



**Effekte von pflanzlichen Extrakten in *Caenorhabditis elegans* als  
Modellorganismus für die neurodegenerativen Erkrankungen  
Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Chorea Huntington**

**Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)**

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
Agrar- und Ernährungswissenschaften,  
Geowissenschaften und Informatik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Frau Christina Anita Saier  
geboren am 30.05.1992 in Konstanz

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wim Wätjen  
Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. Judith M. Rollinger  
Datum der Verteidigung: 13.06.2022

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Oxidativer Stress und neurodegenerative Erkrankungen.....	1
1.2	Morbus Parkinson.....	2
1.3	Morbus Alzheimer.....	3
1.4	Chorea Huntington.....	4
1.5	<i>Caenorhabditis elegans</i> .....	5
1.6	<i>C. elegans</i> als Modellorganismus bei M. Parkinson.....	6
1.6.1	Dopamin und dopaminerge Neuronen in <i>C. elegans</i> .....	6
1.6.2	<i>C. elegans</i> -Stämme zum Modellieren von M. Parkinson.....	7
1.7	<i>C. elegans</i> als Modellorganismus bei M. Alzheimer.....	8
1.7.1	Tau, A $\beta$ und die AChE in <i>C. elegans</i> .....	8
1.7.2	<i>C. elegans</i> -Stämme zum Modellieren von M. Alzheimer.....	9
1.8	<i>C. elegans</i> als Modellorganismus bei C. Huntington.....	10
1.8.1	PolyQ und das Huntington Gen in <i>C. elegans</i> .....	10
1.8.2	<i>C. elegans</i> -Stämme zum Modellieren von C. Huntington.....	11
1.9	Der Insulin/IGF-1 Signalweg in <i>C. elegans</i> und dessen Bedeutung für neurodegenerative Erkrankungen.....	11
1.10	Pflanzliche Extrakte und deren Inhaltsstoffe.....	13
1.10.1	<i>Olea europaea</i> .....	13
1.10.2	<i>Crocus sativus</i> .....	14
1.10.3	<i>Gynostemma pentaphyllum</i> .....	14
1.10.4	<i>Polygonum multiflorum</i> .....	15
1.10.5	<i>Rosmarinus officinalis</i> .....	15
1.10.6	<i>Ziziphus jujuba</i> .....	16
2	Zielsetzung.....	17
3	Material und Methoden.....	19
3.1	Material.....	19
3.1.1	<i>C. elegans</i> -Stämme.....	19
3.1.2	Bakterienstämme.....	19
3.1.3	Eingesetzte Extrakte und Substanzen.....	19
3.1.4	Chemikalien.....	21
3.1.5	Medien und Lösungen.....	23
3.1.6	Geräte.....	28

3.1.7	Software.....	28
3.2	Methoden.....	29
3.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	29
3.2.2	Aufkonzentrierung von Bakterien.....	29
3.2.3	Kontaminationsprüfung von Bakterienkulturen.....	30
3.2.4	Bestimmung der Bakterienkonzentration.....	30
3.2.5	Herstellung von NGM <sub>k</sub> -Agarplatten und Kultivierung von <i>C. elegans</i> .....	30
3.2.6	Inkubationsmedien für Untersuchungen in Flüssigkultur.....	31
3.2.7	Synchronisation von <i>C. elegans</i> .....	32
3.2.8	Untersuchung der Pharynxpumpfrequenz.....	33
3.2.9	Größenmessung.....	33
3.2.10	Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften <i>in vitro</i> (TEAC).....	34
3.2.11	Untersuchung der ROS-Level <i>in vivo</i> mittels DCF-Assay.....	35
3.2.12	Thermale Stressresistenz (Sytox® Green Assay).....	36
3.2.13	Resistenz gegenüber oxidativem Stress.....	37
3.2.14	Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16.....	38
3.2.15	Untersuchung von Effekten auf die durch 6-OHDA hervorgerufene Degeneration dopaminergener Neuronen.....	38
3.2.16	Degeneration der dopaminergen Neuronen durch eine erhöhte Dopaminsynthese in den Neuronen.....	39
3.2.17	Untersuchung der A $\beta$ <sub>1-42</sub> -Toxizität (M. Alzheimer).....	40
3.2.18	Anzahl der A $\beta$ <sub>1-42</sub> -Plaques in den Nematoden.....	41
3.2.19	Untersuchung der AChE-Aktivität (Ellman's Assay).....	42
3.2.20	Bestimmung der Proteinmenge.....	43
3.2.21	Untersuchung der Anzahl von PolyQ-Plaques (Huntington).....	44
3.2.22	Untersuchung der durch PolyQ hervorgerufenen Neurodegeneration.....	44
3.2.23	Untersuchung der nozizeptorischen Wahrnehmung in einem <i>C. elegans</i> Modell für C. Huntington.....	45
4	Ergebnisse.....	47
4.1	Allgemeine Untersuchungen von OBE und seinen Inhaltsstoffen zu antioxidativen Wirkungen und Stressresistenz.....	47
4.1.1	Antioxidative Effekte von OBE und seinen Inhaltsstoffen.....	47
4.1.2	Modulation der Resistenz gegenüber thermalem und oxidativem Stress durch OBE und seine Inhaltsstoffe.....	50

4.1.3 Modulation der Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 durch OBE und seine Inhaltsstoffe.....	53
4.1.4 Untersuchung der Modulation des IIS durch OBE und seine Inhaltsstoffe mittels Deletion von DAF-16.....	55
4.2 Untersuchungen von OBE und seinen Inhaltsstoffen auf neuroprotektive Wirkungen im M. Parkinson Modell.....	58
4.2.1 Untersuchung neuroprotektiver Effekte durch OBE und seine Inhaltsstoffe nach 6-OHDA-Behandlung.....	58
4.2.2 Untersuchung neuroprotektiver Effekte durch OBE und seine Inhaltsstoffe bei Überproduktion von Dopamin.....	60
4.3 Untersuchungen von OBE und seinen Inhaltsstoffen auf neuroprotektive Wirkungen im M. Alzheimer Modell.....	62
4.3.1 Modulation der A $\beta$ <sub>1-42</sub> -Toxizität durch OBE und seine Inhaltsstoffe.....	62
4.3.2 Modulation der A $\beta$ <sub>1-42</sub> -Plaques durch OBE und seine Inhaltsstoffe.....	64
4.3.3 Einfluss von OBE und seinen Inhaltsstoffen auf die Aktivität der AChE.....	67
4.4 Untersuchungen von OBE und seinen Inhaltsstoffen auf neuroprotektive Wirkungen im C. Huntington Modell.....	68
4.4.1 Modulation der PolyQ-Plaques durch OBE und seine Inhaltsstoffe.....	68
4.4.2 Modulation der PolyQ-bedingten Neurodegeneration durch OBE und seine Inhaltsstoffe.....	70
4.4.3 Einfluss von OBE und seinen Inhaltsstoffen auf die Reaktionsfähigkeit der Nematoden auf mechanische Stimuli.....	72
4.5 Allgemeine Untersuchungen verschiedener Extrakte zu antioxidativen Wirkungen und Stressresistenz.....	74
4.5.1 Antioxidative Effekte verschiedener Extrakte.....	74
4.5.2 Modulation der Resistenz gegenüber thermalem und oxidativem Stress durch verschiedene Extrakte.....	79
4.5.3 Modulation der Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 durch verschiedene Extrakte.....	84
4.5.4 Untersuchung der Modulation des IIS durch verschiedene Extrakte mittels Deletion von DAF-16.....	86
4.6 Untersuchungen verschiedener Extrakte auf neuroprotektive Wirkungen im M. Parkinson Modell.....	91
4.6.1 Untersuchung neuroprotektiver Effekte durch verschiedene Extrakte nach 6-OHDA-Behandlung.....	91

4.6.2	Untersuchung neuroprotektiver Effekte verschiedener Extrakte bei Überproduktion von Dopamin.....	93
4.7	Untersuchungen verschiedener Extrakte auf neuroprotektive Wirkungen im M. Alzheimer Modell.....	96
4.7.1	Modulation der A $\beta$ <sub>1-42</sub> -Toxizität durch verschiedene Extrakte.....	96
4.7.2	Modulation der A $\beta$ <sub>1-42</sub> -Plaques durch verschiedene Extrakte.....	99
4.7.3	Einfluss verschiedener Extrakte auf die Aktivität der AChE.....	102
4.8	Untersuchungen verschiedener Extrakte auf neuroprotektive Wirkungen im C. Huntington Modell.....	104
4.8.1	Modulation der PolyQ-Plaques durch verschiedene Extrakte.....	104
4.8.2	Modulation der PolyQ-bedingten Neurodegeneration durch verschiedene Extrakte.....	106
4.8.3	Einfluss verschiedener Extrakte auf die Reaktionsfähigkeit der Nematoden auf mechanische Stimuli.....	108
5	Diskussion.....	111
5.1	Allgemeine protektive Wirkungen von OBE und seinen Inhaltsstoffen.....	111
5.2	Die Wirkungen von OBE und seinen Inhaltsstoffen werden teilweise durch DAF-16 vermittelt.....	115
5.3	OBE und seine Inhaltsstoffe besitzen neuroprotektive Eigenschaften in <i>C. elegans</i> Modellen für M. Parkinson.....	117
5.4	OBE und seine Inhaltsstoffe besitzen neuroprotektive Eigenschaften in <i>C. elegans</i> Modellen für M. Alzheimer.....	122
5.5	OBE und seine Inhaltsstoffe besitzen neuroprotektive Eigenschaften in <i>C. elegans</i> Modellen für C. Huntington.....	125
5.6	Neuroprotektive Wirkungen von CSE.....	127
5.7	Neuroprotektive Wirkungen von JGE.....	130
5.8	Neuroprotektive Wirkungen von PME.....	132
5.9	Neuroprotektive Wirkungen von REW.....	136
5.10	Neuroprotektive Wirkungen von ZJE.....	139
6	Fazit und Ausblick.....	142
7	Zusammenfassung.....	144
7.1	Abstract.....	146
8	Literaturverzeichnis.....	147
9	Anhang.....	168
9.1	Pharynxpumpfrequenz.....	168

9.2 Größenmessung.....	170
9.3 Quenching.....	172
9.4 Einzelexperimente DCF-Assay im Wildtyp mit 3-HT.....	175
9.5 Einfluss von neuroprotektiven Effekten hinsichtlich der Reaktion der Nematoden auf mechanische Nozizeptoren.....	175
10 Danksagung.....	177
11 Eidesstattliche Erklärung / Declaration under Oath.....	178
12 Publikationsliste.....	179
13 Lebenslauf.....	181

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Radikalfangende Eigenschaften (TEAC-Assay; OBE und Inhaltsstoffe).....	47
Abbildung 2: Thermal induzierter Anstieg der ROS-Level im Wildtyp (DCF-Assay; OBE und Inhaltsstoffe).....	49
Abbildung 3: Resistenz wildtypischer Nematoden gegenüber thermalem Stress (OBE und Inhaltsstoffe).....	50
Abbildung 4: Resistenz des Wildtyp gegenüber oxidativem Stress (OBE und Inhaltsstoffe).	52
Abbildung 5: Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 (OBE und Inhaltsstoffe).....	54
Abbildung 6: Beispielbilder der Lokalisation von DAF-16::GFP in den Nematoden.....	54
Abbildung 7: Thermal induzierter Anstieg der ROS-Level in der DAF-16-Deletionsmutante (DCF-Assay; OBE und Inhaltsstoffe).....	56
Abbildung 8: Resistenz des DAF-16-defizienten Stammes gegenüber oxidativem Stress (OBE und Inhaltsstoffe).....	57
Abbildung 9: Beispielbilder von Nematoden des Stammes BZ555.....	58
Abbildung 10: Untersuchung der Neurodegeneration durch 6-OHDA im Stamm BZ555 (OBE und Inhaltsstoffe).....	59
Abbildung 11: Untersuchung der Neurodegeneration durch eine erhöhte Dopaminsynthese im Stamm UA57 (OBE und Inhaltsstoffe).....	61
Abbildung 12: Beispielbilder von Nematoden des Stammes UA57.....	62
Abbildung 13: A $\beta$ -Toxizitätstest (OBE und Inhaltsstoffe).....	63
Abbildung 14: Beispielbild eines Nematoden des Stammes CL2006.....	64
Abbildung 15: Verteilung der Anzahl der A $\beta$ <sub>1-42</sub> -Plaques in Nematoden des transgenen Stammes CL2006 (OBE und Inhaltsstoffe).....	65
Abbildung 16: Bestimmung der AChE-Aktivität (OBE und Inhaltsstoffe).....	67
Abbildung 17: Beispielbild eines Nematoden des Stammes EAK103.....	68
Abbildung 18: Untersuchung der durch Fragmente eines mutierten humanen Huntingtinproteins hervorgerufenen Plaquebildung im Stamm EAK103 (OBE und Inhaltsstoffe).....	70
Abbildung 19: Untersuchung der durch Fragmente des humanen Huntingtins hervorgerufenen Neurodegeneration im Stamm HA659 (OBE und Inhaltsstoffe).....	71
Abbildung 20: Beispielbilder von Nematoden des Stammes HA659.....	72
Abbildung 21: Untersuchung der durch Fragmente des humanen Huntingtins hervorgerufenen Reduzierung der nozizeptorischen Wahrnehmung im Stamm HA659 (OBE und Inhaltsstoffe).....	73

Abbildung 22: Radikalfangende Eigenschaften (TEAC-Assay; verschiedene Extrakte).....	75
Abbildung 23: Thermal induzierter Anstieg der ROS-Level im Wildtyp (DCF-Assay; verschiedene Extrakte).....	77
Abbildung 24: Resistenz wildtypischer Nematoden gegenüber thermalem Stress (verschiedene Extrakte).....	80
Abbildung 25: Resistenz des Wildtyp gegenüber oxidativem Stress (verschiedene Extrakte). .....	82
Abbildung 26: Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 (verschiedene Extrakte).....	85
Abbildung 27: Thermal induzierter Anstieg der ROS-Level in der DAF-16-Deletionsmutante (DCF-Assay; verschiedene Extrakte).....	87
Abbildung 28: Resistenz des DAF-16-defizienten Stammes gegenüber thermalem Stress (verschiedene Extrakte).....	88
Abbildung 29: Resistenz des DAF-16-defizienten Stammes gegenüber oxidativem Stress (verschiedene Extrakte).....	90
Abbildung 30: Untersuchung der Neurodegeneration durch 6-OHDA im Stamm BZ555 (verschiedene Extrakte).....	92
Abbildung 31: Untersuchung der Neurodegeneration durch eine erhöhte Dopaminsynthese im Stamm UA57 (verschiedene Extrakte).....	94
Abbildung 32: A $\beta$ <sub>1-42</sub> -Toxizitätstest (verschiedene Extrakte).....	97
Abbildung 33: Verteilung der Anzahl der A $\beta$ <sub>1-42</sub> -Plaques in Nematoden des transgenen Stammes CL2006 (verschiedene Extrakte).....	100
Abbildung 34: Bestimmung der AChE-Aktivität (verschiedene Extrakte).....	103
Abbildung 35: Untersuchung der durch Fragmente eines mutierten humanen Huntingtinproteins hervorgerufenen Plaquebildung im Stamm EAK103 (verschiedene Extrakte).....	105
Abbildung 36: Untersuchung der durch Fragmente des humanen Huntingtins hervorgerufenen Neurodegeneration im Stamm HA659 (verschiedene Extrakte).....	107
Abbildung 37: Untersuchung der durch Fragmente des humanen Huntingtins hervorgerufenen Reduzierung der nozizeptorischen Wahrnehmung im Stamm HA659 (verschiedene Extrakte).....	109
Abbildung 38: Pharynxpumpfrequenz (OBE und Inhaltsstoffe).....	168
Abbildung 39: Pharynxpumpfrequenz (verschiedene Extrakte).....	169
Abbildung 40: Größenmessung (OBE und Inhaltsstoffe).....	170
Abbildung 41: Größenmessung (verschiedene Extrakte).....	171
Abbildung 42: Quenching (OBE und Inhaltsstoffe).....	173

Abbildung 43: Quenching (verschiedene Extrakte).....	174
Abbildung 44: Thermal induzierter Anstieg der ROS-Level im Wildtyp (DCF-Assay; OBE und Inhaltsstoffe; Einzelexperimente).....	175
Abbildung 45: Untersuchung der durch Fragmente des humanen Huntingtins hervorgerufenen Reduzierung der nozizeptorischen Wahrnehmung im Stamm HA659 (OBE und Inhaltsstoffe; Tag 10, 12 und 14).....	176

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete <i>C. elegans</i> -Stämme.....	19
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme.....	19
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller.....	21
Tabelle 4: Verwendete Medien und Lösungen und ihre Zusammensetzung.....	23
Tabelle 5: Verwendete Geräte und ihre Hersteller.....	28
Tabelle 6: Verwendete Software und ihre Herausgeber.....	28
Tabelle 7: Grundlegende Zusammensetzung von Kulturmedien.....	31
Tabelle 8: Zusammensetzung der Kulturmedien mit 3HT und TYR.....	32
Tabelle 9: Zusammensetzung der Medien mit 50 mM bzw. 80 mM Paraquat.....	37
Tabelle 10: Zusammensetzung der Verdünnungsreihe des BSA-Standards.....	43
Tabelle 11: Zusammensetzungen der Verdünnungen der Probe.....	44
Tabelle 12: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der thermalen Stressresistenz am Wildtyp (OBE und Inhaltsstoffe).....	51
Tabelle 13: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der oxidativen Stressresistenz am Wildtyp (OBE und Inhaltsstoffe).....	53
Tabelle 14: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der oxidativen Stressresistenz an DAF-16-Deletionsmutanten (OBE und Inhaltsstoffe).....	57
Tabelle 15: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der A $\beta$ -bedingten Paralyse der Nematoden des Stammes CL4176 (OBE und Inhaltsstoffe).....	63
Tabelle 16: Mittelwerte und p-Werte der Anzahl an A $\beta$ <sub>1-42</sub> -Plaques in den Kopf- und Schwanzbereichen der Nematoden des Stammes CL2006 (OBE und Inhaltsstoffe).....	66
Tabelle 17: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der thermalen Stressresistenz am Wildtyp (verschiedene Extrakte).....	81
Tabelle 18: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der oxidativen Stressresistenz am Wildtyp (verschiedene Extrakte).....	83
Tabelle 19: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der thermalen Stressresistenz an DAF-16-Deletionsmutanten.....	89
Tabelle 20: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der oxidativen Stressresistenz an DAF-16-Deletionsmutanten (verschiedene Extrakte).....	91
Tabelle 21: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der A $\beta$ -bedingten Paralyse der Nematoden des Stammes CL4176 (verschiedene Extrakte).....	98
Tabelle 22: Mittelwerte und p-Werte der Anzahl an A $\beta$ <sub>1-42</sub> -Plaques in den Kopf- und Schwanzbereichen der Nematoden des Stammes CL2006 (verschiedene Extrakte).....	101

## Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	Amyloid $\beta$
ABTS	2, 2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
AChE	Acetylcholinesterase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA-AT	Rinderserumalbumin-Ampicillin-Tetracyclin-Mix
BSA	Rinderserumalbumin
CAT-2	abnormal CATEcholamine distribution
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C. Huntington	Chorea Huntington
<i>C. sativus</i>	<i>Crocus sativus</i>
CSE	<i>Crocus sativus</i> Extrakt
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAF-2	abnormal dauer formation protein-2
DAF-16	abnormal dauer formation protein-16
DCF	Dichlorofluorescein
DCF-DA	Dichlorofluorescein-Diacetat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FOXO	Forkhead-Box-Protein O
FUDR	5-Fluoro-2'-deoxyuridin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
<i>G. pentaphyllum</i>	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>
H <sub>2</sub> DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
3-HT	3-Hydroxytyrosol
Htn	Huntingtin
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IGF-1 R	insulin-like growth factor-1 receptor
IIS	Insulin/IGF-1 Signalweg
JGE	Jiao Gulan Extrakt
KBE	koloniebildende Einheit
LB	Lysogeny Broth

M. Alzheimer	Morbus Alzheimer
M. Parkinson	Morbus Parkinson
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
M9	Mineralmedium 9
NGM	Nematode Growth Medium
NGM <sub>k</sub>	Nematode Growth Medium komplett
Nrf2	nuclear factor-erythroid related-factor 2
n.s.	nicht signifikant
OBE	Olivenblattextrakt
OD	Optische Dichte
<i>O. europaea</i>	<i>Olea europaea</i>
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
OP	Oleuropein
OS	Oleanolsäure
Q	Glutamin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline Tween 20
PFA	Paraformaldehyd
PME	<i>Polygonum multiflorum</i> Extrakt
<i>P. multiflorum</i>	<i>Polygonum multiflorum</i>
REW	Rosmarinextrakt (wässrig)
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
<i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
SKN-1	SKINhead-1
SOD-3	Superoxiddismutase 3
TEAC	Trolox equivalent antioxidative capacity
Trolox	(±)-6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
TSG	2,3,5,4'-Tetrahydroxystilben-2-O-β-D-glucosid
TYR	Tyrosol
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
ZJE	<i>Ziziphus jujuba</i> Extrakt
<i>Z. jujuba</i>	<i>Ziziphus jujuba</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Oxidativer Stress und neurodegenerative Erkrankungen

Als oxidativer Stress wird ein Ungleichgewicht von prooxidativen und antioxidativen Substanzen zugunsten der Prooxidantien bezeichnet. Unter dem Begriff Prooxidantien werden Moleküle zusammengefasst, welche in der Lage sind, weitere Moleküle zu oxidieren (SIES, 1985). Hierzu gehören auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxidanionen, Hydroxylradikale oder Wasserstoffperoxid. ROS sind hochreaktiv und können deshalb zu oxidativen Schädigungen von Molekülen wie Proteinen, Lipiden oder der DNA und letztendlich der gesamten Zelle führen (Übersichtsartikel: SIES, 1986).

ROS stammen entweder aus exogenen oder endogenen Quellen. Endogene ROS entstehen hauptsächlich im Zuge der mitochondrialen Atmung oder als Nebenprodukt von verschiedenen Enzymen wie der Xanthinoxidase oder der Stickstoffmonoxid-Synthase (Übersichtsartikel: BRIEGER et al., 2012). ROS induzieren in Organismen jedoch nicht nur oxidativen Stress, sondern sind auch in Signalwegen involviert und regulieren viele zelluläre Prozesse wie den Aufbau des Cytoskeletts (KIM et al., 2009). In geringen Mengen sind ROS folglich wichtig für die Gesundheit (Übersichtsartikel BRIEGER et al., 2012) und können das Leben verlängern (YANG und HEKIMI, 2010). In hohen Mengen können sie jedoch zu zellulären Schäden und Krankheit führen (Übersichtsartikel BRIEGER et al., 2012). Organismen benötigen also eine gute Balance zwischen prooxidativen und antioxidativen Substanzen (YANG und HEKIMI, 2010; Übersichtsartikel BRIEGER et al., 2012).

Um diese Balance zu halten, werden antioxidative Mechanismen benötigt. Hier kann zwischen zwei Arten unterschieden werden: der direkten und der indirekten antioxidativen Wirkung. Direkt wirkende Antioxidantien wie die Vitamine C und E, sind in der Lage ROS abzufangen und sie unschädlich zu machen, während indirekte Antioxidantien auf zelluläre Signalwege Einfluss nehmen, sodass z. B. vermehrt antioxidative Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD) und die Katalase, exprimiert werden (Übersichtsartikel: DINKOVA-KOSTOVA und TALALAY, 2008).

Oxidativer Stress ist auch mit einigen humanen Krankheiten wie z. B. Diabetes (PAOLISSO et al., 1994) oder Atherosklerose assoziiert (PARKER et al., 1995). Zudem sind oxidative Prozesse an der Pathogenese der neurodegenerativen Krankheiten Morbus Parkinson (M. Parkinson) (JANA et al., 2011; PACELLI et al., 2015), Morbus Alzheimer (M. Alzheimer) (GOOD et al., 1996; SMITH et al., 1996) und Chorea Huntington (C. Huntington) beteiligt

(SOROLLA et al., 2008; HANDS et al., 2011). Aus diesem Grund kann eine Reduktion des oxidativen Stresses durch direkt oder indirekt wirkende Antioxidantien eine Möglichkeit zur Prävention und Therapie von neurodegenerativen Krankheiten darstellen.

## 1.2 Morbus Parkinson

M. Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung (Übersichtsartikel: POEWE et al., 2017) und tritt typischerweise erst spät im Leben ab dem 60. Lebensjahr auf. Der vorherrschende Risikofaktor für diese Erkrankung ist ein hohes Alter. Nur etwa 5 bis 15% der Erkrankungsfälle sind auf eine familiäre Vererbung zurückzuführen (Übersichtsartikel: BALESTRINO und SCHAPIRA, 2019). Bei M. Parkinson kommt es zu einer Degeneration der dopaminergen Neuronen der Substantia nigra im Gehirn der Patienten (Übersichtsartikel: BALESTRINO und SCHAPIRA, 2019) und zur Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein in intraneuronalen Lewikörpern (SPILLANTINI et al., 1997).

Die Entstehungsmechanismen der Erkrankung sind noch nicht abschließend geklärt. Durch  $\alpha$ -Synuclein scheint es zu einer schlechteren Verpackung von Dopamin in intrazellulären Vesikeln zu kommen, wodurch sich mehr freies Dopamin in den Neuronen befindet (PHAN et al., 2017). Dopaminerge Neuronen der Substantia nigra haben ein höheres Level an oxidativem Stress, da sie eine hohe mitochondriale Aktivität aufweisen und zudem eine höhere Anzahl an Mitochondrien in den Axonen besitzen (PACELLI et al., 2015). Die hierdurch erhöhten Level an ROS könnten wiederum mit dem freien Dopamin reagieren und hoch reaktive Dopaminquinone bilden, welche den Zellen Schaden zufügen (JANA et al., 2011). Dopaminerge Neuronen bzw. ihr Neurotransmitter Dopamin sind wichtig für die korrekte Ausführung von Bewegungen. Durch die Degeneration der dopaminergen Neuronen kommt es zu einem Mangel an Dopamin im Gehirn der Erkrankten, wodurch es zu den für M. Parkinson typischen Symptomen kommt (DODSON et al., 2016).

An M. Parkinson erkrankte Menschen leiden unter motorischen Symptomen wie Ruhetremor, Muskelsteifigkeit, Bradykinesie oder Hypokinesie und nicht motorischen Symptomen wie Depression oder Demenz. Bisher gibt es keine Heilung für Patienten mit M. Parkinson. Die Therapie richtet sich nach den vorhandenen Symptomen und schließt unter anderem eine Behandlung mit Levodopa, einer Vorstufe von Dopamin, Dopaminagonisten, welche die Dopaminrezeptoren stimulieren, oder Monoaminoxidase B-Inhibitoren, welche den Metabolismus von Dopamin verringern, ein (Übersichtsartikel: BALESTRINO und SCHAPIRA, 2019).

### 1.3 Morbus Alzheimer

M. Alzheimer ist die am häufigsten vorkommende neurodegenerative Erkrankung (Übersichtsartikel: RAMACHANDRAN et al., 2021). Ein großer Risikofaktor für diese Erkrankung ist ein hohes Alter. Ab einem Alter von 65 Jahren steigt die Anzahl an Patienten mit M. Alzheimer signifikant an. Mit weiter steigendem Alter wird das Risiko zu erkranken weiter erhöht (EBLY et al., 1994; OTT et al., 1995). Menschen, welche unter dieser Krankheit leiden, zeigen Symptome wie Desorientierung, fortschreitender Verlust der kognitiven Leistung und Gedächtnisverlust (Übersichtsartikel: RAMACHANDRAN et al., 2021).

