalen gegossen und bei Raumtemperatur gelagert. Die hergestellten NGM-Agarplatten dienen zur Kultivierung von *C. elegans*.

Tabelle 9.35 NGM-Flüssigmedium

NGM-Flüssigmedium	
NaCl-Pepton	9,71 ml
KH ₂ PO ₄ (1 M, pH 6)	250 µl
MgSO ₄ (1 M)	10 µl
CaCl ₂ (0,1 M)	10 µl
Cholesterol (5 mg/ml)	10 µl
Carbenicillin (25 mg/ml)	10 µl
<u>Für RNAi-Experimente:</u>	
Kanamycin (25 mg/ml) (statt Carbenicillin)	20 µl

Für jeden Versuch wurde das NGM-Flüssigmedium frisch angesetzt, wobei für RNAi-Experimente Kanamycin als Antibiotikum verwendet wurde.

9.9 Enzyme und Antikörper

Tabelle 9.36 und Tabelle 9.37 geben die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme und Antikörper wieder.

Tabelle 9.36 Enzyme

Enzyme	Sequenz (5' → 3')	Hersteller	Bestellnummer
T4-DNA-Ligase		Sigma-Aldrich	10481220001
<i>Taq</i> DNA Polymerase (rekombinant)		Thermo Fisher Scientific	EP0401
<i>HindIII</i>	5'...A↓AGCT T...3' 3'...T TCGA↑A...5'	Thermo Fisher Scientific	ER0501
<i>XhoI</i>	5'...C↓TCGA G...3' 3'...G AGCT↑C...5'	Thermo Fisher Scientific	ER0691

Tabelle 9.37 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer
<i>Rabbit-anti-ubiquitin (linkage-specific K48)</i> <i>(monoclonal)</i>	Abcam	ab140601
<i>Mouse-anti-ubiquitin (linkage-specific K63)</i> <i>(monoclonal)</i>	Thermo Fisher Scientific	14607782
<i>Rabbit-anti-actin antibody (monoclonal)</i>	Sigma-Aldrich	A2066
<i>Mouse-anti-rabbit IgG-HRP (polyclonal)</i>	Santa Cruz Biotechnology	sc-2357
<i>Goat-anti-mouse IgG-HRP (polyclonal)</i>	Santa Cruz Biotechnology	sc-2005

9.10 Kits

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Kits mit Hersteller- und Bestellnummer aufgelistet.

Tabelle 9.38 Kits

Kit	Hersteller	Bestellnummer
KAPA2G Fast HotStart PCR Kit	Sigma-Aldrich	KK5512
Plasmid Miniprep Kit I (peqGOLD)	VWR	7322779
Gel Extraction Kit (peqGOLD)	VWR	7322776
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen	12243
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Fisher Scientific	K1422
TOPO® TA Cloning® Kit	Thermo Fisher Scientific	450641
ProteoStat® Protein <i>aggregation</i> assay	Enzo Life Sciences	ENZ-51023-KP050

9.11 Oligonukleotide

Tabelle 9.39 gibt die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide wieder, die mithilfe des *National Center for Biotechnology (NCBI) Primer Designing Tools* entworfen und von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) bzw. biomers.net GmbH (Ulm, D) synthetisiert wurden.

Tabelle 9.39 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')	T _m (°C) *
<i>dnc-1_fw_2256</i>	GTG AGC AGC GTT GAA TCC ATC	59,8
<i>dnc-1_rv_2796</i>	CAC GTC GTC AGG CTG GGA TATT	59,8
<i>sqst-1-r-580-1</i>	GTC CGA TGA TCC GAGG	55
<i>sqst-1-fw-15-2</i>	ATC CGC TCCT AAA TGC	56

* T_m: *melting temperature* (Schmelztemperatur)

9.12 Vektoren

Die in dieser Arbeit, für die Klonierung von RNAi-Konstrukten, verwendeten Vektoren sind in Tabelle 9.40 aufgeführt.

Tabelle 9.40 Vektoren

Vektor	Referenz
L4440 (pPD129.36)	[609]
pCR® 2.1-TOPO®	Thermo Fisher Scientific

9.13 Software

Tabelle 9.41 zeigt die in der vorliegenden Arbeit verwendete Software und deren Hersteller.

Tabelle 9.41 Software

Software	Hersteller
Ascent Software for Fluoroskan 2.6	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
GraphPad Prism 5	Graph Pad Software (San Diego, USA)
Motic Images Plus 2.0 ML	Beyersdörfer (Saarbrücken-Eschringen, D)
Image J 1.44	National Institute of Health (Bethesda, USA)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Uwe Wenzel für die Vergabe des interessanten Themas, die Bereitstellung der notwendigen Ressourcen und die kompetente Betreuung bedanken. Seine andauernde Bereitschaft zum Beantworten von Fragen sowie seine kritischen und hilfreichen Hinweise haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Herrn Prof. Dr. Lakes-Harlan für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur.

Für die Hilfe und Anregungen bei meinen Fragen möchte ich auch Dr. Elena Fitzenberger danken, die mich beim Erlernen der Labormethoden und Auswertungen der Ergebnisse unterstützt hat.

Ein großer Dank geht auch an Anne Leiteritz, Eva Czynski, Alexandra Neeb, Therese Kubetzki-Bauer, Angelika Balzer, Alexander Berninger, Sandra Schwalm und Christina Hailu für die Hilfsbereitschaft und die Unterstützung im Labor.

Auch möchte ich mich bei meinen Studenten, Sandra Flory, Eike Wächtershäuser, Hedda Meloh, Sophia Hartmann, Jan Mehrkens und Nora Carstens, für die konstruktive Zusammenarbeit bedanken. Ein großer Dank gilt auch allen anderen Studenten bzw. Kollegen, insbesondere Elli Berger und Paulos Tirekoglou, für die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Weiterhin danke ich meinen Freunden für die motivierenden Gespräche, die Ablenkungen und das entgegengebrachte Verständnis. Ein ganz besonderer Dank geht an Erika Keim für die Korrektur dieser Arbeit.

Doch der größte Dank gilt meiner Familie, ohne deren moralische Unterstützung und unendliche Geduld ich niemals so weit gekommen wäre. Ich bin so froh, euch zu haben. Danke für alles!

Eidesstattliche Erklärung

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

Gießen, den 05.04.2019

Unterschrift_____