Im Gehirn der Patienten kommt es zu einer Degeneration der cholinergen Neuronen. Der dieser Degeneration zu Grunde liegende Mechanismus ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist, dass mehrere schädliche Mechanismen ablaufen und daran beteiligt sind (Übersichtsartikel: HAMPEL et al., 2019). Durch die Degeneration der cholinergen Neuronen kommt es zu einem Mangel an Acetylcholin im Gehirn der Patienten und zu einer gestörten Weiterleitung der Signale, was zu den Symptomen führt (Übersichtsartikel: HAMPEL et al., 2019). Weiterhin kommt es in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten zu einer Akkumulation sogenannter seniler Plaques im Extrazellularraum (Übersichtsartikel: GOURAS et al., 2015). Diese bestehen aus Oligomeren des unlöslichen Amyloid- $\beta$ -Peptids (A $\beta$ -Peptid), welches durch einen alternativen Spaltungsvorgang durch die  $\beta$ -Sekretase aus dem *Amyloid Precursor Protein* gebildet wird. Durch eine anschließende Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase wird das A $\beta$ -Peptid frei und kann akkumulieren. Zusätzlich kommt es – möglicherweise unter anderem durch intrazelluläre A $\beta$ -Peptide – zur Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins (Übersichtsartikel: LAFERLA et al., 2007), welches wichtig ist für eine stabile Verlängerung der Mikrotubuli (QIANG et al., 2018). Durch eine Hyperphosphorylierung von Tau polymerisieren diese Peptide und bilden neurofibrilläre Bündel, welche sich in den Neuronen ablagern (ANDORFER et al., 2003). Da im Gehirn von Alzheimer-Patienten Oxidationsprodukte an den neurofibrillären Bündeln vorhanden sind (GOOD et al., 1996) und oxidativ geschädigte DNA auftritt, scheint auch oxidativer Stress an der Pathogenese von M. Alzheimer beteiligt zu sein (SMITH et al., 1996).

Bisher kann Alzheimer nicht geheilt werden. Die Behandlung erfolgt derzeit symptomatisch mit Donepezil, Rivastigmin, Galantamin oder Memantin (Übersichtsartikel: HAMPEL et al., 2019; Übersichtsartikel: RAMACHANDRAN et al., 2021). Während Memantin die Glutamatkonzentration im Gehirn verringern und so neuroprotektiv wirken soll (DANYSZ et al., 2000), hemmen Donepezil (DANYSZ et al., 2000), Rivastigmin (ENZ et al., 1991) und Galantamin (BICKEL et al., 1991) die Acetylcholinesterase (AChE) und verringern so den

---

Abbau von Acetylcholin, wodurch die Weiterleitung der ankommenden Signale besser funktioniert und die Symptome von M. Alzheimer reduziert werden (Übersichtsartikel: RODDA und CARTER, 2012).

## 1.4 Chorea Huntington

George Huntington beschrieb im Jahr 1872 erstmals die Krankheit, die später als Chorea Huntington bekannt wurde. Huntington beschrieb die Symptome dieser Krankheit mit „tanzähnlichen spasmischen Bewegungen“ (HUNTINGTON, 1872). Die Patienten leiden unter anderem an Hyperkinesien (Überbewegungen) der Extremitäten und Gesichtsmuskeln, Konzentrations- und Gedächtnisstörungen und Depression. Eine Heilung gibt es bisher nicht, die Patienten werden symptomatisch behandelt (Klinik für Neurologie und Neurophysiologie, Universitätsklinikum Freiburg).

Der Ursprung von C. Huntington liegt auf dem sogenannten Huntingtongen, welches für das Huntingtinprotein (Huntingtin) codiert. C. Huntington wird autosomal dominant vererbt. Am 5'-Ende des Genes liegen Trinucleotid-Wiederholungen der Basen CAG. Diese codieren für die Aminosäure Glutamin. Bei der nicht erkrankten Bevölkerung sind es zwischen elf und 34 Wiederholungen dieses Triplets. Bei Menschen, die an C. Huntington erkrankt sind, sind es mehr Triplet-Wiederholungen. Je länger die Wiederholungen, also je länger die Polyglutaminkette am N-Terminus des Huntingtins ist, desto früher entwickelt sich die Erkrankung in den Patienten (MACDONALD et al., 1993) und desto schwerwiegender ist ihr Verlauf (BECHER et al., 1998).

Im Gehirn von Patienten mit C. Huntington lassen sich intranukleäre Aggregationen des Huntingtins nachweisen. Diese Aggregationen finden sich vor allem im Neocortex und dem Striatum, wobei es bei C. Huntington vor allem im Striatum zu einem starken Verlust der Neuronen kommt. Es besteht eine Korrelation zwischen der Anzahl an Huntingtin-Aggregationen und der Länge der Polyglutaminketten bzw. der Schwere der Erkrankung (BECHER et al., 1998).

Huntingtin wird von der Effektorcaspase 3 spezifisch am N-terminalen Ende an der Aminosäureposition 513 geschnitten. Dies lässt den Schluss zu, dass das Schneiden des Huntingtins durch die Caspase 3 ein wichtiger Mechanismus für die Entstehung der Polyglutamin enthaltenden toxischen Fragmente des Huntingtins ist (WELLINGTON et al., 1998). Eine Behandlung mit Caspase-Inhibitoren verringert die Toxizität des Huntingtins und die Entstehung von Aggregaten in neuronalen sowie nicht neuronalen Zellen, welche durch Polyglutamin verlängertes Huntingtin exprimieren. Eine Verhinderung des Schneidens des

Huntingtins durch Caspasen könnte folglich von therapeutischer Bedeutung in der Behandlung von C. Huntington sein (WELLINGTON et al., 2000).

In den Gehirnen von Erkrankten konnte eine Erhöhung von Markern für oxidativen Stress wie Carbonylproteinen und eine vermehrte Aktivität antioxidativer Enzyme wie der SOD und Katalase festgestellt werden (SOROLLA et al., 2008). Zudem konnten HANDS et al. nachweisen, dass die Aggregation von PolyQ *in vitro* zur Produktion von ROS führt (HANDS et al., 2011). Der durch PolyQ hervorgerufene oxidative Stress steht in direktem Zusammenhang mit dem Zelltod (WYTTENBACH et al., 2002).

### **1.5 *Caenorhabditis elegans***

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) ist ein 1 mm langer und transparenter Rundwurm (BRENNER, 1973). Er kann leicht im Labor auf Agarplatten oder in Flüssigmedien kultiviert werden. Als Nahrungsquelle dienen ihm *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien (LAKOWSKI und HEKIMI, 1998). *C. elegans* ist ein sich selbst befruchtender Hermaphrodit (BRENNER, 1973) und besteht aus 959 Zellen (SULSTON et al., 1992). Vereinzelt treten auch Männchen auf, welche 1031 Zellen besitzen (Übersichtsartikel: HULME und WHITESIDES, 2011). Während seiner Entwicklung zum adulten Nematoden durchläuft *C. elegans* vier Larvenstadien (L1 bis L4) (SWANSON und RIDDLE, 1981; BYERLY et al., 1976). Die Entwicklung bis zur Geschlechtsreife dauert bei 20°C 64 bis 68 h. Unter diesen Bedingungen bekommt jeder Nematode etwa 280 Nachkommen (BYERLY et al., 1976). *C. elegans* besitzt ein Verdauungssystem, in dem auch der Großteil des Fremdstoffmetabolismus stattfindet, ein Reproduktionssystem und ein Nervensystem. Geschützt wird er durch die Hypodermis und die Oberhaut. Mit Hilfe des Pharynx pumpt *C. elegans* Bakterien in seinen Darm (ALTUN und HALL, 2009).

Das Nervensystem der Nematoden besteht aus 302 Zellen, was etwa einem Drittel der gesamten Zellen des Nematoden entspricht (SULSTON et al., 1992). *C. elegans* kann sowohl chemische als auch mechanische und thermische Stimulationen wahrnehmen (Übersichtsartikel: HULME und WHITESIDES, 2011). Er besitzt verschiedene Neurotransmitter wie Dopamin (SULSTON et al., 1975; SUO et al., 2002), Acetylcholin oder Serotonin und deren Transporter (DUERR et al., 2001).

Bereits im Jahre 1998 konnte die Gensequenz von *C. elegans* vollständig entschlüsselt werden (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Auch die Abstammung jeder einzelnen Körperzelle der Nematoden ist bekannt (SULSTON et al., 1992). Das Genom von *C. elegans* besitzt 20.444 protein-codierende Gene (Übersichtsartikel: CORSI et al., 2015),

von denen 60 bis 80% zu menschlichen Genen homolog sind (Übersichtsartikel: HULME und WHITESIDES, 2011). Auch viele Signalwege sind konserviert, was es möglich macht, an *C. elegans* molekulare Mechanismen von Substanzen oder Extrakten zu untersuchen (TULLET et al., 2017; HENDERSON und JOHNSON, 2001).

*C. elegans* kann leicht mutiert werden und eignet sich gut für genetische Studien (BRENNER, 1973). Zudem sind bereits viele mutierte oder transgene Stämme von *C. elegans* vorhanden, sodass einzelne Aspekte z. B. von neurodegenerativen Krankheiten wie M. Parkinson (NEGGA et al., 2012; CHEON et al., 2017), M. Alzheimer (LINK, 1995; LINK et al., 2003) und C. Huntington (FABER et al., 1999; LEE et al., 2017) in den Nematoden modelliert und untersucht werden können.

## **1.6 *C. elegans* als Modellorganismus bei M. Parkinson**

### **1.6.1 Dopamin und dopaminerge Neuronen in *C. elegans***

Da der Nematode *C. elegans* dopaminerge Neuronen und den Neurotransmitter Dopamin besitzt (SULSTON et al., 1975), kann er als Modellorganismus für Untersuchungen zu neuroprotektiv wirksamen Substanzen und deren Wirkmechanismen hinsichtlich M. Parkinson herangezogen werden (NASS et al., 2002; MASOUDI et al., 2014; CHEON et al., 2017; MANALO und MEDINA, 2018; HAQUE et al., 2020).

Hermaphroditische *C. elegans* besitzen immer acht dopaminerge Neuronen (SULSTON et al., 1975), vier davon im Kopfbereich zur Schnauze hin (CEP), zwei weitere direkt dahinter am Darmanfang (ADE) und zwei in ihrer Körpermitte (PDE) (LINTS und EMMONS, 1999). Männchen weisen zusätzlich sechs dopaminerge Neuronen im Schwanzbereich auf (SULSTON et al., 1975).

Die dopaminergen Neuronen der Nematoden sind mechanosensorischer Art und wichtig für die Wahrnehmung von Bakterien (SAWIN et al., 2000). Trifft *C. elegans* auf eine Nahrungsquelle (Bakterien) verlangsamen die Nematoden ihre Bewegungen im Vergleich zu Nematoden, welche sich auf einer Agarplatte ohne Bakterien befinden. Dieser Effekt wird als „*basal slowing response*“ bezeichnet. Durch die Verlangsamung der Bewegungen bei vorhandenem Futter kann die Nahrungsquelle besser ausgenutzt werden. Werden die dopaminergen Neuronen der Nematoden zerstört, zeigen diese keine Verlangsamung der Bewegungen in Anwesenheit von Bakterien mehr. Die dopaminergen Neuronen und Dopamin werden folglich benötigt, um die Bewegungen bei Anwesenheit von Bakterien zu verlangsamen (SAWIN et al., 2000).

Werden *C. elegans* mit Dopamin behandelt wird ihre Beweglichkeit inhibiert. Bei einer Dopaminkonzentration von 30 mM sind die Tiere vollständig paralysiert. Zudem legen die Nematoden durch eine Behandlung mit Dopamin weniger Eier (SCHAFER und KENYON, 1995). Weiterhin kommt es zu einer Degeneration der dopaminergen Neuronen, wenn in diesen vermehrt Dopamin gebildet wird (MANALO und MEDINA, 2018).

*C. elegans* besitzt kein Homolog zum humanen  $\alpha$ -Synuclein. Die Überexpression von humanem  $\alpha$ -Synuclein in transgenen *C. elegans* führt jedoch zu einer parkinsonähnlichen Symptomatik: Es kommt zu einer Degeneration der dopaminergen Neuronen und zu Bewegungsstörungen (LAKSO et al., 2003). Im Vergleich zu wildtypischen Nematoden ist die Beweglichkeit der Tiere mit einer Expression und Aggregation von humanem  $\alpha$ -Synuclein in den Muskelzellen stark eingeschränkt (DOHERTY et al., 2020). Die Expression von humanem  $\alpha$ -Synuclein in den dopaminergen Neuronen von *C. elegans* führt zu einem altersabhängigen Verlust dieser Neuronen, einhergehend mit einem Funktionsverlust und einem funktionellen Mangel an Dopamin (CAO et al., 2010).

Wie es auch bei Säugern der Fall ist, besitzt *C. elegans* Dopamintransporter in seinen dopaminergen Neuronen (CHASE et al., 2004; SUO et al., 2003; SUO et al., 2002). Auch die Tyrosin-Hydroxylase, welche Dopamin aus Tyrosin synthetisiert, wird exprimiert (CHEON et al., 2017; Nass et al., 2002). Durch neurotoxische Substanzen wie 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) können die dopaminergen Neuronen der Nematoden zerstört werden. Hierzu muss 6-OHDA zunächst in die Neuronen aufgenommen werden. Dies wird durch den Dopamintransporter DAT-1 bewerkstelligt. Da der DAT-1 Promotor in *C. elegans* ausschließlich in den dopaminergen Neuronen exprimiert wird, werden nicht-dopaminerge Neuronen wie serotonerge oder cholinerge Neuronen durch 6-OHDA nicht beschädigt (NASS et al., 2002). Der Wirkmechanismus von 6-OHDA ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt jedoch viele Theorien über die Wirkungsweise von 6-OHDA (VARESLIJA et al., 2020). Eine hohe Produktion von ROS durch 6-OHDA scheint unter anderem für die Toxizität verantwortlich zu sein (FREINBICHLER et al., 2020).

### **1.6.2 *C. elegans*-Stämme zum Modellieren von M. Parkinson**

***C. elegans* mit GFP in den dopaminergen Neuronen (BZ555):** In den Neuronen dieses Stammes wird ein GFP-Fusionsprotein exprimiert, welches an den Dopamintransporter DAT-1 gekoppelt vorliegt. Somit werden die dopaminergen Neuronen unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung sichtbar (NEGGA et al., 2012). Durch eine Behandlung der Nematoden mit 6-OHDA, welches über DAT-1 in die dopaminergen

Neuronen aufgenommen wird, kommt es zur Degeneration dieser Neuronen (NASS et al., 2002).

**C. elegans mit erhöhter Dopaminsynthese und GFP in den dopaminergen Neuronen (UA57):** Nematoden dieses Stammes überexprimieren das *cat-2* Gen (CHEON et al., 2017). CAT-2 ist ein Homolog der Tyrosinhydroxylase (CHEON et al., 2017; LINTS und EMMONS, 1999). Dementsprechend wird in den dopaminergen Neuronen vermehrt Dopamin aus Tyrosin synthetisiert (MANALO und MEDINA, 2018), was wiederum zur Degeneration dieser Neuronen führt (MANALO und MEDINA, 2018; MASOUDI et al., 2014). Diese Neurodegeneration wird im Laufe des Lebens der Nematoden stärker. Am Tag 7 des adulten Stadiums sind 40% der dopaminergen Neuronen degeneriert. Gleichzeitig sind die dopaminergen Neuronen dieses Stammes mit GFP markiert. So ist die Degeneration dieser Neuronen unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung sichtbar (CHEON et al., 2017).

## 1.7 C. elegans als Modellorganismus bei M. Alzheimer

### 1.7.1 Tau, A $\beta$ und die AChE in C. elegans

Da die Nematoden weder Tau (BRANDT et al., 2009) noch A $\beta$  (DAIGLE und LI, 1993) exprimieren, müssen für die Untersuchung dieses Aspektes von M. Alzheimer in *C. elegans* transgene Stämme genutzt werden (LINK, 1995; LINK et al., 2003; BRANDT et al., 2009). Diese exprimieren z. B. humanes Tau, welches in *C. elegans* an vielen für M. Alzheimer relevanten Stellen phosphoryliert wird und die räumliche Struktur wie bei an M. Alzheimer erkrankten Menschen verändert. Diese Nematoden zeigen ein fehlerhaftes Verhalten in Form von unkoordinierten Bewegungen. Nematoden, welche pseudohyperphosphoryliertes Tau exprimieren, leiden zusätzlich unter einer fehlerhaften Entwicklung der Motoneuronen (BRANDT et al., 2009).

Wird in den Muskelzellen der Nematoden zur Oligomerisierung neigendes humanes A $\beta$ <sub>1-42</sub> exprimiert, zeigt sich ein signifikanter Anstieg von Proteinoxidationsprodukten (Carbonylproteine) in den Nematoden. Sie leiden unter oxidativem Stress, was möglicherweise auf eine Toxizität der nicht-fibrillären A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Peptide hindeutet (DRAKE et al., 2003). Weiterhin kann nach einer muskulären Expression auch die Aggregation von humanen A $\beta$ -Peptiden<sub>1-42</sub> in *C. elegans* beobachtet werden (LINK, 1995; DRAKE et al., 2003). Die Expression von A $\beta$ <sub>1-42</sub> in den Muskelzellen der Nematoden führt zu einer fortschreitenden Paralyse (LINK, 1995; LINK et al., 2003). Nematoden, welche A $\beta$ <sub>1-42</sub> in ihren Neuronen exprimieren, zeigen ein fehlerhaftes chemotaktisches Verhalten (WU et al., 2006)

und bekommen aufgrund von Defekten in ihrem Reproduktionssystem weniger Nachkommen (GALLREIN et al., 2021).

Werden A $\beta$ <sub>1-42</sub> und Tau zusammen in den Neuronen der Nematoden exprimiert, zeigen sich neurodegenerative Effekte und Veränderungen im Verhalten der Nematoden, welche stärker sind als die Wirkungen eines der beiden Peptide allein (BENBOW et al., 2020).

*C. elegans* besitzt sowohl den Neurotransmitter Acetylcholin als auch den Acetylcholintransporter (DUERR et al., 2001) und die AChE (JOHNSON und RUSSELL, 1983), welche Acetylcholin im synaptischen Spalt zu Acetat und Cholin aufspaltet. Hierdurch wird die Wirkung von Acetylcholin beendet (Übersichtsartikel: THAPA et al., 2017). In den Nematoden übernimmt Acetylcholin verschiedene Funktionen: Es ist wichtig für die Lokomotion der Nematoden (MCMULLAN et al., 2005), für das Ablegen von Eiern (BANY et al., 2003) und das Pharynxpumpen (MCKAY et al., 2004).

Inhibitoren der AChE werden als Medikamente bei M. Alzheimer eingesetzt (Übersichtsartikel: RODDA und CARTER, 2012). In *C. elegans* kann untersucht werden, ob Substanzen die Aktivität der AChE hemmen können (OPPERMAN und CHANG, 1990; MANALO et al., 2017), denn dies kann mit einer Protektion vor M. Alzheimer im Zusammenhang stehen (MANALO et al., 2017). Als Positivkontrolle kann das Insektizid und Nematizid Aldicarb eingesetzt werden (OPPERMAN und CHANG, 1990).

### 1.7.2 *C. elegans*-Stämme zum Modellieren von M. Alzheimer

***C. elegans* mit temperaturabhängiger Expression von A $\beta$ <sub>1-42</sub> in den Muskelzellen (CL4176):** Dieser temperatursensitive Stamm wird bei 16°C gehalten. Ein Temperaturanstieg auf 25°C induziert die Expression von humanem A $\beta$ <sub>1-42</sub> in den Muskelzellen, was zu einer fortschreitenden Paralyse der Nematoden führt. Dieser Verlust der Beweglichkeit ist gut sichtbar und kann somit leicht untersucht werden (LINK et al., 2003). Nematoden dieses Stammes leiden durch die Expression des A $\beta$ -Peptids<sub>1-42</sub> zudem unter oxidativem Stress (DRAKE et al., 2003).

***C. elegans*, welche A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Peptide exprimieren (CL2006):** In diesem temperatursensitiven transgenen Stamm werden bei 20°C humane A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Peptide exprimiert, welche zu Plaques aggregieren (LINK, 1995; DRAKE et al., 2003) und über den Farbstoff Thioflavin-S sichtbar gemacht und anschließend gezählt werden können (LINK, 1995).

**Untersuchung der AChE-Aktivität in wildtypischen *C. elegans* (N2):** Der inhibitorische Effekt von Extrakten oder Substanzen auf die AChE kann im Lysat von wildtypischen

---

Nematoden untersucht werden, da dieses Enzym in den Nematoden vorhanden ist (JOHNSON und RUSSELL, 1983).

## 1.8 *C. elegans* als Modellorganismus bei C. Huntington

### 1.8.1 PolyQ und das Huntington Gen in *C. elegans*

Transgene *C. elegans*, welche zur Modellierung von C. Huntington eingesetzt werden können, exprimieren Huntingtinfragmente mit unterschiedlich langen Polyglutaminketten (FABER et al., 1999; PARKER et al., 2001; MORLEY et al., 2002; LEE et al., 2017) beispielsweise in den ASH-Neuronen der Nematoden (FABER et al., 1999).

Die ASH-Neuronen sind die Hauptnozizeptoren von *C. elegans*. Sie sind verantwortlich für die Vermeidung noxischer Stimuli. Zu diesen schädigenden Stimuli gehören unter anderem die Hyperosmolarität, Berührungen an der Schnauze des Nematoden, ein hoher Salzgehalt und flüchtige Chemikalien, gegen die der Nematode eine Aversion besitzt. Die beiden ASH-Neuronen befinden sich in der Schnauze des Nematoden (Wormatlas).

Durch Huntingtinfragmente mit einer Polyglutaminlänge von mindestens 35 bis 40 (Htn-Q35 bis Htn-Q40) bilden sich Aggregate in den Zellen der Nematoden. Hier scheint der Schwellenwert zu einer proteotoxischen Wirkung der Polyglutaminkette zu liegen (MORLEY et al., 2002). Werden in den ASH-Neuronen der Nematoden Huntingtinfragmente mit 2 (Htn-Q2) oder 23 (Htn-Q23) Glutamin exprimiert, findet keine Degeneration dieser Neuronen statt. Durch Htn-Q95 oder Htn-Q150 hingegen degenerieren diese Neuronen. Eine Expression von Htn-Q150 führt dazu, dass etwa 30% von acht Tage alten Nematoden defekte ASH-Neuronen aufweisen. Die negativen Effekte der Huntingtinfragmente werden stärker und beginnen früher, je länger die Polyglutaminkette ist (FABER et al., 1999). Zudem kommt es durch eine Expression von Htn-Q150 zu Proteinaggregaten in den Neuronen (FABER et al., 1999).

Werden wildtypische Nematoden an ihrer Schnauze berührt, bewegen sie sich rückwärts weg vom Stimulus. Werden die ASH-Neuronen jedoch mittels Laser zerstört, zeigen diese Nematoden eine deutliche Reduktion der Reaktionsfähigkeit auf diesen Stimulus (KAPLAN und HORVITZ, 1993). Auch eine Degeneration der ASH-Neuronen durch Htn-Q150 führt zu einer verringerten Reaktionsfähigkeit der Nematoden (FABER et al., 1999).

Werden Huntingtinfragmente in den Körperwandmuskelzellen von *C. elegans* exprimiert, können sich sichtbare Plaques im Kopfbereich der Nematoden bilden. Dies ist wiederum erst

bei längeren Polyglutaminketten der Fall. Eine Expression von Htn-Q15 gekoppelt an gelb fluoreszierendes Protein (YFP) zeigt eine diffuse Fluoreszenz, während eine Expression von Htn-Q128 mit YFP zu einer Akkumulation in Form von Plaques führt. Zusätzlich zeigen Nematoden, in deren Körperwandmuskelzellen Htn-Q128 exprimiert wird, langsamere Bewegungen und eine verkürzte Lebensspanne (LEE et al., 2017).

Sowohl die Tatsache, dass eine längere Polyglutaminkette ein früheres Einsetzen und einen schlimmeren Verlauf der Krankheit zur Folge hat, als auch die Proteinaggregationen in den Neuronen und die physiologischen Effekte, welche in *C. elegans* durch eine Expression von Htn-Q150 entstehen (FABER et al., 1999), sind bei Patienten mit C. Huntington vorhanden (MACDONALD et al., 1993; BECHER et al., 1998), was den Nematoden zum guten Modell für diese Erkrankung macht (FABER et al., 1999).

### **1.8.2 *C. elegans*-Stämme zum Modellieren von C. Huntington**

***C. elegans*, welche humanes Huntingtin und GFP in ASH-Neuronen exprimieren (HA659):** Dieser Stamm exprimiert N-terminale Fragmente des humanen Huntingtins gekoppelt an GFP in beiden ASH-Neuronen. Hierdurch kommt es zu einer von PolyQ (Q150) abhängigen Degeneration dieser Neuronen und zu einer verminderten Reaktionsfähigkeit der Nematoden auf noxische Stimuli (FABER et al., 1999).

***C. elegans*, die in Körperwandmuskelzellen Huntingtin-Aggregate bilden (EAK103):** Nematoden dieses Stammes exprimieren ein an YFP gekoppeltes Fragment des mutierten humanen Huntingtinproteins in den Muskelwandzellen. Exprimiert werden die ersten 513 N-terminalen Aminosäuren des Huntingtinproteins. Die Polyglutaminkette ist hier 128 Aminosäuren lang (Q128). Es entstehen PolyQ-Aggregate (Plaques), die unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung gezählt werden können (LEE et al., 2017).

## **1.9 Der Insulin/IGF-1 Signalweg in *C. elegans* und dessen Bedeutung für neurodegenerative Erkrankungen**

Viele Signalwege des Menschen sind stark konserviert und kommen auch in *C. elegans* vor. Ein Beispiel hierfür ist der Insulin/IGF-1 Signalweg (IIS) (HENDERSON und JOHNSON, 2001; LIN et al., 2001). Ist der IIS aktiviert, wird bei *C. elegans* der Transkriptionsfaktor DAF-16, welcher Homolog zu den humanen FOXO (Forkhead-Box-Protein O) Transkriptionsfaktoren ist (OGG et al., 1997), durch Phosphorylierung daran gehindert, in den Zellkern zu wandern (LIN et al., 2001). Zu Beginn des IIS steht der DAF-2 Rezeptor, der

das Homolog zum humanen IGF-1 R (*insulin-like growth factor-1 receptor*) ist. Wird dieser aktiviert, läuft eine Signalkaskade ab, welche schlussendlich dafür sorgt, dass DAF-16 phosphoryliert wird und somit im Cytosol verbleibt (LIN et al., 2001).

Wird *daf-2* abgeschaltet, kann DAF-16 in den Zellkern gelangen, es kommt zur vermehrten Expression von durch DAF-16 regulierten Genen, wie der Expression der antioxidativ wirksamen Enzyme SOD und Katalase (MURPHY et al., 2003). DAF-16 ist folglich wichtig für die Stressresistenz (LIN et al., 2001; MURPHY et al., 2003). Zusätzlich ist eine Aktivierung von DAF-16 mit Langlebigkeit assoziiert (LIN et al., 2001; COHEN et al., 2006).

Bei M. Parkinson ist der IIS ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt: Werden Nematoden, welche humanes  $\alpha$ -Synuclein gekoppelt an YFP in ihren Muskelzellen exprimieren, mit RNA Interferenz (RNAi) gegen *daf-2* behandelt, wird weniger  $\alpha$ -Synuclein akkumuliert. Behandelt man diese Nematoden mit RNAi gegen *daf-16*, steigt die Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein in den Muskelzellen an. DAF-16 hilft folglich die Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein zu verringern (HAQUE et al., 2020). Zudem scheint eine erhöhte Aktivität von FOXO im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* die Neuronen vor oxidativem Stress zu schützen (XIA et al., 2020). FOXO ist für die Entwicklung von dopaminergen Neuronen von *Drosophila melanogaster* wichtig und schützt diese vor Alterungsprozessen, verschiedenen Stressoren und Neurodegeneration (TAS et al., 2018).

Zusätzlich hat der IIS auch einen Einfluss auf M. Alzheimer: Wird der IIS von transgenen *C. elegans* durch RNAi gegen *daf-2* herunterreguliert, ist die Toxizität von A $\beta$ -Peptiden deutlich reduziert. Hierfür ist eine Aktivität des Transkriptionsfaktors DAF-16 wichtig (COHEN et al., 2006). Auch in Mäusen zeigt eine Reduktion des IIS eine Verringerung der Neurodegeneration und der Toxizität von A $\beta$  (COHEN et al., 2009). Der Alterungsprozess scheint folglich zur Aggregation von A $\beta$  beizutragen (COHEN et al., 2006). *In vitro* reduziert eine erhöhte Aktivität von FOXO1 die Entstehung von A $\beta$  und die Phosphorylierung von Tau (ZHANG et al., 2020).

Bezogen auf C. Huntington entdeckten Tourette et al. eine verringerte Aktivität des Transkriptionsfaktors FOXO in Neuronen, in denen PolyQ exprimiert wird. Dies ist sowohl im Mausmodell (FOXO3a) als auch in *C. elegans* (FOXO-Homolog DAF-16) der Fall (TOURETTE et al., 2014). Zudem ist DAF-16/FOXO in Nematoden und Mäusen mit PolyQ-Expression in den Neuronen essentiell für die neuroprotektiven Eigenschaften verschiedener Substanzen wie Resveratrol oder Isoquercitrin (FARINA et al., 2017). Folglich könnte eine Therapie, bei der die Aktivität von DAF-16/FOXO erhöht wird, den pathologischen Prozess von C. Huntigton verzögern (TOURETTE et al., 2014).

Da eine Aktivierung von FOXO sowohl den oxidativen Stress als auch den Verlust von Neuronen verringern kann (Übersichtsartikel: OLI et al., 2021), könnte dieser Transkriptionsfaktor ein möglicher Ansatzpunkt für therapeutische Ansätze gegen M. Parkinson, M. Alzheimer und C. Huntington darstellen.

## 1.10 Pflanzliche Extrakte und deren Inhaltsstoffe

### 1.10.1 *Olea europaea*

Olivenblätter wurden in der traditionellen Medizin der mediterranen Regionen verwendet, sind jedoch das größte ungenutzte Nebenprodukt der Herstellung von Olivenöl (Übersichtsartikel: DIFONZO et al., 2020). Ein Extrakt aus den Blättern des Olivenbaumes (*Olea europaea*, *O. europaea*) ist in der Lage den Blutdruck zu senken (SUSALIT et al., 2011) und die Insulinsensitivität von übergewichtigen Männern zu verbessern (DE BOCK et al., 2013). Zudem zeigt ein Olivenblattextrakt (OBE) antioxidative Effekte in *C. elegans*: Er ist in der Lage die Aktivität antioxidativ wirkender Enzyme wie der SOD und der Katalase zu erhöhen (LUO et al., 2019). Auch in einem Rattenmodell für M. Parkinson konnte eine neuroprotektive Wirkung eines OBE gezeigt werden (SARBISHEGI et al., 2018).

Olivenblätter sind eine gute Quelle für die Polyphenole Oleuropein (OP), Hydroxytyrosol (3-HT) und Tyrosol (TYR) (BENINCASA et al., 2019; Übersichtsartikel DIFONZO et al., 2020) und für das Triterpen Oleanolsäure (OS) (CLÁUDIO et al., 2018). Wie auch der Extrakt, zeigt Oleuropein (OP) starke antioxidative Effekte *in vivo* und ist in der Lage, die Aktivität der SOD und Katalase in *C. elegans* zu erhöhen. Zusätzlich verlängert OP die Lebensspanne der Nematoden (FENG et al., 2021). OP verringert die Bildung von A $\beta$ -Oligomeren (KOSTOMOIRI et al., 2013) und reduziert die Neurodegeneration in einem zellulären Modell für M. Parkinson (ELMAZOGLU et al., 2018).

Durch die Hydrolyse von OP entsteht 3-HT (SANTOS et al., 2012), welches in *C. elegans* ebenfalls lebensverlängernd wirkt und neuroprotektiv in Parkinsonmodellen ist (BRUNETTI et al., 2020; DI ROSA et al., 2020). Weiterhin wirkt 3-HT antioxidativ, moduliert Signalwege, welche zur Aktivierung von antioxidativen Enzymen führen (MARTÍN et al., 2010), und ist immunmodulierend, sodass es zur Allergieprävention eingesetzt werden kann (BONURA et al., 2016). Zusätzlich scheint 3-HT gegen Alzheimer (PENG et al., 2016) und Parkinson zu helfen (PEREZ-BARRON et al., 2020). Auch TYR zeigt neuroprotektive Eigenschaften bei M. Alzheimer (TANIGUCHI et al., 2019) und M. Parkinson (GARCIA-MORENO et al., 2019) und

verbessert die Lebensspanne und die Stressresistenz von *C. elegans* (CANUELO et al., 2012).

Die OS zeigt prominente antioxidative (YIN und CHAN, 2007; TSAI und YIN, 2008) und anti-inflammatorische Effekte (TSAI und YIN, 2008), scheint gegen Krebs zu helfen (LIU et al., 2021) und neuroprotektive Eigenschaften zu besitzen (MABANDLA, et al., 2015; GUO et al., 2020).

### **1.10.2 *Crocus sativus***

Safran (*Crocus sativus*, *C. sativus*) wird vor allem in Iran angebaut, wird als Gewürz genutzt und wurde schon in der antiken persischen Medizin eingesetzt (Übersichtsartikel: MOSHIRI et al., 2014). Safran zeigt antidepressive und angstlösende Wirkungen in einer doppelblinden, randomisierten und Placebo-kontrollierten Studie (MAZIDI et al., 2016). Er ist in der Lage die Aggregation von A $\beta$  und die Bildung von A $\beta$ -Fibrillen *in vitro* zu inhibieren (PAPANDREOU et al., 2006). Weiterhin besitzt Safran immunmodulierende (KIANBAKHT und GHAZAVI, 2011) und antioxidative Eigenschaften (PAPANDREOU et al., 2006). Während der Safranextrakt in zellfreien Systemen vernachlässigbare antioxidative Wirkungen zeigt, besitzt er erhebliche antioxidative Eigenschaften in Zellen (ORDOUDI et al., 2009).

Aktive Inhaltsstoffe von Safran sind unter anderem das Carotinoid Crocin und sein Aglycon Crocetin (Übersichtsartikel: MOSHIRI et al., 2014), Safranal, Rutin und Apigenin (MYKHEILENKO et al., 2021). Aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften zeigt Crocin neuroprotektive Wirkungen in Zellen und Mäusen mit M. Alzheimer (WANG et al., 2019). Zusätzlich besitzt Crocin im Bezug auf M. Parkinson neuroprotektive Eigenschaften in Ratten (SALAMA et al., 2020) und Mäusen (HAERI et al., 2019). Auch Crocetin zeigt schützende Effekte gegen M. Alzheimer (WANI et al., 2021) und M. Parkinson (DONG et al., 2020).

### **1.10.3 *Gynostemma pentaphyllum***

*Gynostemma pentaphyllum* (*G. pentaphyllum*) wird auch Jiaogulan genannt und in der traditionellen chinesischen Medizin eingesetzt (Übersichtsartikel: LI et al., 2019). Diese Pflanze scheint bei verschiedenen Krankheiten zum Einsatz kommen zu können: Sie vermittelt antidiabetische Effekte in Patienten mit Typ II Diabetes (HUYEN et al., 2010; HUYEN et al., 2012), zeigt neuroprotektive Wirkungen in einem Rattenmodell für M. Parkinson (CHOI et al., 2010) und besitzt zudem antioxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften (XIE et al., 2010).

Die Hauptinhaltsstoffe von Jiaogulan sind die Gypenoside, welche *in vitro* neuroprotektiv wirken, die Menge an ROS in neuronalen Zellen reduzieren und die Aktivität antioxidativer Enzyme erhöhen (WANG et al., 2010). Zusätzlich zeigen sie ebenfalls antidiabetische Effekte (LIU et al., 2017) und können möglicherweise auch gegen verschiedene Krebsarten eingesetzt werden (YAN et al., 2014; SHI et al., 2015). Inzwischen sind mehr als 170 Gypenoside entdeckt worden (Übersichtsartikel: LI et al., 2019).

#### **1.10.4 *Polygonum multiflorum***

Extrakte aus der Wurzel von *Polygonum multiflorum* (*P. multiflorum*), dem vielblütigen Knöterich, werden schon lange in der Traditionellen Chinesischen Medizin eingesetzt (WANG et al., 2017a). *P. multiflorum* bzw. seine Inhaltsstoffe besitzen anti-inflammatorische (JIANG et al., 2017; PARK et al., 2017), antioxidative (CHEN et al., 1999; BÜCHTER et al., 2015; JIANG et al., 2017; SAIER et al., 2018) und lebensverlängernde Wirkungen (BÜCHTER et al., 2015; SAIER et al., 2018) sowie Effekte gegen Krebs (ZHU et al., 2017) und Alzheimer (ZHANG et al., 2013; UM et al., 2006).

Zu den Inhaltsstoffen von *P. multiflorum* gehören Stilbene wie 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilben-2-O- $\beta$ -D-glucosid (TSG) und Resveratrol, Flavonoide wie Quercetin, Anthrachinone wie Emodin und Rhein sowie Polysaccharide, wobei TSG einer der Hauptwirkstoffe zu sein scheint (WANG et al., 2017a). TSG, ein glykosyliertes Resveratrol-derivat (WANG et al., 2017a), wirkt stark antioxidativ, schützt vor thermalem Stress, verringert die Lipofuscin-Akkumulation und verlängert die Lebensspanne von *C. elegans* (BÜCHTER et al., 2015). Auch Resveratrol und Quercetin besitzen potente lebensverlängernde Effekte im Nematoden *C. elegans* (BÜCHTER et al., 2015), wobei deren Gehalte in den Extrakten meist gering sind (LI et al., 2017). Emodin besitzt ebenfalls antioxidative Effekte in *C. elegans* und kann dessen Lebensspanne verlängern (ZHAO et al., 2017b).

#### **1.10.5 *Rosmarinus officinalis***

Die Pflanze *Rosmarinus officinalis* (*R. officinalis*, Rosmarin) kommt aus der mediterranen Region und wird häufig als Würzmittel genutzt. Zudem gilt Rosmarin als medizinische Pflanze und besitzt viele protektive Eigenschaften (Übersichtsartikel: DE OLIVEIRA et al., 2019). Rosmarinextrakte zeigen vielfältige Effekte in verschiedenen Modellorganismen: Es wird von anti-inflammatorischen (RAHBARDAR et al., 2017; GUO et al., 2018) und antioxidativen Effekten (BAKIREL et al., 2008; SAIER et al., 2020) berichtet. Zudem scheint Rosmarin aufgrund von antihyperglykämischen Effekten gegen Diabetes zu helfen (BAKIREL

et al., 2008) und könnte unterstützend in der Krebstherapie eingesetzt werden (YESIL-CELIK TAS et al., 2010).

Ein Inhaltsstoff dieser Pflanze ist die Rosmarinsäure (Übersichtsartikel: DE OLIVEIRA et al., 2019), welche antioxidativ (TORRE et al., 2019; SAIER et al., 2020) und anti-inflammatorisch wirkt (RAHBARDAR et al., 2017), und wie die Ursolsäure – ein weiterer Inhaltsstoff des Rosmarins – die A $\beta$ -induzierte Toxizität in Mäusen verringert (MIRZA et al., 2021). Weitere Inhaltsstoffe sind unter anderem Carnosol, Oleanolsäure und Carnosolsäure (Übersichtsartikel: DE OLIVEIRA et al., 2019). Letztere zeigt neuroprotektive Effekte in einem Rattenmodell für Parkinson (WU et al., 2015).

### **1.10.6 *Ziziphus jujuba***

*Ziziphus jujuba* (*Z. Jujuba*, Chinesische Dattel) ist eine Pflanze, deren Frucht schon seit langer Zeit gegessen und in China als Medizin verwendet wird (Übersichtsartikel: LU et al., 2021). Die Früchte besitzen antioxidative Wirkungen (GHIMIRE und KIM, 2017; GOSWAMI et al., 2019). Zusätzlich kann ein Extrakt aus diesen Früchten die Genotoxizität von Methylmethansulfonsäure und Wasserstoffperoxid verringern (GOSWAMI et al., 2019) sowie die Lebensspanne und Stressresistenz von *Drosophila* verbessern (GHIMIRE und KIM, 2017). Es sind auch neuroprotektive Wirkungen der Frucht der chinesischen Dattel bekannt, wobei diese zumindest teilweise auf die antioxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften des Extraktes zurückzuführen sind (DJEUZONG, et al., 2021).

Die Früchte enthalten viele protektiv wirkende Substanzen, wie die Saponine Jujubosid A und B, Quercetin und Apigenin (KHAN et al., 2020). Während Jujubosid A in einem Mausmodell für Alzheimer neuroprotektive Eigenschaften aufweist (ZHANG et al., 2018b), zeigt Jujubosid B eine inhibitorische Wirkung auf die Thrombozytenaggregation (SEO et al., 2013) und Effekte gegen Krebs (XU et al., 2014). Flavonoide der *Z. jujuba* sind in der Lage anti-inflammatorische Wirkungen zu erzielen, oxidativen Stress zu verringern und die Aktivität antioxidativer Enzyme zu erhöhen (HUANG et al., 2017).

## 2 Zielsetzung

Eine kausale Therapie der neurodegenerativen Krankheiten M. Parkinson, M. Alzheimer und C. Huntington ist noch nicht gefunden worden. Bisher erfolgt nur eine symptomatische Behandlung dieser Erkrankungen. Als mögliche Ursache werden bei diesen Krankheiten unter anderem prooxidative Effekte sowie ROS diskutiert. Pflanzliche Extrakte besitzen vielfältige positive Wirkungen: Sie können z. B. antioxidativ wirken, die Stressresistenz erhöhen oder Krankheiten modulieren. Auch von neuroprotektiven Effekten durch pflanzliche Extrakte, z. B. durch den indischen Ginseng (Übersichtsartikel: DAR et al., 2020), wird berichtet. Der Nematode *C. elegans* kann gut als Modellorganismus für die Untersuchung neurodegenerativer Erkrankungen genutzt werden.

Wenn ein Extrakt eine antioxidative Wirkung besitzt oder die Resistenz der Nematoden gegenüber thermalem oder oxidativem Stress erhöht, könnte er auch zur Prävention oder Therapie bei neurodegenerativen Krankheiten eingesetzt werden. Der Einfluss von verschiedenen pflanzlichen Extrakten auf die neurodegenerativen Erkrankungen M. Parkinson, M. Alzheimer und C. Huntington soll daher am Modellorganismus *C. elegans* untersucht werden. Vielversprechende Kandidaten hierfür sind Extrakte aus Olivenblättern, Safran, Jiaogulan, *P. multiflorum*, Rosmarin und den Früchten der chinesischen Dattel.

Zunächst soll das antioxidative Potential der Extrakte sowie deren Einfluss auf die Resistenz der Tiere gegenüber oxidativem und thermalem Stress untersucht werden. Anschließend soll auch die zelluläre Lokalisation und die Beteiligung des Transkriptionsfaktors DAF-16 an etwaigen antioxidativen und die Stressresistenz erhöhenden Wirkungen der Extrakte bestimmt werden. So soll ein Wirkmechanismus untersucht werden, über den möglicherweise auch neuroprotektive Wirkungen vermittelt werden.

Verschiedene Aspekte der neurodegenerativen Erkrankungen werden in transgenen Nematodenstämmen modelliert. Die neuroprotektiven Eigenschaften der pflanzlichen Extrakte hinsichtlich der dopaminergen Neuronen der Nematoden sollen bestimmt werden. Zudem werden die Wirkungen der Extrakte auf die Toxizität und Akkumulation von A $\beta$  und deren Potential, die AChE zu inhibieren, gemessen. Anschließend werden die Effekte der Extrakte auf die Akkumulation von PolyQ-Plaques, auf eine PolyQ-bedingte Neurodegeneration und die hierdurch beeinträchtigte Reaktionsfähigkeit der Nematoden untersucht.

Weiterhin sollen einige der Inhaltsstoffe des OBE – OP, OS, 3-HT und TYR – ebenfalls auf neuroprotektive und antioxidative Wirkungen hin untersucht werden, um mögliche Hauptwirkstoffe dieses Extraktes zu identifizieren.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 C. elegans-Stämme

**Tabelle 1: Verwendete C. elegans-Stämme.**

Stamm	Beschreibung	Genotyp	Beschrieben von
BZ555	[ <i>dat-1p::GFP</i> ]	<i>egls1</i> .	NEGGA et al., 2012
CF1038	DAF-16-Deletionsmutante	<i>daf-16 (mu86) I</i> .	LIN et al., 2001
CL2006	[ <i>pCL12(unc-54/human Abeta peptide 1-42 minigene) + rol-6(su1006)</i> ]	<i>dvl2</i> .	LINK, 1995
CL4176	[ <i>myo-3p::A-Beta (1-42)::let-851 3'UTR) + rol-6(su1006)</i> ]	<i>smg-1 (cc546) I</i> ; <i>dvl27 X</i> .	LINK et al., 2003
EAK103	[ <i>unc-45::Htt513(Q128)::YFP::unc-45 3'UTR</i> ]	<i>eeels2</i> .	LEE et al., 2017
HA659	[ <i>osm-10p::GFP + osm-10p::HtnQ150 + dpy-20(+)</i> ]	<i>rtls11 V</i> .	FABER et al., 1999
N2	Wildtyp var. Bristol	Wildtyp	BRENNER, 1974
TJ356	[ <i>daf-16p::daf-16a/b::GFP + rol-6(su1006)</i> ]	<i>zls356 IV</i> .	HENDERSON und JOHNSON, 2001
UA57	[ <i>dat-1p::GFP + dat-1p::CAT-2</i> ]	<i>bals4</i> .	CHEON et al., 2017

#### 3.1.2 Bakterienstämme

**Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme.**

Stamm	Beschreibung
OP50	<i>Escherichia coli (E. coli)</i> , Uracil auxotroph
OP50-1	<i>Escherichia coli (E. Coli)</i> , streptomycinresistent

#### 3.1.3 Eingesetzte Extrakte und Substanzen

**Olivenblattextrakt (OBE).** Der Extrakt aus den Blättern des Olivenbaumes wird von der Kaesler Nutrition GmbH zur Verfügung gestellt. Er wird in DMSO mit Konzentrationen von

25 mg/ml und 250 mg/ml gelöst. Die in den Experimenten verwendete Arbeitskonzentration beträgt 1 mg/ml.

**Oleuropein (OP).** Diese Substanz wird von Sigma-Aldrich bezogen und wird mit einer Konzentration von 25 mM in DMSO gelöst. Die in den Experimenten eingesetzte Konzentration beträgt 100  $\mu$ M.

**Oleanolsäure (OS).** Auch die Oleanolsäure wird von Sigma-Aldrich bezogen und wird in DMSO gelöst. Die Konzentration der Stocklösung beträgt 6,25 mM, während die in den Experimenten eingesetzte Arbeitskonzentration 25  $\mu$ M beträgt. Eine höhere Konzentration ist aufgrund der schlechten Löslichkeit der OS in DMSO nicht möglich.

**3-Hydroxytyrosol (3-HT) und Tyrosol (TYR).** Die Einzelsubstanzen 3-Hydroxytyrosol und Tyrosol werden ebenfalls von Sigma-Aldrich bezogen. Gelöst werden 3-HT und TYR in BSA-AT mit einer Konzentration von 30 mM. Die in den Experimenten genutzten Arbeitskonzentrationen betragen 100  $\mu$ M und 500  $\mu$ M.

***Crocus sativus*.** Der Extrakt aus der Pflanze *C. sativus* (CSE) wird von Buckton Scott Deutschland GmbH bezogen. Dieser Extrakt wird mit einer Konzentration von 25 mg/ml und 250 mg/ml in DMSO gelöst, wobei die in den Experimenten verwendeten Konzentrationen 0,1 mg/ml und 1 mg/ml betragen.

***Gynostemma pentaphyllum* (Jiaogulan).** Der Jiaogulanextrakt (JGE) wird von der W & R Bioline GmbH bezogen und unverändert genutzt. Als Extraktionsmittel dienen Ethanol und Wasser. Der Extrakt ist auf 98% Gypenoside standardisiert. Er wird in DMSO mit einer Konzentration von 25 mg/ml und 250 mg/ml gelöst. Die in den Experimenten verwendeten Arbeitskonzentrationen betragen 0,1 mg/ml und 1 mg/ml.

***Polygonum multiflorum*.** Der Trockenextrakt aus der Wurzel von *P. multiflorum* (PME) wird von Herba Sinica Hilsdorf GmbH bezogen. Das Auszugsmittel dieses Extraktes ist Wasser. Als Hilfsstoff ist Maltodextrin enthalten, wobei dessen Gehalt im Extrakt unbekannt ist. Der Extrakt wird in DMSO mit einer Konzentration von 25 mg/ml und 250 mg/ml gelöst. Die in den Experimenten verwendeten Arbeitskonzentrationen betragen 0,1 mg/ml und 1 mg/ml.

**Rosmarinextrakt (wässrig).** Das Rosmarinpulver wird von der Kaesler Nutrition GmbH zur Verfügung gestellt. Zunächst findet eine Extraktion des Rosmarinpulvers statt. Hierzu werden 7,5 g des Pulvers mit 150 g dH<sub>2</sub>O für 1 h gekocht. Um das Verdampfen zu verhindern wird ein Rückflusskühler eingesetzt. Anschließend wird der Extrakt (REW) filtriert und getrocknet. Gelöst wird der entstandene wässrige Extrakt in DMSO in den Konzentrationen 25 mg/ml

und 250 mg/ml. Die in den Experimenten eingesetzten Konzentrationen betragen 0,1 mg/ml und 1 mg/ml.

**Ziziphus jujuba.** Der Extrakt aus der Frucht der chinesischen Dattel (ZJE) wird von der W & R Bioline GmbH bezogen und ohne weitere Verarbeitung benutzt. Die Extraktionsmittel sind Wasser und Ethanol. Der Extrakt wird in DMSO mit einer Konzentration von 25 mg/ml und 250 mg/ml gelöst. Die in den Experimenten verwendeten Arbeitskonzentrationen betragen 0,1 mg/ml und 1 mg/ml.

### 3.1.4 Chemikalien

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller.**

Chemikalie	Hersteller
Acetylthiocholiniodid	Roth, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	VWR, USA
Aldicarb	Sigma-Aldrich, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz	Merck, Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, USA
2, 2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS)	Sigma-Aldrich, USA
Bacto Agar	BD, USA
Bacto Pepton	BD, USA
Bacto Trypton	BD, USA
Bacto Yeast Extract	BD, USA
Bio-Rad (Bradford) Reagenz	Bio-Rad, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Deutschland
Cholesterol	Sigma-Aldrich, USA
Citronensäure-Monohydrat	Sigma-Aldrich, USA
<i>Crocus sativus</i> Extrakt	Buckton Scott Deutschland GmbH, Deutschland
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Sigma-Aldrich, USA
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H <sub>2</sub> DCF-DA)	Sigma-Aldrich, USA
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Deutschland
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB)	Roth, Deutschland

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol absolut 99%	VWR, USA
Ethanol vergällt 99%	AppliChem, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure	AppliChem, Deutschland
5-Fluoro-2'-deoxyuridin (FUDR)	Sigma-Aldrich, USA
Glycerin	VWR, USA
(±)-6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox)	Sigma-Aldrich, USA
3-Hydroxytyrosol	Sigma-Aldrich, Deutschland
Jiao Gulan Extrakt	W & R Bioline GmbH, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Deutschland
Kaliumcitrat	Sigma-Aldrich, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Koffein	Sigma-Aldrich, USA
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Sigma-Aldrich, USA
Levamisol-Hypochlorid	AppliChem, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Deutschland
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Sigma-Aldrich, USA
β-Mercaptoethanol	Merck, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, USA
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Deutschland
Natriumhypochloritlösung 13%	Bernd Kraft, Deutschland
6-Hydroxydopamin (6-OHDA) (Hydrobromid)	Cayman Chemical Company, USA
Olivenblattextrakt	Kaesler Nutrition GmbH, Deutschland
Oleanolsäure	Sigma-Aldrich, USA
Oleuropein	Sigma-Aldrich, USA
oxidiertes 2',7'- Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat	Sigma-Aldrich, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Deutschland
Paraquat	Acros Organics, USA
Pepton (Soja)	Fluka, USA
<i>Polygoni Multiflori</i> Radix	Herba Sinica Hilsdorf GmbH, Deutschland
Rosmarinpulver	Kaesler Nutrition GmbH, Deutschland
Salzsäure 37%, rauchend	Roth, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
Streptomycinsulfat	AppliChem, Deutschland
SYTOX® Green Nucleic Acid Stain (Sytox) (5 mM in DMSO)	Thermo Fisher Scientific, USA
Tetracyclin	AppliChem, Deutschland
Thioflavin-S	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tri-Kaliumcitrat-Monohydrat	Merck, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan	VWR, USA
Triton X-100	AppliChem, Deutschland
Tween 20	Merck, Deutschland
Tyrosol	Sigma-Aldrich, USA
Zinksulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich, USA
<i>Ziziphus jujuba</i> Extrakt	W & R Bioline GmbH, Deutschland

### 3.1.5 Medien und Lösungen

**Tabelle 4: Verwendete Medien und Lösungen und ihre Zusammensetzung.**

Medium / Lösung	Zusammensetzung
ABTS-Lösung 14 mM	26,9 mg (MG = 548,7 g/mol) 3,5 ml dH <sub>2</sub> O
Acetylthiocholiniodid 75 mM	43,1 mg (MG = 289,18 g/mol) 2 ml 50 mM Phosphatpuffer
Aldicarb 100 mM	100 mg (MG = 190,26 g/mol) 5,26 ml DMSO
Aldicarb 25 mM	50 µl Aldicarb 100mM ad 200 µl DMSO
Ampicillin 100 mg/ml	1 g (MG = 371,4 g/mol) 10 ml dH <sub>2</sub> O → sterilfiltriert
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 4,9 mM	3,9 mg (MG = 228,18 g/mol) 3,5 ml dH <sub>2</sub> O
Ascorbinsäure 200 mM	70,45 mg (MG = 176,13 g/mol) 2 ml dH <sub>2</sub> O
Bio-Rad (Bradford) Reagenz 1:5	2 ml Bradford Reagenz 10 ml dH <sub>2</sub> O
Bleiche-Lösung	50% Natriumhydroxid-Lösung 5 M 50% Natriumhypochlorit-Lösung 13%
BSA-Ampicillin-Tetracyclin-Mix	10 g BSA 100 ml NGM <sub>k</sub> → gelöst

Medium / Lösung	Zusammensetzung
BSA in Phosphatpuffer 1 mg/ml	1 ml Ampicillin (100 mg/ml) 2,5 ml Tetracyclin (5 mg/ml) → steril filtriert
DABCO-Lösung	10 mg ad 10 ml Phosphatpuffer (75 mM)
DTNB 10 mM	2,5 g DABCO 90 ml Glycerin 10 ml PBS (10x)
Ethanol 50%	7,9 mg (MW = 396,34 g/mol) 2 ml 50 mM Phosphatpuffer
Ethanol 70%	50 ml Ethanol (absolut, vergällt) 50 ml dH <sub>2</sub> O
Fixierlösung (4% PFA in PBS)	700 ml Ethanol (absolut, vergällt) 300 ml dH <sub>2</sub> O
FUDR 600 µM	80 ml PBS (1x) → auf 60°C erwärmern 4 g PFA → Natriumhydroxid (2M) zur Klärung der Lösungen → abkühlen lassen und mit PBS (1x) auf 100 ml auffüllen → pH 6,9; Lagerung bei 4°C
H <sub>2</sub> DCF-DA 100 mM	7,38 mg (MG = 246,19 g/mol) ad 50 ml NGM <sub>k</sub> → steril filtriert
H <sub>2</sub> DCF-DA 250 µM	4,87 mg (MG = 487,29 g/mol) ad 100 µl DMSO
3-HT 30 mM	1 µl H <sub>2</sub> DCF-DA 100 mM ad 400 µl M9
Kaliumcitrat 1 M	4,6 mg (MW = 154,165 g/mol) 1 ml BSA-AT (für Inkubationsmedien) oder 1 ml Phosphatpuffer (für TEAC)
Koffein 156,25 mM	20 g Citronensäure-Monohydrat 293,5 g Tri-Caliumcitrat-Monohydrat ad 1 l dH <sub>2</sub> O → autoklaviert
LB-Agar	60,7 mg (MG = 194,19 g/mol) 2 ml NGM <sub>k</sub>
LB-Medium	10 g Bacto Trypton 5 g Bacto Yeast Extract 5 g Natriumchlorid 20 g Bacto Agar ad 1 l dH <sub>2</sub> O → autoklaviert

Medium / Lösung	Zusammensetzung
	5 g Natriumchlorid ad 1 l dH <sub>2</sub> O → autoklaviert
Levamisol 100 mM	48,15 mg (MG = 240,76 g/mol) ad 2 ml steriles dH <sub>2</sub> O
Levamisol 20 mM	400 µl Levamisol 100 mM ad 2 ml steriles dH <sub>2</sub> O
Lösung A	0,5 g Cholesterol ad 100 ml Ethanol absolut 99%
Lösung B	36,8 g Calciumchlorid-Dihydrat ad 250 ml dH <sub>2</sub> O → autoklaviert
Lösung C	61,6 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat ad 250 ml dH <sub>2</sub> O → autoklaviert
Lösung D	108,3 g Kaliumdihydrogenphosphat 35,6 g Dikaliumhydrogenphosphat ad 1 l dH <sub>2</sub> O → pH 6 eingestellt → autoklaviert
M9-Puffer	6 g Dinatriumhydrogenphosphat 3 g Kaliumdihydrogenphosphat 5 g Natriumchlorid 0,25 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat ad 1 l dH <sub>2</sub> O → autoklaviert
Natriumhydroxid-Lösung 2 M	4 g (MG = 39,99 g/mol) ad 50 ml dH <sub>2</sub> O
Natriumhydroxid-Lösung 5 M	10 g (MG = 39,99 g/mol) ad 50 ml dH <sub>2</sub> O
NGM	3 g Natriumchlorid 2,5 g Bacto-Pepton 975 ml dH <sub>2</sub> O → autoklaviert
NGM <sub>k</sub>	50 µl Lösung A 25 µl Lösung B 50 µl Lösung C 1250 µl Lösung D ad 50 ml NGM
NGM <sub>k</sub> -Agar	3 g Natriumchlorid 2,5 g Pepton (Soja) 20 g Bacto Agar 975 ml dH <sub>2</sub> O → autoklaviert → nach Abkühlen auf ca. 50°C Zugabe von:

Medium / Lösung	Zusammensetzung
	1 ml Lösung A 0,5 ml Lösung B 1 ml Lösung C 25 ml Lösung D
6-OHDA (Hydrobromid) 183,9 mM	6,9 mg (MG = 250,1 g/mol) 150 µl Ascorbinsäurelösung (200 mM)
Oleanolsäure 6,25 mM	4,28 mg (MW = 456,7 g/mol) 1 ml DMSO
Oleuropein 25 mM	10 mg (MW = 540,5 g/mol) 739 µl DMSO
Paraquat 1 M	771,5 mg (MG = 257,16 g/mol) ad 3 ml S-Basal
PBS (10x)	39,7 g Natriumchlorid 0,97 g Kaliumchlorid 7,21 g Natriumhydrogenphosphat 1,02 g Dikaliumhydrogenphosphat ad 500 ml dH <sub>2</sub> O → pH 7 eingestellt → autoklaviert
PBS (1x)	5 ml PBS (10x) ad 50 ml dH <sub>2</sub> O
PBST (10x)	50 ml PBS (10x) 50 µl Tween 20
PBST (1x)	5 ml PBS (10x) 50 µl Tween 20 45 ml dH <sub>2</sub> O
Permeabilisierungslösung	1880 µl TRIS Puffer (125 mM, pH7,4) 20 µl Triton X-100 100 µl β-Mercaptoethanol
Phosphatpuffer 50 mM	Lösung 1 (50 mM): 6,8 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1 l dH <sub>2</sub> O Lösung 2 (50 mM): 7,1 g Dinatriumhydrogenphosphat ad 1 l dH <sub>2</sub> O → Lösung 1 vorlegen und mit Lösung 2 auf pH 7,0 einstellen
Phosphatpuffer 75 mM	Lösung 1 (75 mM): 2,55 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 250 ml dH <sub>2</sub> O Lösung 2 (75 mM): 10,65 g Dinatriumhydrogenphosphat ad 1 l dH <sub>2</sub> O → 250 ml Lösung 1 vorlegen und mit Lösung 2 auf pH 7,4 einstellen

Medium / Lösung	Zusammensetzung
S-Basal	5,85 g Natriumchlorid 1 g Dikaliumhydrogenphosphat 6 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1 l dH <sub>2</sub> O → autoklaviert
S-Medium	500 µl Kaliumcitrat 500 µl Spurenelemente-Lösung 50 µl Lösung A 150 µl Lösung B 150 µl Lösung C ad 50 ml S-Basal
Spurenelemente-Lösung	1,86 g Ethylendiamintetraessigsäure 0,69 g Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat 0,2 g Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat 0,29 g Zinksulfat-Heptahydrat 0,025 g Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat ad 1 l dH <sub>2</sub> O → autoklaviert
Streptomycinsulfat 100 mg/ml	1 g ad 10 ml dH <sub>2</sub> O → steril filtriert
Sytox® Green 50 µM	3 µl Sytox® Green 5 mM 297 µl DMSO
Sytox® Green 2 µM	40 µl Sytox® Green 50 µM 960 µl PBS
Tetracyclin 5 mg/ml	30 mg Tetracyclin 6 ml Ethanol 99%, unvergällt → steril filtriert
Thioflavin-S-Lösung (0,125%)	10 ml Ethanol (50%) 25 mg Thioflavin-S → lösen ad 20 ml Ethanol (50%)
TRIS-Puffer (125 mM, pH 7,4)	7,75 g Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan ad 500 ml dH <sub>2</sub> O → mit Salzsäure auf pH 7,4 einstellen
Trolox 25 mg/ml	25 mg 1 ml DMSO
Tyrosol 30 mM	4,1 mg (138,164 g/mol) 1 ml BSA-AT (für Inkubationsmedien) oder 1 ml Phosphatpuffer (für TEAC)
Wasserstoffperoxid 100 mM	15,64 µl Wasserstoffperoxid 30% 1984,36 µl dH <sub>2</sub> O

### 3.1.6 Geräte

**Tabelle 5: Verwendete Geräte und ihre Hersteller.**

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Laboklav	Steriltechnik AG (SHP), Deutschland
Binokular	SMZ-168 Stemi 2000	Motic, China Zeiss, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse Ni mit Intensilight und C-HGFI	Nikon, Japan
Homogenisator	Minilys	Bertin Technologies, Frankreich
Kamera des Fluoreszenzmikroskops	DS-Vi1 mit DS-U3 (Controller)	Nikon, Japan
Metallblockthermostat	EPT-130-36/18-1,5/18-2,0	Liebisch, Deutschland
pH-Elektrode	Blueline 25 pH	SI Analytics, Deutschland
pH-Meter	C860	Consort, Belgien
Plattenlesegeräte	Synergy HT Synergy MX	Biotek, USA Biotek, USA
Plattformschüttler	Unimax 1010 mit Inkubator 1000	Heidolph, Deutschland
Thermoschränke	16°C 20°C 25°C 37°C	Memmert, Deutschland Memmert, Deutschland Aqualytic, Deutschland WTC Binder, Deutschland
Vortexer	Vortex Genie 2 PeqTwist	Scientific Industries, USA Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland
Waagen	Si 64 PT 600	Denver Instruments, Deutschland Sartorius, Deutschland
Wasserdeionisierungs- anlage	TKA GenPure	TKA Wasseraufbereitungssysteme, Deutschland
Zentrifugen	Centrifuge 5415D Heraeus Megafuge 8 PerfectSpin 24R	Eppendorf, Deutschland Thermo Scientific, USA Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland

### 3.1.7 Software

**Tabelle 6: Verwendete Software und ihre Herausgeber.**

Software	Herausgeber
Excel 2019	Microsoft, USA
Gen5 2.03	Bio Tek, USA

Software	Herausgeber
Prism 8	GraphPad, USA
ImageJ 1.50i	National Institutes of Health, USA
NIS-Elements D 4.51.01	Nikon, Deutschland
LibreOffice Writer 6.3	The Document Foundation, Deutschland
PASW Statistics 18	SPSS, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Unter Laborbedingungen sind *E. coli*-Bakterien die Nahrungsquelle von *C. elegans*. Diese werden sowohl auf den Kulturplatten der Nematoden ausgestrichen (OP50) als auch in die Inkubationsmedien gegeben (OP50-1).

Bei der Kultivierung der Bakterien muss zur Vermeidung von Kontaminationen steril gearbeitet werden. In einen Erlenmeyerkolben werden 200 ml LB-Medium gegossen, anschließend wird eine einzelne Bakterienkolonie hinzugegeben. Für die Kultivierung von OP50-1 werden zusätzlich 100 µl Streptomycin (100 mg/ml) dazu pipettiert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgt auf einem Plattformschüttler bei 37 °C und 200 bis 220 rpm für maximal 18 Stunden. Anschließend folgen eine Aufkonzentrierung der Bakterien und eine Prüfung der Bakteriensuspension auf Kontaminationen.

### 3.2.2 Aufkonzentrierung von Bakterien

Die Bakteriensuspension wird auf vier 50 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt, sodass immer zwei der Reaktionsgefäße das gleiche Gewicht besitzen. Anschließend werden die Bakterien für 15 min bei 4500 rpm zentrifugiert.

Bei Bakterien, die für das Ausstreichen auf Agarplatten bestimmt sind, werden 10 ml des Überstandes zurückbehalten. Der Rest wird verworfen. Werden die Bakterien für Flüssigmedien benötigt, so wird der Überstand bis auf 1 ml verworfen. Die Bakterien aller 50 ml-Reaktionsgefäße werden im zurückbehaltenen Überstand resuspendiert und in beschriftete 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Gelagert werden die Bakteriensuspensionen bei 4°C.

### 3.2.3 Kontaminationsprüfung von Bakterienkulturen

Um zu prüfen, ob die Bakterien kontaminiert sind, wird eine LB-Agarplatte benötigt. Für OP50 eine einfache ohne Zusätze, für OP50-1 eine LB-Agarplatte mit Streptomycin. Eine Impföse wird über der Flamme eines Bunsenbrenners ausgeglüht. Ist sie abgekühlt, wird sie in die Bakteriensuspension getaucht. Die Bakterien werden mit einem „3-Ösen-Ausstrich“ auf den Agar gestrichen. Anschließend wird die Platte über Nacht bei 37°C gelagert. Am nächsten Morgen wird sie unter dem Mikroskop auf Kontaminationen untersucht.

### 3.2.4 Bestimmung der Bakterienkonzentration

Die Flüssigkulturmedien, die der Inkubation der Nematoden dienen, sollen eine Bakterienkonzentration von  $10^9$  koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml enthalten.

Bei einer Absorption von 600 nm wird im Synergy MX photometrisch die Konzentration der KBE, die in der Bakteriensuspension enthalten ist, bestimmt. Anschließend erfolgt eine Doppelbestimmung von je 1 ml einer 1:200-Verdünnung der Bakteriensuspension. Die Absorption dieser Verdünnungen muss zwischen 0,1 und 0,8 liegen. Falls die gemessenen Absorptionen außerhalb dieses linearen Bereiches liegen, muss ein anderes Verdünnungsverhältnis gewählt werden. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht einer Bakterienkonzentration von  $10^9$  KBE/ml.

Aus den gemessenen Absorptionswerten der Bakterienverdünnung wird der Mittelwert berechnet und dieser mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

Mit Hilfe folgender Formel wird das für 1 ml Medium einzusetzende Volumen der Bakteriensuspension berechnet:

$$10^9 / (X \cdot 10^9) \cdot 1 \text{ ml} = \text{Volumen KBE (in ml)/ml Inkubationsmedium}$$

X steht für den zuvor errechneten Mittelwert der Messung, nachdem er mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert wurde.

### 3.2.5 Herstellung von NGM<sub>k</sub>-Agarplatten und Kultivierung von *C. elegans*

Unter Laborbedingungen dienen mit Bakterien bestrichene NGM<sub>k</sub>-Agarplatten den Nematoden als Lebensraum und Nahrungsquelle.

Hierfür wird NGM<sub>k</sub>-Agar in Petrischalen gegossen und für mindestens einen Tag bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Dann werden die Agarplatten mit 90 µl einer OP50-

Bakteriensuspension bestrichen und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert, bis ein dichter Bakterienrasen gewachsen ist.

Da bei der Kultivierung der Nematoden kein Nahrungsmangel entstehen darf, werden je 10 Nematoden pro Stamm alle drei bis vier Tage auf eine neue Agarplatte überführt. Die Haltung der meisten Stämme findet in einem Thermoschrank bei 20°C statt. Die Stämme CL4176 und CL2006 werden bei 16°C kultiviert.

### 3.2.6 Inkubationsmedien für Untersuchungen in Flüssigkultur

Für Untersuchungen in Flüssigkultur werden Medien mit einem Volumen von 1,5 ml angesetzt. Dabei werden verschiedene Konzentrationen der eingesetzten Extrakte oder Substanzen bzw. DMSO als Kontrolle eingesetzt. Die Medien setzen sich wie in Tabelle 7 dargestellt zusammen.

Floxuridin (FUDR) wird eingesetzt, um das Schlüpfen von Nachkommen zu verhindern. Ist dies für die Durchführung des Experimentes nicht nötig, wird dessen Volumen durch NGM<sub>k</sub> ersetzt. Ampicillin und Tetracyclin werden eingesetzt, um Kontaminationen zu vermeiden.

**Tabelle 7: Grundlegende Zusammensetzung von Kulturmedien.**

Bestandteil	Volumen / Konzentration
BSA-AT	150 µl
(FUDR)	(300 µl)
DMSO, Extrakt oder Einzelsubstanz in verschiedenen Konzentrationen	6 µl
OP50/OP50-1	10 <sup>9</sup> KBE/ml
NGM <sub>k</sub>	ad 1500 µl

Ist der Extrakt oder die Substanz in DMSO gelöst, wird mit reinem BSA-AT gearbeitet. 3-HT und TYR sind jedoch in BSA-AT gelöst. Hier wird, den benötigten Konzentrationen der Substanz entsprechend, reines BSA-AT und BSA-AT mit 3-HT oder TYR gemischt. Zusätzlich werden der Vergleichbarkeit halber 6 µl DMSO hinzu gegeben. Die Zusammensetzungen dieser Medien sind in Tabelle 8 dargestellt.

Weicht die Zusammensetzung der verwendeten Flüssigmedien bei einem Versuch von der in Tabelle 7 oder Tabelle 8 dargestellten Grundzusammensetzung ab, wird dies im entsprechenden Kapitel beschrieben.

**Tabelle 8: Zusammensetzung der Kulturmedien mit 3HT und TYR.**

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen / Konzentration für 100 <math>\mu</math>M</b>	<b>Volumen / Konzentration für 500 <math>\mu</math>M</b>
BSA-AT	145 $\mu$ l	125 $\mu$ l
3HT oder TYR in BSA-AT	5 $\mu$ l	25 $\mu$ l
(FUDR)	(300 $\mu$ l)	(300 $\mu$ l)
DMSO	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l
OP50/OP50-1	10 <sup>9</sup> KBE/ml	10 <sup>9</sup> KBE/ml
NGM <sub>k</sub>	ad 1500 $\mu$ l	ad 1500 $\mu$ l

### 3.2.7 Synchronisation von *C. elegans*

Um für das durchzuführende Experiment genügend Nematoden gleichen Alters zu erhalten, wird eine Synchronisation durchgeführt.

**Synchronisation mittels Eiablage auf Agarplatten.** Für die Eiablagensynchronisation werden ca. 100 adulte gravide Nematoden auf eine neue NGM<sub>k</sub>-Agarplatte mit OP50 gesetzt und dort für zwei Stunden zur Eiablage belassen. Sind für die Experimente genügend Eier auf den Platten vorhanden, werden alle adulten Tiere von den Platten entfernt.

Nach einer dreitägigen Inkubation bei 20°C befinden sich die Nematoden im L4-Larvenstadium bzw. sind jung-adult und können für Experimente verwendet werden.

**Synchronisation mittels Eiablage in Flüssigmedium.** Für diese Art der Synchronisation wird ein Inkubationsmedium hergestellt, welches nur aus BSA-AT (150  $\mu$ l), OP50-1 (10<sup>9</sup> KBE/ml) und NGM<sub>k</sub> (ad 1500  $\mu$ l) besteht. In dieses Medium werden ca. 80 bis 90 gravide adulte Tiere gesetzt und dort zur Eiablage für 5 h belassen. Die gelegten Eier können dann für die durchzuführenden Experimente verwendet werden.

**Bleichesynchronisation.** Für diese Art der Synchronisation wird eine Kulturplatte benötigt, auf der sich bereits Eier in ausreichender Zahl befinden. Von dieser Platte werden sowohl die Nematoden, als auch ihre Eier mit 2,5 ml NGM<sub>k</sub> abgespült und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Während die Nematoden auf den Boden des Gefäßes absinken, werden 500  $\mu$ l Bleichelösung hergestellt. Die Bleichelösung tötet alle bereits geschlüpften Nematoden, die Eier überleben jedoch.

Sind die Nematoden abgesunken, wird das NGM<sub>k</sub> oberhalb der Nematoden bis auf 500 µl entfernt, die Bleichelösung hinzugegeben und alles gründlich durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 90 s wird das Reaktionsgefäß für 1 min bei 7000 rpm zentrifugiert.

Anschließend wird der Überstand bis auf 500 µl entfernt, zum Waschen mit NGM<sub>k</sub> auf 2 ml aufgefüllt, vermischt und nochmals zentrifugiert.

Dieser Waschschrift wird zwei weitere Male wiederholt.

Danach wird der Überstand bis auf 500 µl abgenommen und die sich im Reaktionsgefäß befindenden Eier im verbliebenen Medium mit einer Pipette resuspendiert. Je 50 µl dieser resuspendierten Eier werden auf die benötigten Agarplatten pipettiert. Bei Bedarf können weitere resuspendierte Eier hinzugegeben werden.

### **3.2.8 Untersuchung der Pharynxpumpfrequenz**

Bleichesynchronisierte L4-Larven bzw. jung-adulte Nematoden werden für 96 Stunden in Inkubationsmedien mit den Extrakten, den Einzelsubstanzen oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO bei 20°C inkubiert, wobei sie alle 24 Stunden in neue Medien gesetzt werden.

Anschließend werden die Nematoden in 25 µl Medium auf eine bakterienfreie Agarplatte überführt. Nach 1 min wird die Pharynxpumpfrequenz von 10 Nematoden je drei Mal für 15 s ausgezählt.

Dieses Experiment wird mit jedem der untersuchten Extrakte und Einzelsubstanzen drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

### **3.2.9 Größenmessung**

Die Größe der Nematoden aller Inkubationsgruppen wird erfasst. Hierfür werden mittels Bleiche synchronisierte wildtypische L4-Larven bzw. jung-adulte Nematoden mit den Extrakten, den Einzelsubstanzen oder DMSO als Kontrolle für 24 oder 48 Stunden bei 20°C inkubiert. OBE, OP, OS, 3-HT, TYR und JGE werden für 24 Stunden inkubiert, CSE, REW und ZJE für 48 Stunden. Anschließend werden von je 20 Nematoden pro Gruppe, unter Berücksichtigung der mikroskopischen Vergrößerung, Fotos aufgenommen und die Fläche der Nematoden mittels Image J bestimmt.

Bei der Untersuchung des PME werden wildtypische L4-Larven bzw. jung-adulte *C. elegans* bei 20°C für 72 Stunden in Inkubationsmedien mit verschiedenen Konzentrationen des Extraktes oder der Kontrolle DMSO und anschließend für weitere 24 Stunden in Medien ohne *P. multiflorum* oder DMSO inkubiert. Danach werden von je 20 Nematoden jeder

Gruppe Fotos unter gleicher Vergrößerung gemacht. Anschließend wird die Fläche der Nematoden mit Hilfe des Programms Image J gemessen.

Dieses Experiment wird mit jedem Extrakt und jeder untersuchten Einzelsubstanz drei Mal unabhängig voneinander wiederholt.

### **3.2.10 Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften *in vitro* (TEAC)**

Mit Hilfe dieses Experiments sollen die antioxidativen Eigenschaften der verschiedenen Extrakte und ihrer Inhaltsstoffe *in vitro* untersucht werden. Als Vergleichssubstanz dient Trolox, ein syntetisches Vitamin E-Derivat. Dieses Experiment beruht auf der Entfärbung der farbigen radikalischen Lösung ABTS durch hinzugegebene Antioxidantien.

Einen Tag vor Versuchsbeginn wird diese radikalische Lösung 1:1 aus 14 mM ABTS und 4,9 mM APS hergestellt. Zu Beginn des Experiments wird sie dann mit 70% Ethanol, bei den Experimenten mit 3-HT und TYR mit 75 mM Phosphatpuffer, verdünnt, bis ihre Absorption bei 734 nm zwischen 0,6 und 0,8 liegt. Es wird darauf geachtet, dass experimentelle Wiederholungen mit der gleichen Absorption starten.

Sowohl mit Trolox als auch mit den zu untersuchenden Extrakten und Substanzen wird eine Verdünnungsreihe angesetzt, da verschiedene Konzentrationen untersucht werden sollen. Hierbei wird darauf geachtet, dass in allen Verdünnungen von Extrakten und Substanzen, die in DMSO gelöst sind, die gleiche Menge DMSO enthalten ist. Wird DMSO eingesetzt, wird die gleiche Menge DMSO auch zu den Verdünnungen von Trolox hinzugegeben. Da 3-HT und TYR für die meisten Experimente in BSA-AT gelöst sind, dies hier jedoch nicht einsetzbar ist, werden 3-HT und TYR für den TEAC-Assay in Phosphatpuffer gelöst und auch mit diesem verdünnt.

Anschließend werden 10 µl der Verdünnungen von Trolox, Extrakten und Substanzen als Triplikat in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend 290 µl der eingestellten ABTS-Lösung hinzugegeben. Als Hintergrund dienen drei Kavitäten mit 70% Ethanol bzw. bei 3-HT und TYR mit 75 mM Phosphatpuffer. Die Messung der Absorption findet bei einer Wellenlänge von 734 nm nach 12 min statt.

Der PME wird nach einem alternativen Verfahren in Küvetten gemessen. Hierfür werden die Vorverdünnungen von Trolox und PME 1:1 mit der ABTS-Lösung vermischt. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 734 nm gemessen. Als Hintergrund dient eine Küvette mit 70% Ethanol.

Zusätzlich werden bei allen Extrakten und Substanzen die Eigenabsorptionswerte gemessen. Hierbei wird die ABTS-Lösung durch 70% Ethanol bzw. 75 mM Phosphatpuffer (bei 3-HT und TYR) ersetzt.

Es wird in Triplikaten in drei voneinander unabhängigen Experimenten gemessen.

### 3.2.11 Untersuchung der ROS-Level *in vivo* mittels DCF-Assay

Je 16 mittels Bleichelösung synchronisierte L4-Larven bzw. jung-adulte Nematoden werden für einen Tag (OBE, OP, OS, 3-HT, TYR und JGE) oder für zwei Tage (CSE, PME, REW und ZJE) bei 20°C in Medien mit verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Extrakte und Substanzen oder DMSO als Kontrolle inkubiert. Die unterschiedlichen Inkubationszeiten für die Extrakte und Substanzen werden auf Grund der besseren Effektstärke in Vorexperimenten gewählt. Es folgt ein einstündiger Waschschrift in PBST. Anschließend wird eine 384-Well-Mikrotiterplatte vorbereitet, indem je 7 µl M9 in die Wells aller benötigten Spalten luftblasenfrei vorgelegt werden. In die erste Spalte, die der Hintergrundmessung dient, wird zusätzlich invers 1 µl PBST pipettiert.

Je ein gewaschener Nematode wird nun in 1 µl des Waschmediums in die Wells der nachfolgenden Spalten pipettiert. Zuletzt werden alle Wells mit 2 µl 250 µM H<sub>2</sub>DCF-DA bestückt. Die Endkonzentration des H<sub>2</sub>DCF-DA beträgt somit 50 µM.

H<sub>2</sub>DCF-DA kann in die Zellen der Nematoden eindringen und wird dort von Esterasen hydrolysiert. Das H<sub>2</sub>DCF, welches nicht fluoreszent ist, kann die Zellen nicht mehr verlassen. Bei Anwesenheit von ROS wird es jedoch zum fluoreszierenden DCF oxidiert. Hierbei ist die Fluoreszenz des DCF proportional zur vorhandenen ROS-Menge und kann daher photometrisch bestimmt werden (BASS et al., 1983).

Nun wird für 24 Stunden alle 15 Minuten im Plattenlesegerät Biotek Synergy HT eine Fluoreszenzmessung bei 37°C, einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 535 nm durchgeführt.

Pro verwendetem Extrakt bzw. verwendeter Einzelsubstanz wird dieses Experiment drei Mal unabhängig voneinander wiederholt.

Um ausschließen zu können, dass es sich bei den im DCF-Assay erhaltenen Ergebnissen um Quenching-Effekte der Extrakte oder Einzelsubstanzen handelt, wird mit oxidiertem DCF ein Quenching-Test durchgeführt. Hierzu wird eine Spatelspitze des oxidierten DCF in M9-Puffer gelöst und verdünnt, bis die Lösung klar und farblos ist. Anschließend wird die Fluoreszenz mit einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 535 nm gemessen.

Für die Messung der Quenching-Effekte werden je 450 µl der DCF-Verdünnung in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und je 50 µl von zuvor hergestellten Vorverdünnungen der Extrakte bzw. der Einzelsubstanzen hinzugegeben. Bei allen Extrakten und Substanzen werden mehrere Konzentrationen untersucht. Als Kontrolle werden 50 µl M9-Puffer zum DCF hinzugegeben.

Die Messung erfolgt für alle untersuchten Extrakte und Substanzen in Triplikaten in drei voneinander unabhängigen Experimenten.

### **3.2.12 Thermale Stressresistenz (Sytox® Green Assay)**

Je 16 durch Bleiche alterssynchronisierte L4-Larven bzw. jung-adulte Nematoden werden bei 20°C für einen Tag (OBE, OP, OS, 3-HT, TYR und JGE) oder für zwei Tage (CSE, PME, REW und ZJE) in Medien mit Extrakten oder Einzelsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen oder mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Es folgt ein einstündiger Waschschrift in PBST.

In der 384-Well-Mikrotiterplatte werden 9 µl PBS pro Well in allen benötigten Spalten luftblasenfrei vorgelegt. In die erste Spalte, die der Hintergrundmessung dient, wird zusätzlich 1 µl PBST invers pipettiert. Anschließend wird je ein Nematode in 1 µl Waschlösung invers in die Wells der angrenzenden Spalten gegeben.

Sind alle benötigten Wells mit Nematoden bestückt, werden in jede Kavität 10 µl einer 2 µM Sytox-Lösung pipettiert. Die Endkonzentration des Sytox in den Wells beträgt somit 1 µM.

Sytox kann nicht durch intakte Zellmembranen hindurch gelangen. Sind diese jedoch beschädigt, beispielsweise durch Wärme (37°C), gelangt es in die Zellen und kann sich in die DNA interkalieren. Dadurch steigt die Fluoreszenz des Farbstoffes um das 500-fache an (ROTH et al., 1997). Dieser starke Anstieg der Fluoreszenz kann genutzt werden, um den virtuellen Todeszeitpunkt der Nematoden zu ermitteln: Er wird errechnet, indem man den Mittelwert der Fluoreszenz der ersten drei Messpunkte mit drei multipliziert. Wird dieser Wert überschritten wird der zugehörige Nematode als tot gewertet.

Im Plattenlesegerät Biotek Synergy HT wird die Fluoreszenz bei 37°C für 24 h alle 15 min gemessen. Die Excitation beträgt hierbei 485 nm und die Emission 535 nm.

Dieses Experiment wird mit jedem untersuchten Extrakt bzw. jeder untersuchten Substanz drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Dieses Experiment wird sowohl mit dem wildtypischen Stamm (N2) als auch der DAF-16-Deletionsmutante (CF1038) durchgeführt.

### 3.2.13 Resistenz gegenüber oxidativem Stress

Die Untersuchung der Resistenz gegenüber oxidativem Stress wird bei 20°C durchgeführt. Die Synchronisation der Tiere findet mittels Eiablage statt. L4-Larven bzw. jung-adulte Nematoden werden für drei Tage mit der Testsubstanz bzw. dem Extrakt in verschiedenen Konzentrationen oder mit DMSO als Kontrolle behandelt. Die Zugabe von FUDR zu diesen Medien verhindert das Schlüpfen der Larven.

Anschließend werden je 40 Nematoden pro Gruppe in Medien mit 50 mM Paraquat (PME) oder in Medien mit 80 mM Paraquat (OBE, OP, OS, 3-HT, TYR, CSE, JGE, REW und ZJE) überführt. Die unterschiedlichen Konzentrationen an Paraquat wurden verwendet, da die Durchführung dieses Experiments mit der Zeit angepasst wurde. Die Zusammensetzung dieser Medien ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Paraquat induziert in den Nematoden oxidativen Stress in Form von Superoxidanionen (COCHEMÉ und MURPHY, 2007). Dieser Prozess beruht darauf, dass Paraquat-Dikationen in den Mitochondrien ein Elektron aufnehmen können und somit zum Paraquat-Radikal reduziert werden. Das Paraquat-Radikal reagiert dann zügig mit Sauerstoff, wodurch es wieder zum Paraquat-Dikation oxidiert wird. Gleichzeitig bewirkt diese Reaktion eine Reduktion des Sauerstoffmoleküls zum Superoxidanion (COCHEMÉ und MURPHY, 2007; VANFLETEREN, 1993).

**Tabelle 9: Zusammensetzung der Medien mit 50 mM bzw. 80 mM Paraquat.**

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen / Konzentration</b>
BSA-AT	150 µl
Paraquat 1M	75 µl bzw. 120 µl
OP50	10 <sup>9</sup> Bakterien/ml
S-Medium	ad 1500 µl

Die Nematoden werden an den vier Folgetagen alle 24 Stunden mit einem berührungsinduzierten Bewegungstest auf ihr Überleben überprüft. Hierbei werden die Nematoden mehrmals vorsichtig berührt. Anschließend wird 5 s auf eine Reaktion gewartet. Dies wird drei Mal pro Nematode durchgeführt. Bleibt eine Reaktion aus, so wird der Nematode als tot gewertet. Alle Tiere, die geplatzt, deren Organe nach außen gestülpt, in denen Larven geschlüpft oder die an ihren Schwanzenden miteinander verknotet sind, werden zensiert.

Sich bewegende Nematoden verbleiben in den Medien, tote und zensierte werden aus den Medien entfernt.

Alle Nematoden, die nach dem letzten Versuchstag noch am Leben sind, werden zensiert.

Dieses Experiment wird mit allen untersuchten Extrakten und Substanzen drei Mal unabhängig voneinander wiederholt. Hier werden sowohl die wildtypischen Nematoden eingesetzt als auch die DAF-16-Deletionsmutante.

### **3.2.14 Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16**

Um zu untersuchen, ob sich der Transkriptionsfaktor DAF-16 durch die Behandlung mit einem der untersuchten Extrakte oder einer Einzelsubstanz in den Zellkern bewegt, werden bleichesynchronisierte *C. elegans* des Stammes TJ356 im L4-Larvenstadium bzw. jung-adulte Tiere für eine Stunde bei 20°C in Medien mit den untersuchten Extrakten, Einzelsubstanzen oder mit DMSO als Kontrolle inkubiert.

Anschließend werden die Nematoden in 9 µl Medium auf einen Objektträger übertragen und mit 9 µl Levamisol (20 mM) betäubt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wird bei 30 Nematoden die Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 ermittelt. Die Einteilung in die Kategorie „nukleär“ erfolgt, wenn in verschiedenen Körperregionen des Nematoden jeweils mindestens drei Zellkerne leuchten.

Als Positivkontrolle werden 30 weitere Nematoden in 18 µl Levamisol auf einen Objektträger gesetzt und für 5 min bei 37°C inkubiert, bevor deren Lokalisation von DAF-16 ebenfalls ermittelt wird.

Exemplarische Aufnahmen erfolgen bei einer Belichtungszeit von 300 ms, einer 10-fachen Vergrößerung und einer analogen Verstärkung von 1,7.

Dieses Experiment wird mit jedem Extrakt bzw. jeder untersuchten Einzelsubstanz drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

### **3.2.15 Untersuchung von Effekten auf die durch 6-OHDA hervorgerufene Degeneration dopaminerger Neuronen**

6-OHDA führt zur Degeneration der dopaminergen Neuronen der Nematoden (NASS et al., 2002). Mit Hilfe dieses Experiments wird untersucht, ob eine Vorinkubation der Nematoden mit verschiedenen Extrakten oder Reinsubstanzen die durch 6-OHDA hervorgerufene Neurodegeneration vermindern kann.

Zunächst wird mit dem Stamm BZ555 eine Synchronisation mittels Eiablage in Flüssigmedium durchgeführt. Anschließend werden je 60 der gewonnenen Eier in Inkubationsmedien mit DMSO als Kontrolle oder in Medien mit den zu untersuchenden Extrakten und Substanzen überführt und darin bei 20°C für 67 h inkubiert.

Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit werden Bakterien des Stammes OP50-1 in BSA-AT gelöst (Endkonzentration im Well: 10<sup>9</sup> KBE/ml; 10% BSA-AT) und 6-OHDA in 200 mM Ascorbinsäurelösung (Endkonzentration von 6-OHDA im Well: 73,56 mM). Die 6-OHDA-Lösung wird bis zur Verwendung lichtgeschützt gelagert und muss für jedes Experiment neu hergestellt werden, da 6-OHDA schnell oxidiert (VARESLIJA et al., 2020).

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Nematoden in NGM<sub>k</sub> gewaschen. In einer 96-Well-Mikrotiterplatte werden je 40 zuvor inkubierte Nematoden pro Gruppe in NGM<sub>k</sub> vorgelegt und anschließend mit 20 µl der 200 mM Ascorbinsäurelösung (Kontrolle) oder mit 20 µl 6-OHDA (Negativkontrolle und Behandlungsgruppen) versetzt. Zuletzt wird das BSA-AT mit den Bakterien hinzugegeben. Das Endvolumen in den Kavitäten beträgt 50 µl.

Nun folgt eine Inkubation für 2,5 h bei 20°C in Dunkelheit, wobei die Mikrotiterplatte ab und zu geschwenkt wird. Anschließend werden 150 µl M9 hinzugegeben, wodurch das 6-OHDA oxidiert. Die Nematoden werden für 30 min in M9 gewaschen. Es folgt eine Inkubation für 21 h in Medien ohne Extrakt oder Substanz, dann werden die Nematoden, wie in Kapitel 3.2.14 beschrieben, auf Objektträger überführt. Von je 20 Nematoden pro Gruppe werden schwarz-weiß Fotos bei einer 10-fachen Vergrößerung, einer Belichtungszeit von 400 ms und einer analogen Verstärkung von 1 unter Verwendung des GFP-Filters angefertigt und anschließend die Fluoreszenzstärke der Kopfregion der Nematoden densitometrisch mit Image J ausgewertet.

Dieses Experiment wird mit jedem der untersuchten Extrakte oder Substanzen drei Mal unabhängig voneinander wiederholt.

### **3.2.16 Degeneration der dopaminergen Neuronen durch eine erhöhte Dopaminsynthese in den Neuronen**

Beim Stamm UA57 kommt es aufgrund einer vermehrten Synthese von Dopamin mit der Zeit zu einer fortschreitenden Degeneration der dopaminergen Neuronen (MANALO und MEDINA, 2018; MASOUDI et al., 2014). Bei diesem Experiment wird untersucht, ob die fortschreitende Neurodegeneration durch eine Behandlung der Tiere mit pflanzlichen Extrakten oder deren Inhaltsstoffen verzögert werden kann.

Alterssynchronisierte Tiere dieses Stammes werden mittels Eiablage generiert. Anschließend werden die L4-Larven in Medien mit den verschiedenen Extrakten oder Substanzen oder mit DMSO als Kontrolle bei 20°C inkubiert. Für jeden Zeitpunkt, zu dem gemessen werden soll, wird ein separates Medium mit Nematoden hergestellt. Die Testung der Kontrollgruppe mit 30 Nematoden zum Zeitpunkt t<sub>0</sub> wird noch am selben Tag unter dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Hierbei werden die Nematoden unterteilt, je nachdem, ob ihre dopaminergen Neuronen im Kopfbereich (CEP) intakt oder degeneriert sind. Die Neuronen werden als degeneriert eingestuft, wenn die Dendriten durchbrochen sind oder Bläschen bilden, wenn die Dendriten oder die gesamten Neuronen fehlen oder wenn die Soma der Neuronen fehlen bzw. stark verkleinert oder aufgeplatzt sind, was sich in einer diffusen Fluoreszenz im Somabereich äußert.

Nach 24 und 48 Stunden (t<sub>1</sub> und t<sub>2</sub>) werden je 30 Nematoden pro Gruppe (Kontrolle und Extrakt-, bzw. Substanzgruppen) untersucht und kategorisiert.

Exemplarische Aufnahmen erfolgen bei einer Belichtungszeit von 400 ms, einer 10-fachen Vergrößerung und einer analogen Verstärkung von 1.

Auch dieses Experiment wird jeweils in drei voneinander unabhängigen Wiederholungen durchgeführt.

### **3.2.17 Untersuchung der A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Toxizität (M. Alzheimer)**

Um herauszufinden, ob einer oder mehrere der in dieser Arbeit untersuchten Extrakte die Toxizität von humanem A $\beta$ <sub>1-42</sub> reduzieren kann, wird zunächst bei 16°C eine Eiablage in Flüssigmedium durchgeführt.

Anschließend werden die Eier bei 16°C in die Inkubationsmedien mit oder ohne Extrakt bzw. Einzelsubstanz überführt. Als Positivkontrolle dient Koffein, welches mit einer Konzentration von 5 mM eingesetzt wird.

NGM<sub>k</sub>-Agarplatten werden mit 250  $\mu$ l OP50-Bakterien bestrichen. Die hierzu verwendeten Bakterien werden nach ihrer Kultivierung, Aufkonzentrierung und Kontaminationsprüfung und vor dem Auftragen auf die Agarplatten mit sterilem dH<sub>2</sub>O verdünnt, so dass sie eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,6 besitzen. Die Platten werden nach dem Bestreichen mit Bakterien für 48 h bei Raumtemperatur gelagert.

Nach einer Inkubationszeit von 42 h werden je 40 L3-Larven aus den jeweiligen Inkubationsmedien auf die Agarplatten überführt und bei 25°C inkubiert. Nach weiteren 26 h wird gezählt, wie viele Nematoden paralytisch sind. Dies wird zu den Zeitpunkten 28 h, 30 h,

32 h und 34 h erneut untersucht, wobei Nematoden, die sich gar nicht bewegen oder nur noch mit dem Kopf zucken, als paralysiert, und verletzte oder verloren gegangene Nematoden als zensiert gewertet werden.

Dieses Experiment wird pro untersuchtem Extrakt bzw. untersuchter Substanz drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

### 3.2.18 Anzahl der A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Plaques in den Nematoden

Unlösliche A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Plaques sind ein Kennzeichen von M. Alzheimer (Übersichtsartikel: LAFERLA et al., 2007). Im Stamm CL2006 werden unlösliche humane A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Peptide in der Körperwandmuskulatur exprimiert, welche zu Plaques aggregieren. Diese können mit Hilfe des Farbstoffes Thioflavin-S in den Nematoden nachgewiesen werden (LINK, 1995).

Mittels Bleiche synchronisierte Nematoden der Stämme CL2006 und N2 werden als L4-Larven bzw. jung-adulte Tiere in Inkubationsmedien mit den zu untersuchenden Extrakten und Substanzen bzw. mit DMSO als Kontrolle bei 20°C inkubiert. Der wildtypische Stamm dient hierbei als Negativkontrolle, da dieser Stamm keine A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Plaques bildet.

Nach 24 h werden die Nematoden in frische Medien umgesetzt und nach weiteren 24 h für eine Stunde in PBST gewaschen. Anschließend werden die Tiere in je 100  $\mu$ l der Waschlösung in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Der Überstand wird verworfen. Nun wird je 1 ml Fixierlösung (4 %PFA in PBS) hinzugegeben. Dann werden die Tiere für 24 h bei 4°C gelagert.

Anschließend werden die Nematoden in den jeweiligen Reaktionsgefäßen zwei Mal mit PBST gewaschen. Danach wird die Waschlösung entfernt und 400  $\mu$ l der frisch angesetzten Permeabilisierungslösung hinzugegeben. Nun werden die Nematoden für 24 h bei 37°C im Dunkeln geschüttelt.

Es schließen sich erneut zwei Waschvorgänge mit PBST in den Reaktionsgefäßen an. Anschließend werden 100  $\mu$ l 50 % EtOH für 2 min zu den Tieren gegeben und wieder entfernt. Die Färbung der Nematoden wird mit Hilfe von 100  $\mu$ l einer 0,125 %igen Thioflavin-S-Lösung durchgeführt, welche zu den Nematoden gegeben und nach 2 min wieder entfernt wird. Daran schließen sich zwei Entfärbungsschritte mit je 100  $\mu$ l 50 % EtOH für 2 min an. Das EtOH wird anschließend wieder entfernt und die Nematoden werden zwei Mal für 5 min mit je 100  $\mu$ l PBS (10x) gewaschen, um die Hintergrundfluoreszenz zu verringern. Der Überstand wird verworfen und die Nematoden in 15  $\mu$ l PBST auf einen Objektträger überführt. Um ein schnelles Ausbleichen der A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Plaques zu verhindern werden nun 5  $\mu$ l

DABCO-Lösung hinzugegeben. Anschließend wird das Präparat mit einem Deckgläschen abgedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Hierbei wird mit dem GFP-Filter, einer 20-fachen Vergrößerung, einer Belichtungszeit von 100 ms und einer analogen Verstärkung von 1 gearbeitet. Mit diesen Einstellungen erfolgte auch die Aufnahme von Beispielbildern.

Von je 20 Nematoden pro Gruppe werden die Plaques im Kopf- und Schwanzbereich (vor Beginn des Darms und nach dem Ende des Darms) gezählt. Es erfolgt die Einteilung der Nematoden gemäß der in ihnen vorhandenen Plaques. Dieses Experiment wird pro untersuchtem Extrakt oder untersuchter Substanz drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

### 3.2.19 Untersuchung der AChE-Aktivität (Ellman's Assay)

Inhibitoren der AChE werden als Medikamente bei M. Alzheimer eingesetzt (Übersichtsartikel: RODDA und CARTER, 2012). Daher werden die Extrakte und ihre Inhaltsstoffe auf ihr Potential, die in *C. elegans* vorhandene AChE zu hemmen, untersucht. Als Positivkontrolle wird Aldicarb eingesetzt.

Hierfür wird zunächst das Aldicarb mit DMSO auf 25 mM verdünnt. Diese Lösung kann für alle Wiederholungen des Experiments verwendet werden. Vor jedem Versuch neu hergestellt werden muss jedoch die Stocklösung, die sich aus 40 µl Acetylthiocholiniodid (75 mM in Phosphatpuffer), 200 µl 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (10 mM in Phosphatpuffer) und 3 ml Phosphatpuffer (50 mM) zusammensetzt.

Anschließend werden vier Platten mit bleichesynchronisierten wildtypischen Nematoden mit je 2,5 ml PBST abgespült und in vier 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Sind die Nematoden auf den Boden der Gefäße abgesunken, wird der Überstand auf 500 µl reduziert und 1,5 ml PBST hinzugegeben. Die Nematoden werden 1 min gewaschen und sinken erneut auf den Boden der Gefäße ab. Der Waschschrift wird zwei weitere Male wiederholt.

Nun wird der Überstand in allen Reaktionsgefäßen bis auf 200 µl abgenommen und je 200 µl Phosphatpuffer (50 mM) hinzugefügt. Dann werden die Volumina in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Nachdem die Nematoden erneut auf den Grund des Gefäßes abgesunken sind, wird der Überstand bis auf 1 ml abgenommen und die zurückbleibende Flüssigkeit mit den Nematoden in ein Homogenisierungsröhrchen mit Glaskügelchen überführt. Die Nematoden werden nun in der Minilys bei höchster Geschwindigkeit 10 s homogenisiert und dann bei 10.000 rpm und 4°C 10 min zentrifugiert.

Ab diesem Zeitpunkt wird die Probe auf Eis gelagert. Der Überstand im Homogenisierungsröhrchen wird abgenommen, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und durchmischt. Das restliche Homogenat wird bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für die Bestimmung der Proteinmenge (beschrieben im Kapitel 3.2.20), welche sich diesem Experiment anschließt, eingefroren.

In eine transparente 96-Well-Mikrotiterplatte werden  $50\ \mu\text{l}$  Homogenat und je  $1\ \mu\text{l}$  DMSO (Kontrolle), Aldicarb (Positivkontrolle) oder Testsubstanz (Extrakt oder Inhaltsstoff) als Duplikate pipettiert. Anschließend erfolgt die Messung des Hintergrunds bei  $406\ \text{nm}$ .

Nun werden in drei Kavitäten der 96-Well-Mikrotiterplatte  $251\ \mu\text{l}$  Stocklösung als Blank pipettiert. Alle umliegenden Kavitäten der 96-Well-Mikrotiterplatte werden mit  $250\ \mu\text{l}$  Phosphatpuffer befüllt. Dies dient dem Vorbeugen von Verdunstungsprozessen. Zuletzt werden in alle Testkavitäten  $200\ \mu\text{l}$  Stocklösung pipettiert. Die Messung erfolgt im Plattenlesegerät MX bei  $406\ \text{nm}$  und  $28^{\circ}\text{C}$  alle  $30\ \text{min}$  für  $24\ \text{h}$ .

Die gemessene Proteinmenge wird einberechnet und die erste von zwei unbehandelten Kontrollen wird auf  $100\%$  AChE-Aktivität normiert. Die anderen Gruppen werden daran angepasst. Dieses Experiment wird mit jedem der untersuchten Extrakte oder Inhaltsstoffe drei Mal unabhängig voneinander wiederholt.

### 3.2.20 Bestimmung der Proteinmenge

Zur Bestimmung der Proteinmenge im Homogenat, welches für den Ellman's Assay genutzt wird, wird zunächst das Bio-Rad Reagenz (Bradford-Reagenz)  $1:5$  mit  $\text{dH}_2\text{O}$  verdünnt und anschließend filtriert. Eine Verdünnungsreihe des BSA-Standards wird, wie Tabelle 10 zu entnehmen, hergestellt.

**Tabelle 10: Zusammensetzung der Verdünnungsreihe des BSA-Standards.**

Konzentration des Standards ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\text{dH}_2\text{O}$ ( $\mu\text{l}$ )	$1\ \text{mg/ml}$ BSA in Phosphatpuffer ( $\mu\text{l}$ )
0	50	0
50	95	5
100	45	5
200	40	10
300	35	15
400	30	20
500	25	25

Die Proteinproben werden ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen untersucht (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 11: Zusammensetzungen der Verdünnungen der Probe.**

Verdünnung	dH <sub>2</sub> O (µl)	Probe (µl)
unverdünnt	0	40
1:5	32	8
1:10	36	4

In eine transparente 96-Well-Mikrotiterplatte werden je 10 µl der Probenverdünnung im Triplikate oder der Standardverdünnung im Duplikate pipettiert. Dann werden 200 µl Bradford-Reagenz in jede belegte Kavität gegeben. Als Blank dienen 210 µl dH<sub>2</sub>O.

Die Absorptionsmessung bei einer OD von 595 nm erfolgt im Plattenlesegerät MX nach 7 min. Die Bestimmung der Proteinmenge des Homogenats erfolgt für jede Probenverdünnung im Triplikate.

### 3.2.21 Untersuchung der Anzahl von PolyQ-Plaques (Huntington)

Bei diesem Experiment soll herausgefunden werden, ob die in dieser Arbeit untersuchten Extrakte die Akkumulation von sogenannten PolyQ-Plaques in den Nematoden verringern können. Zunächst wird mit dem Stamm EAK103 eine Eiablage in Flüssigmedium gemacht. Nun werden die Eier mit oder ohne Extrakt bei 20°C inkubiert. Nach 56 Stunden werden die Nematoden in 9 µl Medium auf einen Objektträger pipettiert und mit 9 µl Levamisol betäubt. Die Nematoden werden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und die im Kopfbereich bis zum Beginn des Darmes akkumulierten PolyQ-Plaques bei 20 Nematoden gezählt.

Exemplarische Aufnahmen erfolgen bei einer Belichtungszeit von 400 ms, einer 20-fachen Vergrößerung und einer analogen Verstärkung von 1.

Die Experimente werden jeweils drei Mal unabhängig voneinander wiederholt.

### 3.2.22 Untersuchung der durch PolyQ hervorgerufenen Neurodegeneration

Um protektive Effekte der untersuchten Extrakte auf die durch PolyQ hervorgerufene Neurodegeneration zu untersuchen, wird der Stamm HA659 genutzt, welcher mit GFP markierte ASH-Neuronen besitzt.

Zunächst wird eine Eiablage in Flüssigmedium gemacht. Die so erhaltenen Eier der Nematoden werden bei 20°C in Inkubationsmedien mit oder ohne Extrakt bzw. Einzelsubstanz inkubiert. Nach 56 Stunden werden die Nematoden in frische Medien mit FUDR überführt. Die Inkubationszeit in diesen Medien beträgt 7 Tage, wobei die Medien nach jeweils 2 bis 3 Tagen erneuert werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Nematoden in 9 µl Medium auf einen Objektträger gesetzt und mit 9 µl Levamisol betäubt. Anschließend werden je 30 Nematoden jeder Gruppe unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung in Nematoden mit intakten oder zerstörten ASH-Neuronen eingeteilt. Die Neuronen werden als zerstört gewertet, wenn die Dendriten der Neuronen entweder blasenförmige Auswucherungen aufweisen, durchbrochen oder ganz verschwunden sind oder wenn die Zellkörper verschwunden oder deutlich verkleinert sind.

Exemplarische Aufnahmen erfolgen bei einer Belichtungszeit von 400 ms, einer 20-fachen Vergrößerung und einer analogen Verstärkung von 1.

Auch dieser Versuch wird mit jedem Extrakt und jeder Substanz drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

### **3.2.23 Untersuchung der nozizeptorischen Wahrnehmung in einem *C.***

#### ***elegans* Modell für *C. Huntington***

Bei diesem Experiment wird untersucht, ob die pflanzlichen Extrakte bzw. deren Inhaltsstoffe die durch eine Neurodegeneration, welche mit der Zeit bei den Nematoden des Stammes HA659 auftritt, verminderte Reaktionsfähigkeit auf einen mechanischen Stimulus verbessern können.

Hierzu werden mittels Eiablage in Flüssigmedium synchronisierte Nematoden dieses Stammes im L4-Larvenstadium bzw. als jung-adulte Tiere mit den Extrakten oder Substanzen oder mit DMSO als Kontrolle bei 20°C inkubiert. Nach 56 Stunden werden die Nematoden in frische Medien mit FUDR überführt. Die Inkubationszeit in diesen Medien beträgt 7 Tage, wobei die Medien nach jeweils 2 bis 3 Tagen erneuert werden.

An den Tagen 5, 7 und 10, bzw. 10, 12 und 14 werden 10 Tiere pro Gruppe in je 5 µl Medium auf frische Agarplatten ohne Bakterienrasen gesetzt. Nach 1 min werden die Nematoden vorsichtig an ihrer Schnauze berührt. Bei einer Rückwärtsbewegung werden die unternommenen Schlängelbewegungen gezählt, bis die Tiere sich wieder vorwärts bewegen. Bewegt der Nematode sich nicht rückwärts wird er zwei weitere Male berührt. Sobald er sich rückwärts bewegt, wird gezählt. Bewegt er sich nicht, ist die Anzahl der Bewegungen 0.

Der wildtypische Stamm N2 wird hierbei als Kontrolle mitgeführt, denn seine nozizeptorische Wahrnehmung lässt mit der Zeit nicht nach. Alle untersuchten Extrakte und Einzelsubstanzen werden jeweils in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten getestet.

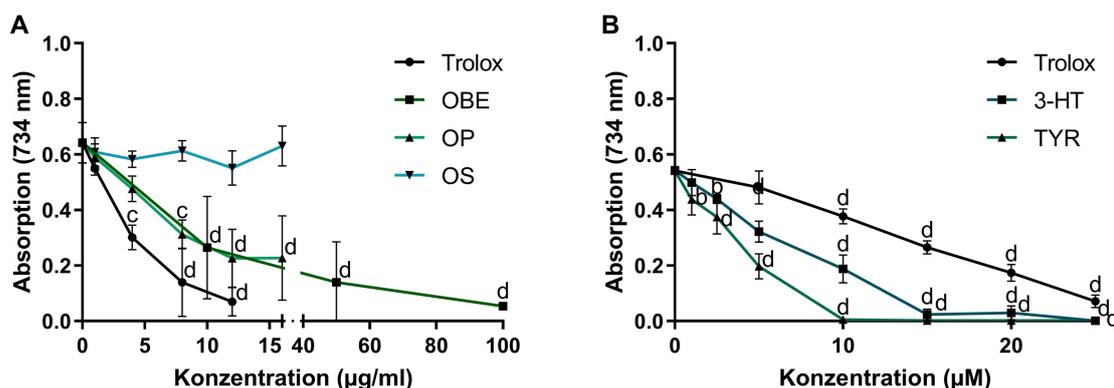
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Allgemeine Untersuchungen von OBE und seinen Inhaltsstoffen zu antioxidativen Wirkungen und Stressresistenz

Die Daten zu antioxidativen Wirkungen und zur Stressresistenz entstanden größtenteils in den im Rahmen dieser Dissertation betreuten Abschlussarbeiten von Frau Nora Meinhardt (OBE, OP und OS) und Frau Alicia Chisari (OBE, 3-HT und TYR).

#### 4.1.1 Antioxidative Effekte von OBE und seinen Inhaltsstoffen

**Antioxidative Eigenschaften *in vitro*.** Das antioxidative Potential des OBE und seiner Inhaltsstoffe wird im Vergleich zu dem stark antioxidativ wirkenden synthetischen Vitamin E Derivat Trolox ermittelt. In Abbildung 1A ist zu erkennen, dass in diesem zellfreien Experiment OBE weniger starke antioxidative Eigenschaften besitzt als Trolox. Die radikalische Lösung wird bei einer OBE-Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  annähernd vollständig entfärbt. Diese Entfärbung tritt bei Trolox bereits bei 12  $\mu\text{g/ml}$  ein. Der Inhaltsstoff OP verhält sich in diesem Experiment ähnlich wie der Extrakt selber und ist demnach ebenfalls antioxidativ wirksam. Dieser Effekt ist jedoch nicht so stark wie der von Trolox. Die OS zeigt keine antioxidativen Eigenschaften *in vitro*, denn es kommt zu keiner Entfärbung der radikalischen Lösung im Vergleich zum Kontrollpunkt (Abbildung 1A).



**Abbildung 1: Radikalfangende Eigenschaften (TEAC-Assay; OBE und Inhaltsstoffe).**

Im zellfreien TEAC-Assay werden die radikalfangenden Eigenschaften von verschiedenen Konzentrationen an OBE, OP, OS, 3-HT und TYR bzw. DMSO als Kontrolle im Vergleich zum syntetischen Vitamin E Derivat Trolox untersucht. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3$ , einfaktorische Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest gegen Trolox 0  $\mu\text{g/ml}$ ; a:  $p < 0,05$ ; b:  $p < 0,01$ ; c:  $p < 0,001$ ; d:  $p < 0,0001$ .

Anders als der OBE und seine Inhaltsstoffe OP und OS sind 3-HT und TYR stärker antioxidativ als die Vergleichssubstanz Trolox (Abbildung 1B). Die Kurven beider Substanzen liegen deutlich unterhalb der von Trolox. Bei einer Trolox-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ist die Absorption im Vergleich zum Kontrollpunkt um 30,3% gesunken. 10  $\mu\text{M}$  3-HT senken die Absorption bereits um 65,2%. TYR besitzt den stärksten antioxidativen Effekt: 10  $\mu\text{M}$  TYR führen zu einer vollständigen Entfärbung der radikalischen Lösung und somit einer Reduktion der Absorption um 99,1% (Abbildung 1B).

Sowohl OBE als auch seine Inhaltsstoffe OP, 3-HT und TYR sind im zellfreien System antioxidativ wirksam, jedoch in unterschiedlichem Maß.

**Antioxidative Eigenschaften *in vivo*.** Um zu überprüfen, ob OBE und seine Inhaltsstoffe auch *in vivo* antioxidative Effekte zeigen, werden die Nematoden mit dem Extrakt und den Einzelsubstanzen behandelt. Anschließend wird das DCF-Fluoreszenzsignal, welches proportional zu den in den Nematoden vorhandenen ROS ist (BASS et al., 1983), gemessen.

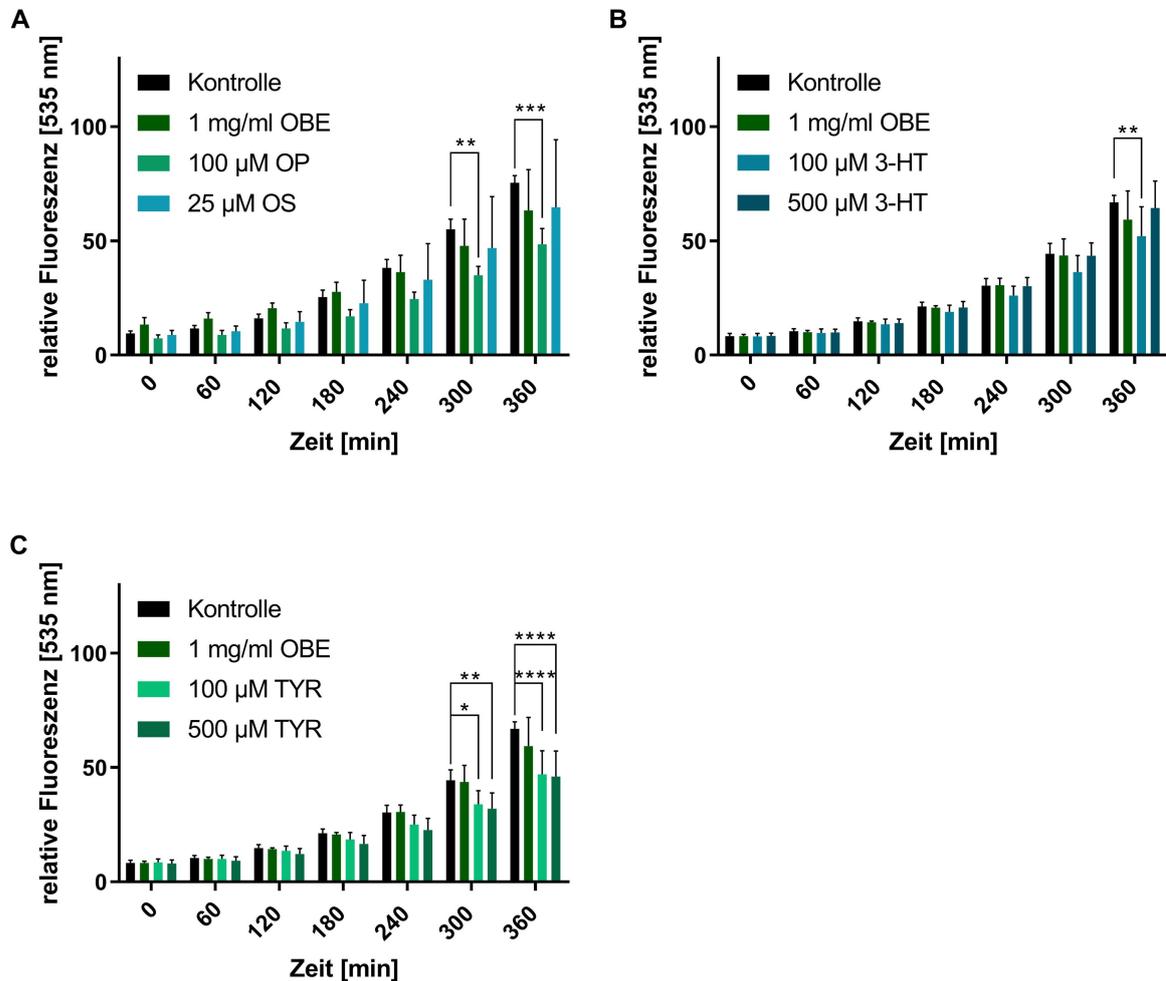
In Abbildung 2 ist der durch thermalen Stress hervorgerufene Anstieg der Fluoreszenz und somit auch der Menge an ROS in den Nematoden abgebildet. Mit der Zeit, welche die Nematoden thermalem Stress ausgesetzt sind, steigt die Menge an ROS in den Nematoden (Abbildung 2). Durch eine Vorinkubation der Nematoden mit OBE zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Verringerung der Fluoreszenz, bzw. der ROS-Akkumulation in den Nematoden (Abbildung 2A, B und C). OBE hat folglich keine antioxidativen Effekte *in vivo*.

Auch die OS ruft keine Verringerung der Menge an ROS in den Nematoden hervor (Abbildung 2A). OP hingegen verringert die DCF-Fluoreszenz um 35,8% im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 2A; 360 min). Hier zeigt sich nach 300 min, bzw. 360 min ein signifikanter antioxidativer Effekt.

3-HT scheint keine antioxidativen Wirkungen *in vivo* zu besitzen (Abbildung 2B). Eine Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  3-HT bewirkt keine Verringerung der Fluoreszenzintensität. Die niedrigere Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  3-HT jedoch verringert die Menge an ROS in den Nematoden nach 360 min signifikant um 22,3% (Abbildung 2B). Dieses Ergebnis zeigt sich jedoch nur in einer der drei Wiederholungen und kann als Ausreißer betrachtet werden (vgl. Kapitel 9.4).

Eine Behandlung mit TYR hingegen führt zu signifikanten antioxidativen Effekten nach 300 und 360 min (Abbildung 2C). Dies ist sowohl bei 100  $\mu\text{M}$  als auch bei 500  $\mu\text{M}$  TYR der Fall. Eine Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  TYR resultiert nach 300 min in einer 32,5%igen Reduktion des ROS-Levels im Vergleich zur Kontrolle und nach 360 min in einer 27,9%igen Reduktion. Es

zeigt sich nur ein sehr geringer Unterschied zur höheren Konzentration an TYR (500  $\mu$ M): Nach 300 min beträgt die Reduktion der intrazellulären ROS-Menge 29,8% im Vergleich zur Kontrolle und nach 360 min 31,3%.

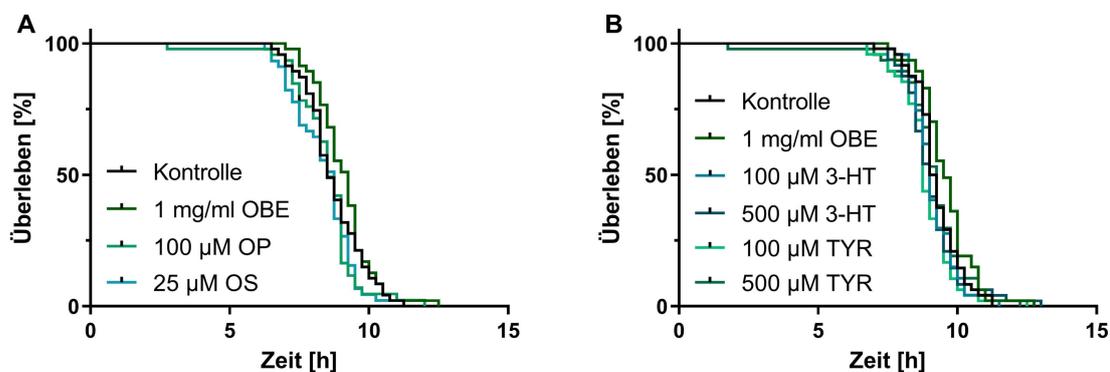


**Abbildung 2: Thermal induzierter Anstieg der ROS-Level im Wildtyp (DCF-Assay; OBE und Inhaltsstoffe).**

Wildtypische L4-Larven (N2) werden bei 20°C für 24 h mit 1 mg/ml OBE, 100  $\mu$ M OP, 25  $\mu$ M OS, 100  $\mu$ M 3-HT oder TYR, 500  $\mu$ M 3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Nach einem einstündigen Waschschrift in PBST werden sie in Wells mit H<sub>2</sub>DCF-DA (50  $\mu$ M) transferiert. Der thermal induzierte Anstieg der DCF-Fluoreszenz wird bei einer Exzitation von 485 nm, einer Emission von 535 nm und 37°C gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD, normalisiert auf die Kontrolle bei 420 min, n = 4 (A) und n = 3 (B und C) (je 16 Individuen pro Gruppe), zweifaktorielle Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest, \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001 gegen die Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt.

### 4.1.2 Modulation der Resistenz gegenüber thermalem und oxidativem Stress durch OBE und seine Inhaltsstoffe

**Resistenz gegenüber thermalem Stress.** Die Nematoden werden thermalem Stress ausgesetzt, um herauszufinden, ob die Überlebensrate unter diesen Bedingungen erhöht und somit ihre Resistenz gegenüber thermalem Stress durch OBE oder seine Inhaltsstoffe verbessert ist. Durch eine Vorinkubation mit OBE wird die Resistenz der Nematoden gegenüber dem applizierten thermalen Stress nicht signifikant erhöht (Abbildung 3A und B). Die mediane Überlebenszeit der Kontrolltiere beträgt  $8,5 \pm 0,2$  h (Abbildung 3A) bzw.  $9,1 \pm 0,1$  h (Abbildung 3B). Die mit OBE behandelten Nematoden zeigen eine mediane Überlebenszeit von  $9,3 \pm 0,2$  h (Abbildung 3A) bzw.  $9,5 \pm 0,2$  h (Abbildung 3B).



**Abbildung 3: Resistenz wildtypischer Nematoden gegenüber thermalem Stress (OBE und Inhaltsstoffe).**

Wildtypische L4-Larven (*N2*) werden bei  $20^{\circ}\text{C}$  für 24 h mit 1 mg/ml OBE,  $100\ \mu\text{M}$  OP,  $25\ \mu\text{M}$  OS,  $100\ \mu\text{M}$  3-HT oder TYR,  $500\ \mu\text{M}$  3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Nach einem einstündigen Waschschrift in PBST werden sie in Wells mit Sytox-Green ( $1\ \mu\text{M}$ ) transferiert. Die Messung wird bei  $37^{\circ}\text{C}$  durchgeführt und die Fluoreszenz bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 535 nm gemessen. Anschließend werden die virtuellen Todeszeitpunkte der Nematoden ermittelt. Verglichen werden die Überlebenskurven mit einer Kaplan-Meier-Statistik,  $n = 3$  (je 16 Individuen pro Gruppe), Log-Rank (Mantel-Cox) Test.

Auch die einzelnen Inhaltsstoffe des Extraktes verlängern das Überleben der Nematoden unter thermalem Stress nicht (Abbildung 3A und B). Die mediane Überlebenszeit der Nematoden, welche mit OP bzw. OS behandelt werden, beträgt  $8,5 \pm 0,2$  h bzw.  $8,8 \pm 0,2$  h (Abbildung 3A). Eine Vorinkubation mit 3-HT oder TYR resultiert in medianen Überlebenszeiten von  $9,0 \pm 0,1$  h bei  $100\ \mu\text{M}$  3-HT und  $500\ \mu\text{M}$  3-HT,  $8,8 \pm 0,1$  h bei  $100\ \mu\text{M}$  TYR bzw.  $9,3 \pm 0,1$  h bei  $500\ \mu\text{M}$  TYR (Abbildung 3B).

Die mittleren und medianen Überlebenszeiten und die entsprechenden p-Werte der Untersuchung der thermalen Stressresistenz können Tabelle 12 entnommen werden.

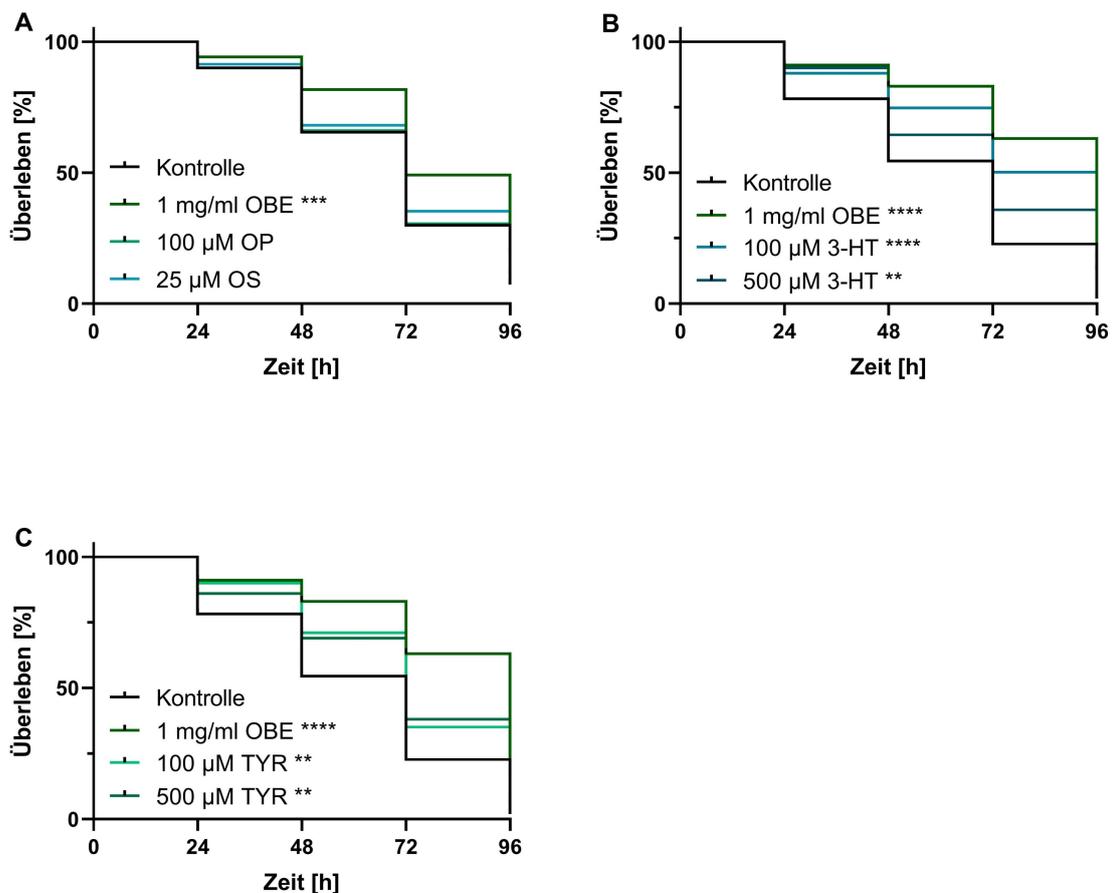
Weder OBE noch die untersuchten Inhaltsstoffe sind in der Lage die thermale Stressresistenz der Nematoden zu verbessern und ihr Überleben unter diesen Bedingungen zu verlängern.

**Tabelle 12: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der thermalen Stressresistenz am Wildtyp (OBE und Inhaltsstoffe).**

Behandlung	Mittelwert [h] ± SD	% Differenz zur Kontrolle	Median [h] ± SD	% Differenz zur Kontrolle	p-Wert gegen Kontrolle
Kontrolle	8,7 ± 0,2	-	8,5 ± 0,2	-	-
1 mg/ml OBE	9,1 ± 0,1	+ 4,6	9,3 ± 0,2	+ 9,4	0,238
100 µM OP	8,5 ± 0,2	- 2,3	8,5 ± 0,2	± 0	0,507
25 µM OS	8,4 ± 0,2	- 3,4	8,8 ± 0,2	+ 3,5	0,201
Kontrolle	9,3 ± 0,1	-	9,0 ± 0,1	-	-
1 mg/ml OBE	9,6 ± 0,1	+ 3,2	9,5 ± 0,2	+ 5,6	0,079
100 µM 3-HT	9,1 ± 0,1	- 2,2	9,0 ± 0,1	± 0	0,501
500 µM 3-HT	9,1 ± 0,2	- 2,2	9,0 ± 0,1	± 0	0,415
100 µM TYR	8,9 ± 0,1	- 4,4	8,8 ± 0,1	- 2,3	0,078
500 µM TYR	9,1 ± 0,2	- 2,2	9,3 ± 0,1	+ 3,3	0,997

**Resistenz gegenüber oxidativem Stress.** Das Herbizid Paraquat bewirkt eine erhöhte Produktion an Superoxidanionen in den Nematoden (COCHEMÉ und MURPHY, 2007). Dieser oxidative Stress führt dazu, dass die Nematoden der Kontrollgruppen innerhalb der folgenden vier Tage sterben (Abbildung 4).

Eine Vorinkubation mit OBE erhöht im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren die Resistenz gegenüber dem durch Paraquat applizierten oxidativem Stress. Das Überleben der Nematoden, welche mit OBE behandelt werden, ist im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verlängert (Abbildung 4). Das mittlere Überleben der Kontrollgruppe beträgt hierbei  $68,5 \pm 2,2$  h (Abbildung 4A, Tabelle 13) bzw.  $61,3 \pm 2,6$  h (Abbildung 4B, C, Tabelle 13), das der mit OBE behandelten Tiere beträgt  $78,0 \pm 2,0$  h (Abbildung 4A, Tabelle 13) bzw.  $80,9 \pm 2,3$  h (Abbildung 4B, C, Tabelle 13). Das mittlere Überleben der mit OBE behandelten Nematoden wird also um 13,9% bzw. 32,0% verlängert (Tabelle 13).



**Abbildung 4: Resistenz des Wildtyp gegenüber oxidativem Stress (OBE und Inhaltsstoffe).**

L4-Larven des wildtypischen Stammes N2 werden bei 20°C für 72 h mit 1 mg/ml OBE, 100  $\mu$ M OP, 25  $\mu$ M OS, 100  $\mu$ M 3-HT oder TYR, 500  $\mu$ M 3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Anschließend werden alle Nematoden in Medien ohne Extrakte aber mit 80 mM Paraquat umgesetzt. Alle 24 h werden die Nematoden mittels Berührung auf ihr Überleben getestet. Verglichen werden die Überlebenskurven mit einer Kaplan-Meier-Statistik,  $n = 3$  (je 40 Individuen pro Gruppe), Log-Rank (Mantel-Cox) Test; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Eine Vorinkubation mit den Inhaltsstoffen OP und OS erhöht die Resistenz der Nematoden im Vergleich zur Kontrolle nicht. Die Mittelwerte dieser Gruppen betragen  $69,8 \pm 2,0$  h bzw.  $70,8 \pm 2,2$  h (Abbildung 4A, Tabelle 13). Eine leichte Tendenz zur Verlängerung des mittleren Überlebens um 1,9% durch OP und 3,4% durch OS ist zu erkennen, dies ist jedoch nicht signifikant (Tabelle 13).

Durch eine Behandlung mit 3-HT wird das Überleben der Nematoden unter oxidativem Stress signifikant verlängert. Hierbei scheint die niedrigere Konzentration von 100  $\mu$ M 3-HT sogar einen stärkeren Effekt zu erzielen als die höhere von 500  $\mu$ M 3-HT. Die Mittelwerte dieser beiden Gruppen betragen  $75,1 \pm 2,5$  h bzw.  $69,7 \pm 2,4$  h (Abbildung 4B, Tabelle 13).

Tabelle 13 kann entnommen werden, dass das mittlere Überleben der Nematoden durch 100  $\mu\text{M}$  3-HT um 22,5% und durch 500  $\mu\text{M}$  3-HT um 13,7% im Vergleich zur Kontrolle verlängert wird.

TYR führt ebenfalls zu einer erhöhten Resistenz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress. Das mittlere Überleben der Nematoden beträgt durch 100  $\mu\text{M}$  TYR  $71,0 \pm 2,3$  h und durch 500  $\mu\text{M}$  TYR  $70,3 \pm 2,5$  h, während das mittlere Überleben der Kontrolltiere  $61,3 \pm 2,6$  h beträgt (Abbildung 4C, Tabelle 13). Das mittlere Überleben wird im Vergleich zur Kontrollgruppe um 15,8% durch 100  $\mu\text{M}$  TYR und 14,7% durch 500  $\mu\text{M}$  TYR verlängert (Tabelle 13). Die beiden Konzentrationen unterscheiden sich hierbei kaum.

**Tabelle 13: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der oxidativen Stressresistenz am Wildtyp (OBE und Inhaltsstoffe).**

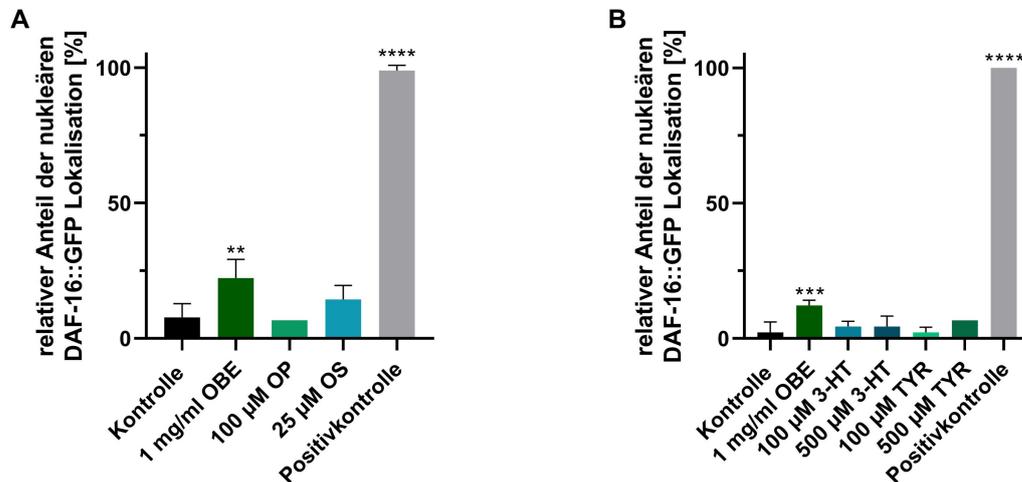
Behandlung	Mittelwert [h] $\pm$ SD	% Differenz zur Kontrolle	Median [h] $\pm$ SD	% Differenz zur Kontrolle	p-Wert gegen Kontrolle
Kontrolle	$68,5 \pm 2,2$	-	$72,0 \pm 3,0$	-	-
1 mg/ml OBE	$78,0 \pm 2,0$	+ 13,9	$72,0 \pm 3,5$	$\pm 0$	0,0003
100 $\mu\text{M}$ OP	$69,8 \pm 2,0$	+ 1,9	$72,0 \pm 2,9$	$\pm 0$	0,8008
25 $\mu\text{M}$ OS	$70,8 \pm 2,2$	+ 3,4	$72,0 \pm 3,3$	$\pm 0$	0,3120
Kontrolle	$61,3 \pm 2,6$	-	$72,0 \pm 3,6$	-	-
1 mg/ml OBE	$80,9 \pm 2,3$	+ 32,0	$96,0 \pm 2,0$	+ 33,3	< 0,0001
100 $\mu\text{M}$ 3-HT	$75,1 \pm 2,5$	+ 22,5	$96,0 \pm 2,6$	+ 33,3	< 0,0001
500 $\mu\text{M}$ 3-HT	$69,7 \pm 2,4$	+ 13,7	$72,0 \pm 4,1$	$\pm 0$	0,004
100 $\mu\text{M}$ TYR	$71,0 \pm 2,3$	+ 15,8	$72,0 \pm 3,2$	$\pm 0$	0,007
500 $\mu\text{M}$ TYR	$70,3 \pm 2,5$	+ 14,7	$72,0 \pm 3,8$	$\pm 0$	0,004

OBE zeigt im Vergleich zu seinen Inhaltsstoffen den stärksten Effekt auf die Resistenz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress, aber auch die Inhaltsstoffe 3-HT und TYR sind in der Lage das Überleben der Nematoden unter oxidativem Stress zu verlängern (Abbildung 4).

#### 4.1.3 Modulation der Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 durch OBE und seine Inhaltsstoffe

Der Transkriptionsvorgang von DAF-16-regulierten Genen kann beginnen, wenn der Transkriptionsfaktor DAF-16 im Zellkern lokalisiert ist (MURPHY et al., 2003).

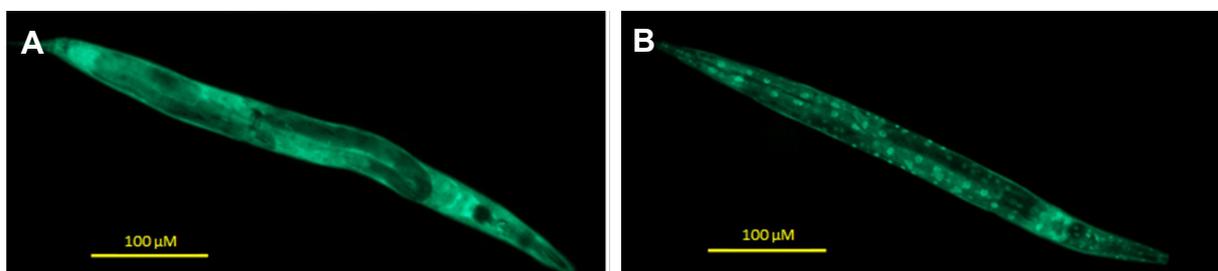
Nur wenige der Nematoden in den Kontrollgruppen weisen nukleär lokalisiertes DAF-16 auf (Abbildung 5). In der Positivkontrolle hingegen haben fast alle Nematoden nukleär lokalisiertes DAF-16.



**Abbildung 5: Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 (OBE und Inhaltsstoffe).**

Anhand des transgenen Stammes TJ356 (DAF-16::GFP) wird die Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Nematoden werden für eine Stunde bei 20°C in Inkubationsmedien mit 1 mg/ml OBE, 100 µM OP, 25 µM OS, 100 µM 3-HT oder TYR, 500 µM 3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle inkubiert. Als Positivkontrolle dienen Nematoden, die 5 min bei 37°C thermalem Stress ausgesetzt werden. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3$  (je 30 Individuen pro Gruppe), einfaktorielles Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Werden die Nematoden nun für 1 h mit OBE inkubiert zeigt sich, dass durch diese Behandlung der Anteil an Nematoden mit nukleär lokalisiertem DAF-16 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle signifikant erhöht ist (Abbildung 5). Durch OBE steigt die Anzahl an Nematoden mit nukleärem DAF-16 um das 2,9- (Abbildung 5A) bis 5,5-Fache (Abbildung 5B) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle.



**Abbildung 6: Beispielbilder der Lokalisation von DAF-16::GFP in den Nematoden.**

Abgebildet sind ein Nematode mit cytosolisch lokalisiertem DAF-16 (A) und einer mit nukleär lokalisiertem DAF-16 (B).

Bei der Untersuchung der Inhaltsstoffe des OBE zeigt sich, dass weder OP noch OS (Abbildung 5A), 3-HT oder TYR (Abbildung 5B) eine signifikante Translokation von DAF-16 in den Zellkern bewirken, wobei bei einer Inkubation mit OS eine leichte Tendenz sichtbar ist (Abbildung 5A).

In Abbildung 6 sind Beispielbilder eines Nematoden mit cytosolischem DAF-16 (Abbildung 6A) und eines Nematoden mit nukleär lokalisiertem DAF-16 (Abbildung 6B) dargestellt.

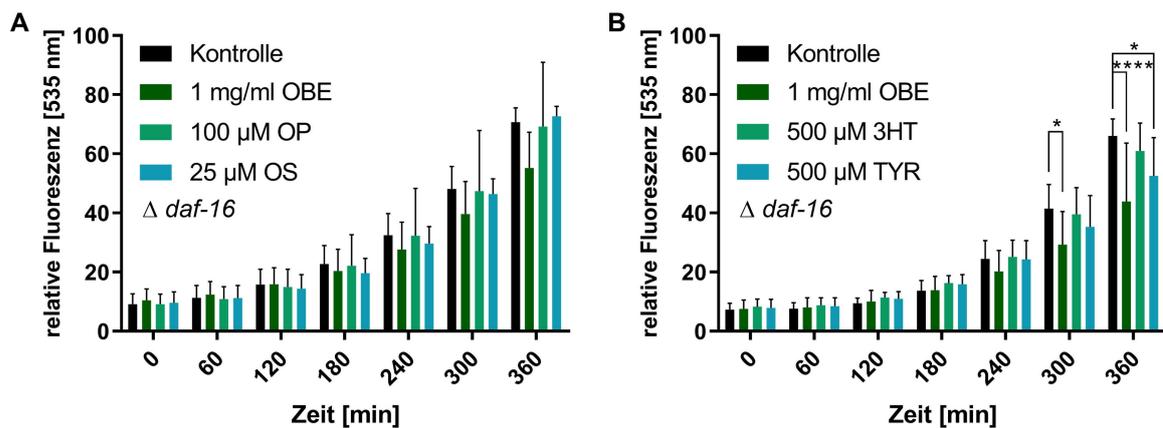
#### **4.1.4 Untersuchung der Modulation des IIS durch OBE und seine Inhaltsstoffe mittels Deletion von DAF-16**

Durch eine Deletion des Transkriptionsfaktors DAF-16 kann herausgefunden werden, ob dieser Faktor für die Vermittlung des durch OBE oder seine Inhaltsstoffe hervorgerufenen Effekts essentiell ist. Ist dies der Fall zeigt sich in den Deletionsmutanten im Gegensatz zu den wildtypischen Nematoden keine Wirkung mehr. Es werden nur solche Experimente mit den DAF-16-Deletionsmutanten wiederholt, in denen der OBE oder seine Inhaltsstoffe in den wildtypischen Nematoden eine protektive Wirkung zeigen.

**Antioxidative Effekte in DAF-16-Deletionsmutanten.** In DAF-16-Deletionsmutanten besitzen weder OBE noch OP oder OS einen signifikanten antioxidativen Effekt (Abbildung 7A).

Während OBE und OS im wildtypischen Nematoden ebenfalls keinen signifikanten antioxidativen Effekt haben, hat OP im Wildtyp eine antioxidative Wirkung. Dies bedeutet, dass der antioxidative Effekt, welcher durch OP hervorgerufen wird, abhängig ist vom Transkriptionsfaktor DAF-16.

Auch durch 3-HT sind in der Deletionsmutante – wie auch schon im Wildtyp – keine antioxidativen Effekte zu erkennen (Abbildung 7B). TYR hingegen besitzt auch in der DAF-16-Deletionsmutante antioxidative Wirkungen. Nach 360 min wird die Menge an ROS durch TYR um 20,5% im Vergleich zur Kontrolle signifikant gesenkt (Abbildung 7B).



**Abbildung 7: Thermal induzierter Anstieg der ROS-Level in der DAF-16-Deletionsmutante (DCF-Assay; OBE und Inhaltsstoffe).**

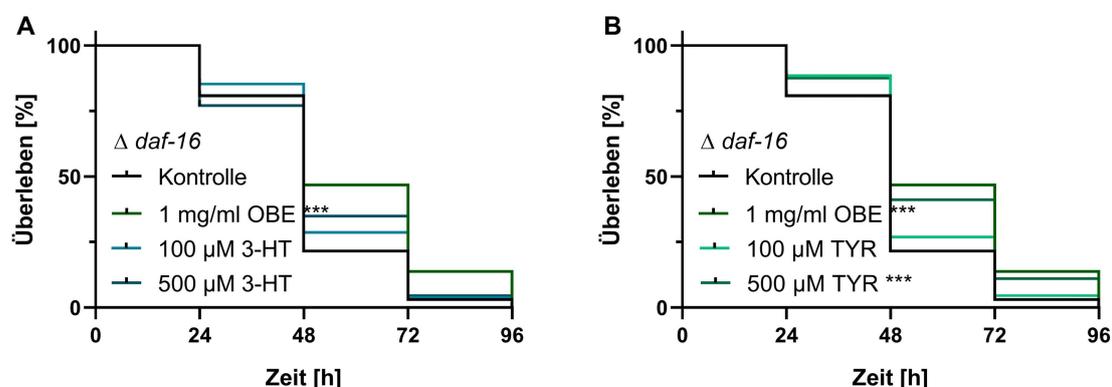
L4-Larven des DAF-16-defizienten Stammes CF1038 werden bei 20°C für 24 h mit 1 mg/ml OBE, 100  $\mu$ M OP, 25  $\mu$ M OS, 100  $\mu$ M 3-HT oder TYR, 500  $\mu$ M 3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Nach einem einstündigen Waschschrift in PBST werden sie in Wells mit H<sub>2</sub>DCF-DA (50  $\mu$ M) transferiert. Der thermal induzierte Anstieg der DCF-Fluoreszenz wird bei 535 nm und 37°C gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD, normalisiert auf die Kontrolle bei 420 min, n = 3 (A) und n = 4 (B) (je 16 Individuen pro Gruppe), zweifaktorielle Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest, \* p < 0,05; \*\*\*\* p < 0,0001 gegen die Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt.

Der OBE zeigt in diesem Experiment unerwarteterweise ebenfalls signifikante antioxidative Effekte nach 300 und 360 min. Nach 300 min ist die DCF-Fluoreszenz der Nematoden, welche mit 1 mg/ml OBE behandelt werden, um 29,4% im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Nach 360 min ist dieser Effekt deutlicher zu sehen: Die Reduktion des ROS-Levels der mit OBE inkubierten Nematoden beträgt 33,3% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 7B).

**Resistenz gegenüber oxidativem Stress in DAF-16-Deletionsmutanten.** Da weder OP noch OS eine Erhöhung der oxidativen Stressresistenz der wildtypischen Nematoden zur Folge hatten, werden diese Substanzen in den Deletionsmutanten nicht mehr weiter untersucht.

Sowohl OBE als auch die Inhaltsstoffe 3-HT und TYR bewirken im Wildtyp eine Erhöhung der Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Abbildung 4B und C). OBE besitzt in der DAF-16-Deletionsmutante nach wie vor eine signifikante Erhöhung der Resistenz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress (Abbildung 8A und B). Die mittleren Überlebenszeiten der Kontrolltiere und der mit OBE behandelten Nematoden unterscheiden sich stark: Sie belaufen sich auf  $49,3 \pm 1,5$  h bei der Kontrollgruppe bzw.  $57,9 \pm 2,2$  h bei den mit 1 mg/ml OBE behandelten Tieren. Dies entspricht einer Verlängerung der Überlebenszeit der mit OBE inkubierten Nematoden um 17,4% im Vergleich zu den Kontrolltieren (Tabelle 14).

Die Wirkung von OBE auf die oxidative Stressresistenz der Nematoden scheint nicht von DAF-16 abhängig zu sein.



**Abbildung 8: Resistenz des DAF-16-defizienten Stammes gegenüber oxidativem Stress (OBE und Inhaltsstoffe).**

L4-Larven des DAF-16-defizienten Stammes CF1038 werden bei 20°C für 72 h mit 1 mg/ml OBE, 100  $\mu$ M OP, 25  $\mu$ M OS, 100  $\mu$ M 3-HT oder TYR, 500  $\mu$ M 3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Anschließend werden alle Nematoden in Medien ohne Extrakte aber mit 80 mM Paraquat umgesetzt. Alle 24 h werden die Nematoden mittels Berührung auf ihr Überleben getestet. Verglichen werden die Überlebenskurven mit einer Kaplan-Meier-Statistik,  $n = 3$  (je 40 Individuen pro Gruppe), Log-Rank (Mantel-Cox) Test; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Tabelle 14: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der oxidativen Stressresistenz an DAF-16-Deletionsmutanten (OBE und Inhaltsstoffe).**

Behandlung	Mittelwert [h] $\pm$ SD	% Differenz zur Kontrolle	Median [h] $\pm$ SD	% Differenz zur Kontrolle	p-Wert gegen Kontrolle
Kontrolle	49,3 $\pm$ 1,5	-	48,0 $\pm$ 1,5	-	-
1 mg/ml OBE	57,9 $\pm$ 2,2	+ 17,4	48,0 $\pm$ 3,4	$\pm$ 0	0,0003
100 $\mu$ M 3-HT	52,3 $\pm$ 1,5	+ 6,1	48,0 $\pm$ 1,7	$\pm$ 0	0,1680
500 $\mu$ M 3-HT	52,0 $\pm$ 1,9	+ 5,5	48,0 $\pm$ 2,6	$\pm$ 0	0,1844
100 $\mu$ M TYR	52,8 $\pm$ 1,5	+ 7,1	48,0 $\pm$ 1,5	$\pm$ 0	0,1082
500 $\mu$ M TYR	57,5 $\pm$ 1,7	+ 16,6	48,0 $\pm$ 2,2	$\pm$ 0	0,0003

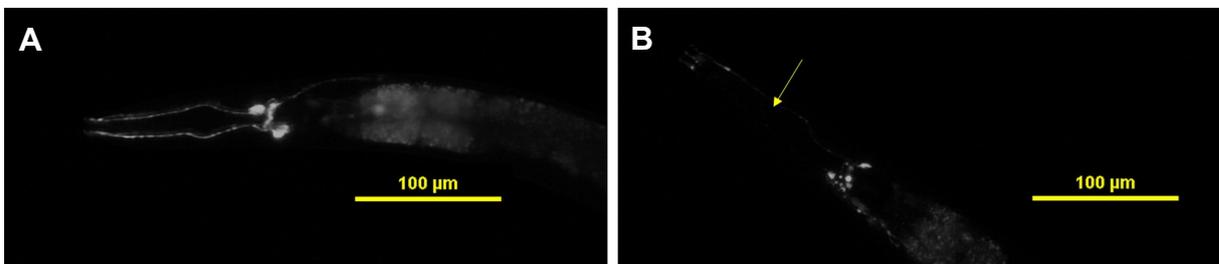
Nematoden, welche hingegen mit 100  $\mu$ M oder 500  $\mu$ M 3-HT inkubiert werden, zeigen in den Deletionsmutanten keine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Abbildung 8A). Für die Vermittlung der protektiven Wirkung von 3-HT scheint der Transkriptionsfaktor DAF-16 essentiell zu sein.

Werden die Tiere mit 500  $\mu\text{M}$  TYR inkubiert, ist auch im DAF-16-defizienten Stamm eine signifikante Verlängerung des mittleren Überlebens unter oxidativen Stressbedingungen um 16,6% von  $49,3 \pm 1,5$  h auf  $57,5 \pm 1,7$  h und somit auch eine Erhöhung der oxidativen Stressresistenz zu erkennen (Abbildung 8B, Tabelle 14). 100  $\mu\text{M}$  TYR hingegen zeigen keine signifikante Erhöhung der Resistenz gegenüber oxidativem Stress. Diese Konzentration scheint nicht mehr auszureichen, um protektive Effekte hervorzurufen.

## 4.2 Untersuchungen von OBE und seinen Inhaltsstoffen auf neuroprotektive Wirkungen im M. Parkinson Modell

### 4.2.1 Untersuchung neuroprotektiver Effekte durch OBE und seine Inhaltsstoffe nach 6-OHDA-Behandlung

Die neuroprotektiven Effekte der verschiedenen Extrakte werden mit Hilfe einer densitometrischen Messung der Kopfbereiche der Nematoden erfasst. Sind die sich hier befindlichen dopaminergen CEP-Neuronen intakt, wie in Abbildung 9A dargestellt, ist die Helligkeit dieses Bereiches höher als bei Nematoden mit kaputten Neuronen, wie in Abbildung 9B gezeigt. Die Messwerte der unbehandelten Kontrollgruppe werden auf 100% gesetzt (Abbildung 10).



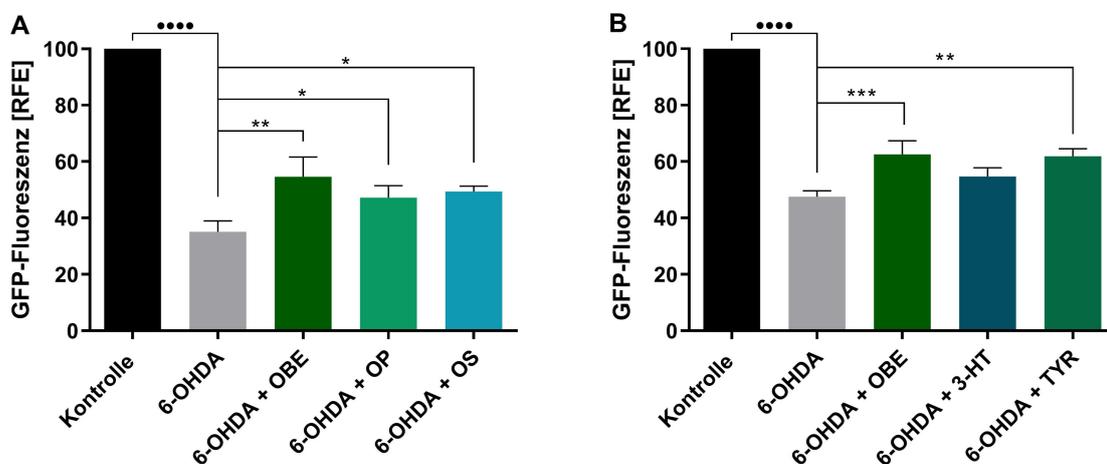
**Abbildung 9: Beispielbilder von Nematoden des Stammes BZ555.** Abgebildet ist der Kopfbereich eines Nematoden mit intakten dopaminergen Neuronen (A) und eines Nematoden mit degenerierten dopaminergen Neuronen (B, Pfeil).

Werden die Nematoden mit 6-OHDA behandelt, ist die Fluoreszenzstärke im Kopfbereich signifikant verringert. Diese Reduktion beläuft sich auf 64,9% (Abbildung 10A) bzw. 52,5% (Abbildung 10B) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Es kommt zu einer Degeneration der dopaminergen Neuronen durch 6-OHDA.

Durch eine vorherige Behandlung mit OBE kann der neurodegenerative Effekt von 6-OHDA vermindert werden. Im Vergleich zu der 6-OHDA-Kontrolle haben Nematoden, welche zuvor mit OBE behandelt werden, eine um 55,6% (Abbildung 10A) bzw. 31,7% (Abbildung 10B)

signifikant erhöhte Fluoreszenz und demnach eine verringerte Degeneration der dopaminergen Neuronen.

Im Vergleich zur 6-OHDA-Kontrolle ruft auch eine Behandlung mit OP oder OS signifikante neuroprotektive Effekte hervor. Verglichen mit Nematoden, welche mit 6-OHDA allein behandelt werden, haben Nematoden, die zuvor mit OP inkubiert werden, eine um 34,5% erhöhte Fluoreszenz (Abbildung 10A). Werden die Nematoden mit OS vorinkubiert, zeigt sich im Vergleich zur 6-OHDA-Kontrolle eine um 40,7% erhöhte Fluoreszenz der dopaminergen Neuronen im Kopfbereich. Die Effekte von OP und OS sind hierbei geringer als die Neuroprotektion, welche durch den Extrakt hervorgerufen wird (Abbildung 10A).



**Abbildung 10: Untersuchung der Neurodegeneration durch 6-OHDA im Stamm BZ555 (OBE und Inhaltsstoffe).**

Transgene Nematoden des Stammes BZ555 werden bei 20°C ab dem Eistadium mit 1 mg/ml OBE, 100 µM OP, 25 µM OS, 500 µM 3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Im L4-Larvenstadium werden sie für 2,5 h mit 6-OHDA oder Ascorbinsäure (Kontrolle) inkubiert, in M9 30 min gewaschen und für 24 h in substanzlosen Medien belassen. Anschließend werden fluoreszenzmikroskopische Fotos der Nematoden aufgenommen und mittels Image J densitometrisch ausgewertet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SD, einfaktorielles Anova mit Tukey's multiplem Vergleichstest,  $n = 3$  (je 20 Individuen pro Gruppe), \*\*\*\*  $p < 0,0001$  gegen Kontrolle; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  gegen 6-OHDA.

Keine neuroprotektive Wirkung erzeugt hingegen eine Vorbehandlung mit 3-HT, obwohl eine leichte Tendenz hinsichtlich einer positiven Wirkung über 15,2% zu erkennen ist (Abbildung 10B). TYR hingegen vermittelt wiederum neuroprotektive Effekte und verbessert die Fluoreszenz der CEP-Neuronen im Vergleich zur 6-OHDA-Kontrolle um 30,3% (Abbildung 10B).

Sowohl OBE als auch alle untersuchten Inhaltsstoffe dieses Extraktes besitzen, bis auf 3-HT, neuroprotektive Eigenschaften in diesem Experiment und schützen die dopaminergen Neuronen vor 6-OHDA (Abbildung 10).

#### **4.2.2 Untersuchung neuroprotektiver Effekte durch OBE und seine Inhaltsstoffe bei Überproduktion von Dopamin**

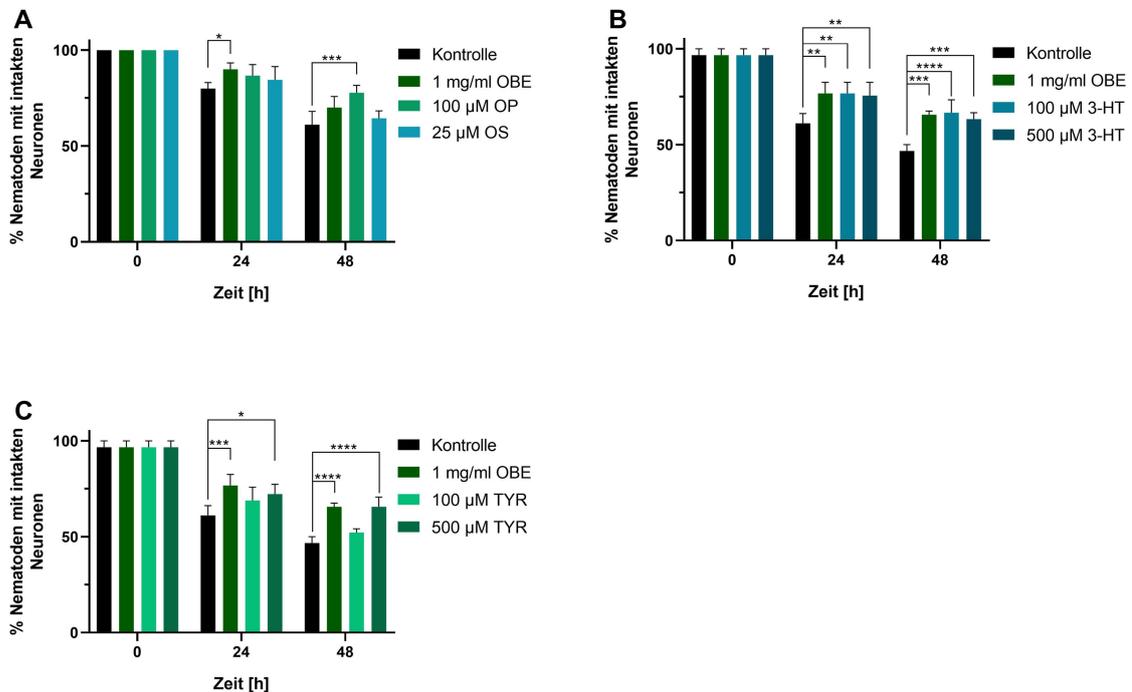
Durch die Überproduktion an Dopamin in den Neuronen werden diese mit der Zeit zerstört (MANALO und MEDINA, 2018; MASOUDI et al., 2014). Zu Beginn der Inkubation (0 h) befinden sich die Nematoden im L4-Larvenstadium, ihre Neuronen sind meist intakt (100%, Abbildung 11A; bzw. 96,67% Abbildung 11B und C; vgl. Beispielbild Abbildung 12A). Mit der Zeit nimmt die Anzahl der Nematoden mit intakten dopaminergen Neuronen in der Kontrollgruppe jedoch stetig ab. Nach 24 h sind bereits bei 20,1% (Abbildung 11A), bzw. 38,9% (Abbildung 11B und C) der Nematoden die Neuronen zerstört (vgl. Beispielbild Abbildung 12B). Nach 48 h besitzen nur noch 46,7% (Abbildung 11B und C) bis 61,1% (Abbildung 11A) der Nematoden der Kontrollgruppe intakte dopaminerge CEP-Neuronen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist in Abbildung 11A und B ersichtlich, dass durch eine Inkubation mit OBE die Neuronen vor ihrer Zerstörung geschützt werden. In den Gruppen, die mit OBE inkubiert werden, sind mehr Nematoden mit intakten Neuronen zu finden als in den entsprechenden Kontrollgruppen. Nach 24 h befinden sich in den mit OBE inkubierten Gruppen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen 12,6% (Abbildung 11A) bis 25,5% (Abbildung 11B und C) mehr Nematoden mit intakten Neuronen. Dieser Effekt ist zu diesem Zeitpunkt bereits signifikant (Abbildung 11).

Nach 48 h sind im Vergleich zur Kontrolle in der OBE-Gruppe 14,6% (Abbildung 11A) bis 40,4% (Abbildung 11B und C) mehr Nematoden mit intakten dopaminergen Neuronen vorhanden. Dieser Effekt ist in den Abbildungen 11B und C signifikant. In Abbildung 11A ist eine Tendenz hinsichtlich einer Neuroprotektion durch OBE nach 48 h sichtbar. Hier ist der Effekt jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle. OBE zeigt in den Nematoden neuroprotektive Wirkungen und schützt die dopaminergen Neuronen vor der durch eine Dopaminüberproduktion hervorgerufenen Degeneration der dopaminergen Neuronen.

Auch OP besitzt neuroprotektive Effekte (Abbildung 11A). Bereits nach 24 h ist eine tendenzielle Protektion der Neuronen sichtbar. Diese 8,5%ige Erhöhung der Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen ist hier jedoch im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant. Nach 48 h weisen in der mit OP inkubierten Gruppe 77,8% der Nematoden intakte Neuronen

auf. Dies ist im Vergleich zur Kontrolle, bei der 61,1% der Nematoden intakte Neuronen besitzen, eine Erhöhung um 27,3%.



**Abbildung 11: Untersuchung der Neurodegeneration durch eine erhöhte Dopaminsynthese im Stamm UA57 (OBE und Inhaltsstoffe).**

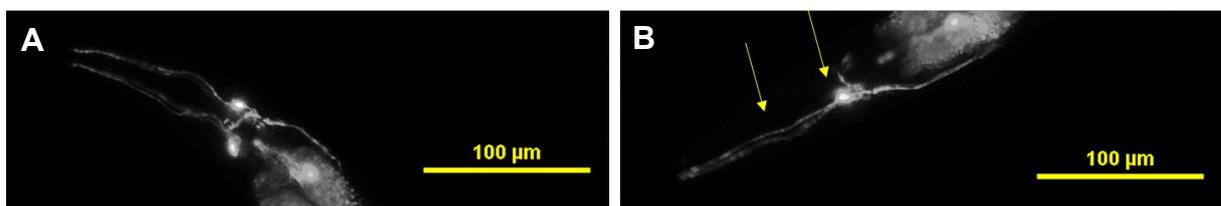
L4-Larven des transgenen Stammes UA57 werden bei 20°C mit 1 mg/ml OBE, 100 µM OP, 25 µM OS, 100 µM 3-HT oder TYR, 500 µM 3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Nach 0 h, 24 h und 48 h werden die Nematoden unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung in Nematoden mit intakten Neuronen und Nematoden mit zerstörten Neuronen unterteilt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD, einfaktorielles Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest,  $n = 3$  (je 30 Individuen pro Gruppe), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Die Daten zu OBE, OP und OS (A) entstanden im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Lucia Taube.

Eine Inkubation mit OS resultiert in keiner signifikanten Erhöhung der Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen (Abbildung 11A). Nach 24 h bzw. 48 h zeigen die Nematoden der Gruppe, welche mit OS inkubiert wird, im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Erhöhung der Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen um 5,7% bzw. 5,3%.

Eine Inkubation der Nematoden mit 3-HT führt sowohl nach 24 h als auch nach 48 h unabhängig von der eingesetzten Konzentration zu starken neuroprotektiven Effekten (Abbildung 11B). Nach 24 h ist die Anzahl der Nematoden mit intakten dopaminergen Neuronen um 25,5% (100 µM 3-HT) bzw. 23,6% (500 µM 3-HT) höher als bei den

Kontrolltieren; nach 48 h sind es 42,8% (100  $\mu$ M 3-HT) bzw. 35,6% (500  $\mu$ M 3-HT). Dieser neuroprotektive Effekt ist vergleichbar mit der Wirkung von OBE (Abbildung 11B).

Auch eine Behandlung der Nematoden mit 500  $\mu$ M TYR bewirkt mit OBE vergleichbare neuroprotektive Effekte (Abbildung 11C). Die Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen wird durch eine Inkubation mit 500  $\mu$ M TYR im Vergleich zur Kontrollgruppe um 18,2% nach 24 h bzw. um 40,4% nach 48 h erhöht. Die niedrigere Konzentration von 100  $\mu$ M TYR hat jedoch keine signifikanten neuroprotektiven Effekte im Vergleich zu den Kontrolltieren. In dieser Gruppe ist die Erhöhung der Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 12,7% nach 24 h und 11,8% nach 48 h gering.



**Abbildung 12: Beispielbilder von Nematoden des Stammes UA57.**

Abgebildet ist der Kopfbereich eines Nematoden mit intakten dopaminergen CEP-Neuronen (A) und eines Nematoden mit degenerierten dopaminergen CEP-Neuronen (B, Pfeile).

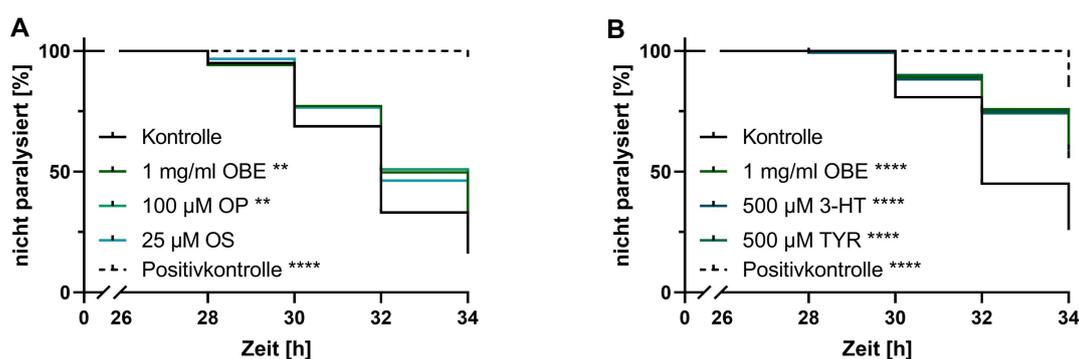
Sowohl OBE als auch seine Inhaltsstoffe OP, 3-HT und TYR besitzen neuroprotektive Effekte in Nematoden, bei denen Dopamin überproduziert wird. Eine Konzentration von 100  $\mu$ M 3-HT scheint hierbei schon den maximalen Effekt zu erzielen, wohingegen bei TYR erst bei einer Konzentration von 500  $\mu$ M neuroprotektive Wirkungen zu sehen sind.

### 4.3 Untersuchungen von OBE und seinen Inhaltsstoffen auf neuroprotektive Wirkungen im M. Alzheimer Modell

#### 4.3.1 Modulation der $A\beta_{1-42}$ -Toxizität durch OBE und seine Inhaltsstoffe

Durch die Expression von humanem  $A\beta_{1-42}$  in den Muskelwandzellen der Nematoden kommt es mit der Zeit zur Paralyse der Kontrolltiere (Abbildung 13). Verlängert sich die Zeit bis zum Eintreten der Paralyse im Vergleich zur Kontrolle bedeutet dies, dass sich die Toxizität von  $A\beta_{1-42}$  durch die entsprechende Behandlung verringert haben könnte.

Die Positivkontrolle zeigt eine starke Verzögerung der  $A\beta_{1-42}$ -bedingten Paralyse (Abbildung 13). Diese Verzögerung ist so stark, dass der Median nicht berechnet werden kann (Abbildung 13; Tabelle 15).



**Abbildung 13: A $\beta$ -Toxizitätstest (OBE und Inhaltsstoffe).**

Transgene Nematoden des Stammes CL4176 werden bei 16°C ab dem Eistadium mit 1 mg/ml OBE, 100  $\mu$ M OP, 25  $\mu$ M OS, 500  $\mu$ M 3-HT oder TYR, 5 mM Koffein als Positivkontrolle oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. L3-Larven werden auf Agarplatten mit OP50 überführt und bei 25°C gelagert. Nach 26, 28, 30, 32 und 34 h werden die Nematoden auf eine eingetretene Paralyse hin untersucht. Verglichen werden die Überlebenskurven mit einer Kaplan-Meier-Statistik;  $n = 3$  (je 40 Individuen pro Gruppe); Log-Rank (Mantel-Cox) Test; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Die Daten zu OBE, OP und OS (A) entstanden im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Lucia Taube, die zu OBE, 3-HT und TYR im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Alicia Chisari (B).

Im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe bewirkt eine Behandlung mit OBE ebenfalls eine signifikant verzögerte Paralyse (Abbildung 13). Die Verlängerung der mittleren Paralysezeit beträgt 0,5 h (Abbildung 13A) bzw. 0,8 h (Abbildung 13B) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Dies entspricht einer prozentualen Verzögerung der eintretenden Paralyse um 1,6% bzw. 2,5% (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der A $\beta$ -bedingten Paralyse der Nematoden des Stammes CL4176 (OBE und Inhaltsstoffe).**

Behandlung	Mittelwert [h] $\pm$ SD	% Differenz zur Kontrolle	Median [h] $\pm$ SD	% Differenz zur Kontrolle	p-Wert gegen Kontrolle
Kontrolle	31,9 $\pm$ 0,2	-	32,0 $\pm$ 0,2	-	-
1 mg/ml OBE	32,4 $\pm$ 0,2	+ 1,6	32,0 $\pm$ 0,4	$\pm$ 0	0,010
100 $\mu$ M OP	32,5 $\pm$ 0,2	+ 1,9	34,0 $\pm$ 0,3	+ 6,3	0,009
25 $\mu$ M OS	32,4 $\pm$ 0,2	+ 1,6	32,0 $\pm$ 0,3	$\pm$ 0	0,083
Positivkontrolle	34,0 $\pm$ 0,0	+ 6,6	-	-	< 0,0001
Kontrolle	32,5 $\pm$ 0,1	-	32,0	-	-
1 mg/ml OBE	33,3 $\pm$ 0,1	+ 2,5	-	-	< 0,0001
500 $\mu$ M 3-HT	33,2 $\pm$ 0,1	+ 2,2	-	-	< 0,0001
500 $\mu$ M TYR	33,3 $\pm$ 0,1	+ 2,5	-	-	< 0,0001
Positivkontrolle	34,0 $\pm$ 0,0	+ 4,6	-	-	< 0,0001

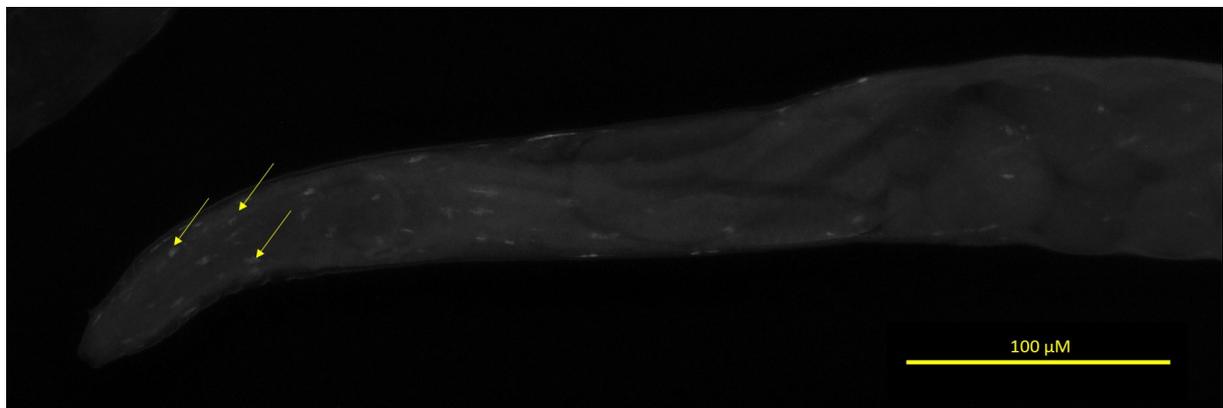
Auch der Inhaltsstoff OP verzögert das Eintreten der Paralyse signifikant (Abbildung 13A). Hier wird die mittlere Paralysezeit im Vergleich zur Kontrolle von  $31,9 \pm 0,2$  h auf  $32,5 \pm 0,2$  h um 0,5 h verlängert. Eine Behandlung mit OS führt zu einer dem OP sehr ähnlichen Verzögerung der Paralysezeit um 0,4 h. Diese ist jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 13A, Tabelle 15).

Auch 3-HT und TYR verursachen eine signifikante zeitliche Verzögerung bis zum Eintreten der Paralyse der Nematoden (Abbildung 13B). Im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkt 3-HT eine Verlängerung der Zeit bis zum Eintreten der Paralyse um 0,7 h und TYR um 0,8 h. Dies entspricht einer Verzögerung der Paralysezeit um 2,2 bzw. 2,5% (Tabelle 15).

Sowohl der OBE selbst als auch seine Inhaltsstoffe OP, 3-HT und TYR sind in der Lage die  $A\beta_{1-42}$ -bedingte Paralyse zu verzögern und somit die Toxizität von  $A\beta_{1-42}$  zu verringern.

#### 4.3.2 Modulation der $A\beta_{1-42}$ -Plaques durch OBE und seine Inhaltsstoffe

Um herauszufinden, ob der OBE und seine Inhaltsstoffe einen Einfluss auf die Anzahl der Plaques, welche durch eine Expression und Akkumulation humaner  $A\beta_{1-42}$ -Peptide entstehen, besitzt, werden die Plaques der Nematoden gezählt. Anhand der gelben Pfeile werden in Abbildung 14 beispielhaft  $A\beta_{1-42}$ -Plaques markiert.

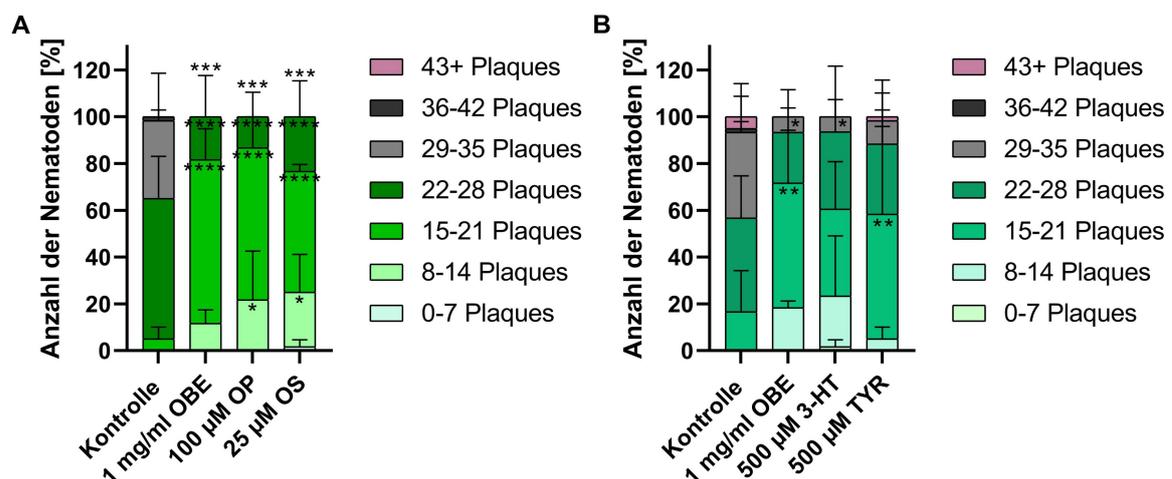


**Abbildung 14: Beispielbild eines Nematoden des Stammes CL2006.**  
Abgebildet ist der Kopfbereich eines Nematoden mit  $A\beta$ -Plaques (Pfeile, beispielhaft).

Die Anzahl der Plaques der Kontrolltiere beläuft sich im Mittel auf  $27,2 \pm 1,3$  bzw.  $27,9 \pm 4,7$  Plaques pro Nematode (Tabelle 16). Werden die Nematoden zuvor mit OBE behandelt, kommt es zu einer deutlichen Abnahme der mittleren Plaque-Anzahl um 32,7% bzw. 30,5% (Tabelle 16).

Da die Anzahl der Plaques in den Nematoden großen Schwankungen unterlegen ist, werden die Nematoden gemäß der Anzahl der in ihnen vorhandenen Plaques in Gruppen unterteilt.

Betrachtet man die Anzahl der Nematoden, welche eine bestimmte Menge an Plaques haben, stellt man fest, dass Nematoden, die mit OBE inkubiert werden, im Vergleich zu den Kontrolltieren vermehrt eine niedrigere Plaque-Anzahl aufweisen. So gibt es in den Kontrollgruppen keine Nematoden mit weniger als 15 Plaques im Kopf- und Schwanzbereich (Abbildung 15). Die mit 1 mg/ml OBE behandelten Nematoden hingegen besitzen in 11,7% bis 18,3% der Fälle 8-14 Plaques. Zudem ist die Anzahl an Nematoden mit 15-21 Plaques durch eine Behandlung mit OBE im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 15). Dahingegen ist die Anzahl der Nematoden mit 29-35 Plaques in den mit OBE inkubierten Nematoden im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant verringert (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Verteilung der Anzahl der Aβ<sub>1-42</sub>-Plaques in Nematoden des transgenen Stammes CL2006 (OBE und Inhaltsstoffe).**

Nematoden des Stammes CL2006, welche Aβ<sub>1-42</sub>-Plaques bilden, werden ab dem L4-Larvenstadium für 48 h bei 20°C mit 1 mg/ml OBE, 100 µM OP, 25 µM OS, 500 µM 3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Anschließend werden die Nematoden mit 4% PFA fixiert, permeabilisiert und mit Thioflavin-S gefärbt. Die Anzahl der Aβ<sub>1-42</sub>-Plaques im Kopf- und Schwanzbereich der Tiere wird gezählt. Es erfolgt eine Klassifizierung der Nematoden nach der Anzahl ihrer Plaques. Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte der Anzahl der Nematoden in der einzelnen Klasse ± SD, zweifaktorielle Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest, n = 3 (je 20 Individuen pro Gruppe), \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001. Die Daten zu OBE, 3-HT und TYR entstanden im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Feline Frahm.

Eine Behandlung der Nematoden mit OP führt zu einer im Vergleich zur Kontrolle um 34,9% signifikant verringerten mittleren Plaque-Anzahl (Tabelle 16). OP erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren die Anzahl an Nematoden mit 8-14 oder 15-21 Plaques signifikant, wohingegen

die Anzahl an Tieren mit einer hohen Anzahl an Plaques von 22-28 und 29-35 Plaques signifikant verringert wird (Abbildung 15A). Durch eine Behandlung der Nematoden mit OS zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein ähnliches Bild. Die mittlere Anzahl an Plaques ist signifikant um 33,5% verringert (Tabelle 16). Die OS erhöht die Anzahl an Nematoden mit 8-14 und 15-21 Plaques und verringert gleichzeitig die Anzahl an Nematoden mit 22-28 oder 29-35 Plaques im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Abbildung 15A).

Durch eine Behandlung der Nematoden mit 500  $\mu$ M 3-HT oder TYR kommt es zwar zu einer deutlichen Verringerung der mittleren Anzahl an Plaques im Kopf- und Schwanzbereich der Nematoden um 31,2% (500  $\mu$ M 3-HT) oder 22,9% (500  $\mu$ M TYR) im Vergleich zur Kontrolle, diese ist jedoch statistisch nicht signifikant (Tabelle 16).

**Tabelle 16: Mittelwerte und p-Werte der Anzahl an  $A\beta_{1-42}$ -Plaques in den Kopf- und Schwanzbereichen der Nematoden des Stammes CL2006 (OBE und Inhaltsstoffe).**

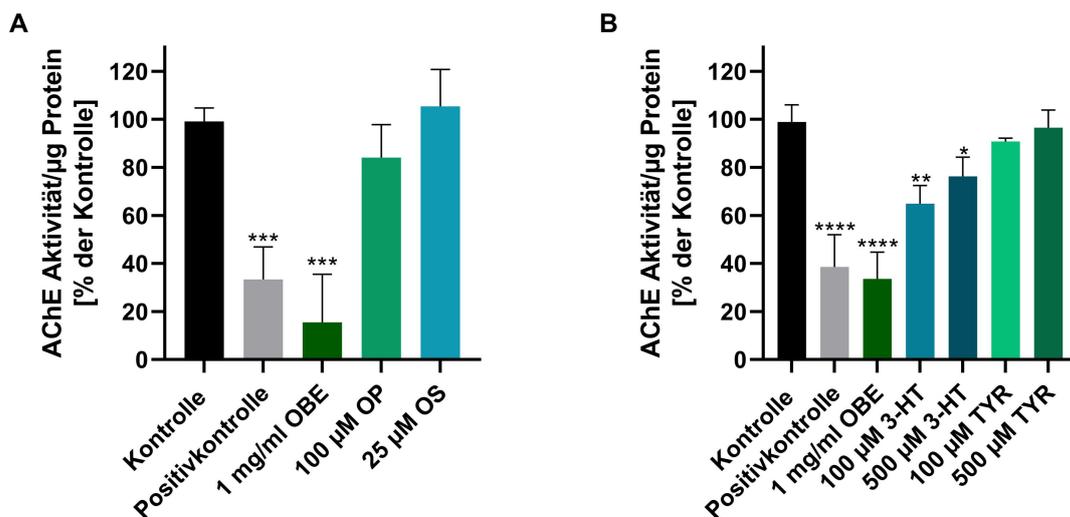
Behandlung	Mittelwert $\pm$ SD	% Differenz zur Kontrolle	p-Wert gegen Kontrolle
Kontrolle	27,2 $\pm$ 1,3	-	-
1 mg/ml OBE	18,3 $\pm$ 1,1	- 32,7	0,002
100 $\mu$ M OP	17,7 $\pm$ 2,4	- 34,9	0,001
25 $\mu$ M OS	18,1 $\pm$ 2,6	- 33,5	0,001
Kontrolle	27,9 $\pm$ 4,7	-	-
1 mg/ml OBE	19,4 $\pm$ 2,1	- 30,5	0,109
500 $\mu$ M 3-HT	19,2 $\pm$ 4,8	- 31,2	0,099
500 $\mu$ M TYR	21,5 $\pm$ 5,3	- 22,9	0,251

Wird die Einteilung der Nematoden nach der Anzahl der gebildeten Plaques betrachtet, ist ersichtlich, dass durch eine Inkubation mit 3-HT im Vergleich zur Kontrolle, bei der kein Nematode mit weniger als 15 Plaques zu sehen ist, mehr Nematoden eine geringe Plaque-Anzahl von unter 15 aufweisen (Abbildung 15B). Dieser Effekt ist jedoch statistisch nicht signifikant. Durch eine Behandlung mit 3-HT kommt es aber zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl an Nematoden mit 29-35 Plaques im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 15B). Betrachtet man die Nematoden, welche mit TYR behandelt werden, zeigt sich eine signifikante Zunahme der Tiere mit 15-21 Plaques und eine Abnahme der Tiere mit 29-35 Plaques im Vergleich zu den Kontrolltieren.

### 4.3.3 Einfluss von OBE und seinen Inhaltsstoffen auf die Aktivität der AChE

Die Aktivität der AChE wird untersucht, um etwaige inhibierende Effekte der Extrakte zu erkennen.

Durch die Positivkontrolle Aldicarb wird die Aktivität der AChE der Nematoden im Vergleich zur Kontrolle um 66,3% bzw. 60,9% auf 33,4% bzw. 38,6% verringert (Abbildung 16A bzw. B).



**Abbildung 16: Bestimmung der AChE-Aktivität (OBE und Inhaltsstoffe).**

Das Homogenat von 3000 bis 4000 wildtypischen L4-Larven wird mit 1 mg/ml OBE, 100 µM OP, 25 µM OS, 100 µM 3-HT oder TYR, 500 µM 3-HT oder TYR, 100 µM Aldicarb als Positivkontrolle oder DMSO als Kontrolle in eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend werden in alle belegten Wells 200 µl einer Lösung mit Acetylthiocholiniodid und DTNB hinzugegeben und die Absorption bei 406 nm alle 30 Minuten für 24 Stunden gemessen. In einem 10 h-Intervall mit möglichst linearem Anstieg der Absorption wird die Steigung der Geraden errechnet, was der Aktivität der AChE entspricht. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD, normiert auf die erste von zwei Kontrollen, pro µg Protein, einfaktorielle Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest,  $n = 3$ , \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Die Daten zu OBE, OP und OS (A) entstanden im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Lucia Taube, die zu OBE, 3-HT und TYR im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Alicia Chisari.

Eine ähnlich starke Inhibition der AChE zeigt der OBE in Abbildung 16B: hier kommt es zu einer Verringerung der AChE-Aktivität auf 33,5% der Kontrolle. Der inhibierende Effekt von OBE in Abbildung 16A ist im Vergleich dazu tendenziell etwas stärker, jedoch mit einer hohen Standardabweichung versehen. Hier kommt es im Vergleich zur Kontrolle zu einer Inhibition um 84,4%. Die inhibierenden Effekte der Positivkontrolle Aldicarb und OBE sind im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant (Abbildung 16).

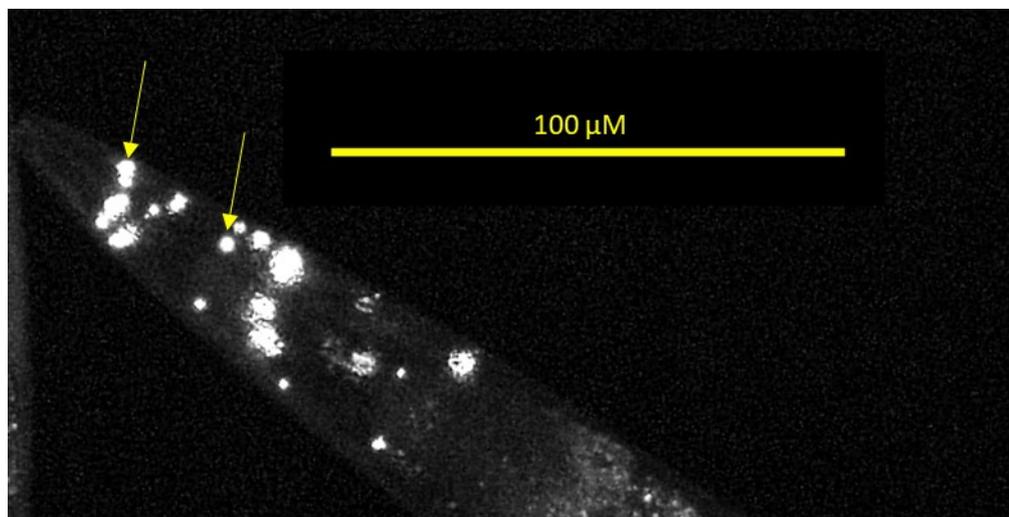
Die im OBE enthaltenen Substanzen OP und OS besitzen keine signifikanten inhibierenden Effekte (Abbildung 16A), wobei eine tendenzielle Abnahme der AChE-Aktivität durch OP um 15,2% zu erkennen ist.

Bei der Untersuchung weiterer Inhaltsstoffe des OBE ist ersichtlich, dass TYR nicht in der Lage ist, die Aktivität der AChE zu inhibieren (Abbildung 16B). 3-HT hingegen verursacht in beiden untersuchten Konzentrationen eine signifikante Inhibition der AChE (Abbildung 16B). Im Vergleich zur Kontrolle führen 100  $\mu\text{M}$  3-HT zu einer Inhibition um 34,3% und 500  $\mu\text{M}$  3-HT zu einer Inhibition um 22,8%. Die geringere Konzentration des 3-HT zeigt hierbei tendenziell eine stärkere Inhibition der AChE, der Unterschied der Inhibitionsstärke der beiden Konzentrationen an 3-HT ist jedoch nicht statistisch signifikant.

#### 4.4 Untersuchungen von OBE und seinen Inhaltsstoffen auf neuroprotektive Wirkungen im C. Huntington Modell

##### 4.4.1 Modulation der PolyQ-Plaques durch OBE und seine Inhaltsstoffe

Bei der Untersuchung der im transgenen *C. elegans* Stamm EAK103 gebildeten PolyQ-Plaques werden diese in den Köpfen der Nematoden ausgezählt. Ein Beispielbild eines Nematoden mit PolyQ-Plaques im Kopfbereich ist in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Beispielbild eines Nematoden des Stammes EAK103.** Abgebildet ist der Kopfbereich eines Nematoden mit durch Fragmente eines mutierten humanen Huntingtinproteins hervorgerufenen Plaques (Pfeile, beispielhaft).

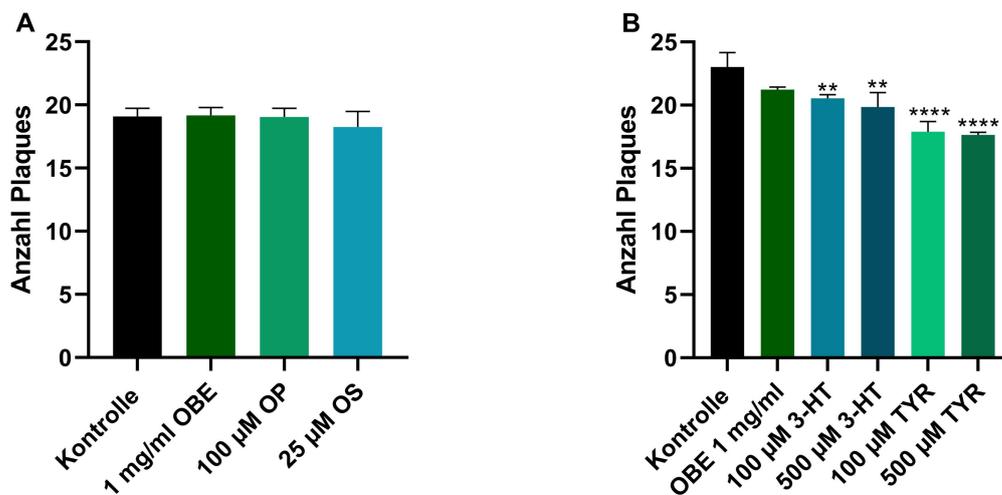
Die Streuung der Plaque-Anzahl in den Nematoden ist gering, weshalb die Mittelwerte betrachtet werden und die Nematoden nicht gemäß ihrer Plaque-Anzahl in Gruppen unterteilt werden. Nematoden, welche ohne OBE oder seine Inhaltsstoffe inkubiert werden, besitzen im Mittel 19,1 (Abbildung 18A) bis 23,0 Plaques (Abbildung 18B). Eine Inkubation mit OBE verringert die Anzahl der Plaques in den Köpfen der Nematoden nicht signifikant. In Abbildung 18A ist kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (im Mittel 19,1 Plaques) und der mit OBE inkubierten Gruppe (im Mittel 19,2 Plaques) vorhanden. In Abbildung 18B hingegen lässt sich eine leichte Verringerung der Anzahl an Plaques durch OBE erkennen. Diese ist jedoch statistisch nicht signifikant. Die mit OBE inkubierten Nematoden haben im Mittel 21,2 Plaques, während die Kontrolltiere 23,0 Plaques besitzen.

Auch die beiden Einzelsubstanzen OP und OS bewirken keine Reduktion der Anzahl an PolyQ-Plaques. Im Mittel haben die Nematoden, welche mit OP behandelt werden, genau wie die Kontrolltiere 19,1 Plaques. Durch eine Inkubation mit OS bilden sich im Mittel 18,3 Plaques in den Köpfen der Nematoden.

3-HT und TYR hingegen bewirken eine signifikant verringerte Anzahl an Plaques in den Köpfen der Tiere (Abbildung 18B). Nematoden, die mit 100  $\mu\text{M}$  3-HT behandelt werden, besitzen im Mittel nur 20,5 Plaques. Inkubiert man die Nematoden mit 500  $\mu\text{M}$  3-HT, verringert sich die Anzahl der Plaques in ihren Köpfen auf 19,8 Plaques. Dies entspricht einer prozentualen Reduktion der Plaque-Anzahl um 13,9% im Vergleich zur Kontrolle.

Eine Behandlung mit TYR bewirkt im Vergleich zur Kontrolle den stärksten Rückgang der Plaque-Anzahl. Tiere, welche mit 100  $\mu\text{M}$  TYR behandelt werden, weisen im Mittel 17,9 Plaques auf. Nematoden, die mit 500  $\mu\text{M}$  TYR inkubiert werden, zeigen im Mittel eine ähnliche Anzahl an Plaques (17,6 Plaques). Dies gleicht einer Reduktion der Anzahl an Plaques um 22,2% (100  $\mu\text{M}$  TYR) bzw. 23,5% (500  $\mu\text{M}$  TYR) im Vergleich zur Kontrolle.

Weder OBE noch seine Inhaltsstoffe OP oder OS verringern die Anzahl an PolyQ-Plaques in den Köpfen der Nematoden. 3-HT und TYR hingegen bewirken eine signifikante Reduktion dieser Plaques.

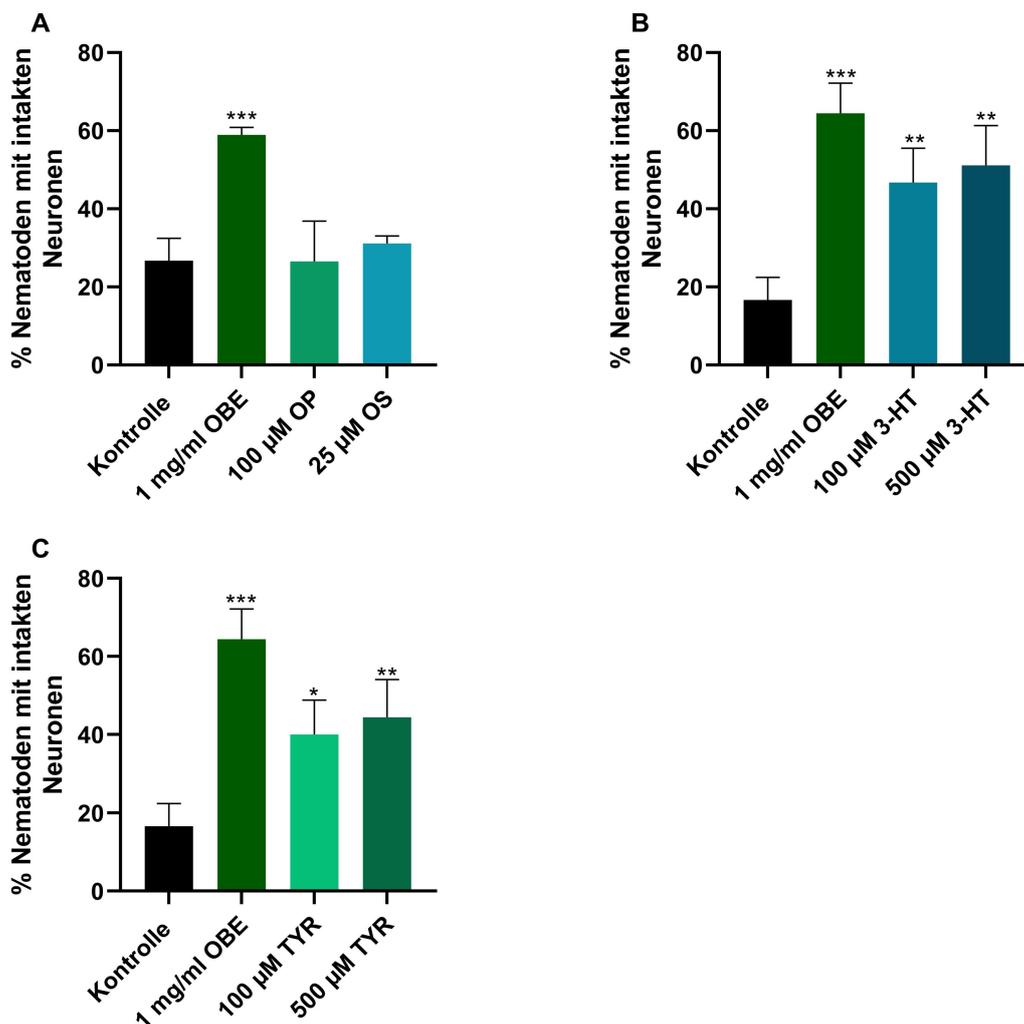


**Abbildung 18: Untersuchung der durch Fragmente eines mutierten humanen Huntingtinproteins hervorgerufenen Plaquebildung im Stamm EAK103 (OBE und Inhaltsstoffe).** Transgene Nematoden des Stammes EAK103 werden bei 20°C ab dem Eistadium mit 1 mg/ml OBE, 100 µM OP, 25 µM OS, 100 µM 3-HT oder TYR, 500 µM 3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. An Tag 3 nach Beginn der Inkubation wird die Anzahl der Plaques unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung gezählt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SD, einfaktorielle Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest,  $n = 3$  (je 20 Individuen pro Gruppe), \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.4.2 Modulation der PolyQ-bedingten Neurodegeneration durch OBE und seine Inhaltsstoffe

Durch die Expression von humanem N-terminalen Huntingtin in den ASH-Neuronen der Nematoden werden mit der Zeit eben diese Neuronen zerstört: Zum Zeitpunkt der Untersuchung der Nematoden an Tag 10 sind nur noch bei 26,7% (Abbildung 19A) bzw. bei 16,7% (Abbildung 19B und C) der Nematoden der jeweiligen Kontrollgruppen die Neuronen vollständig intakt. In Abbildung 20 ist der Kopfbereich eines Nematoden mit intakten ASH-Neuronen (A) und eines Nematoden mit degenerierten ASH-Neuronen (B) dargestellt.

Eine Inkubation mit OBE jedoch bewirkt eine deutliche Reduktion der Neurodegeneration. Im Vergleich zu den Kontrolltieren scheinen die mit OBE behandelten Nematoden besser vor der PolyQ-bedingten Neurodegeneration geschützt zu sein. Bei 58,9% (Abbildung 19A) bzw. bei 64,4% (Abbildung 19B und C) der Nematoden sind die Neuronen intakt. Dies ist im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen eine signifikante Verbesserung der Neurodegeneration um das Doppelte (+ 120,6%; Abbildung 19A) bzw. um das Vierfache (+ 385,6%; Abbildung 19B und C).



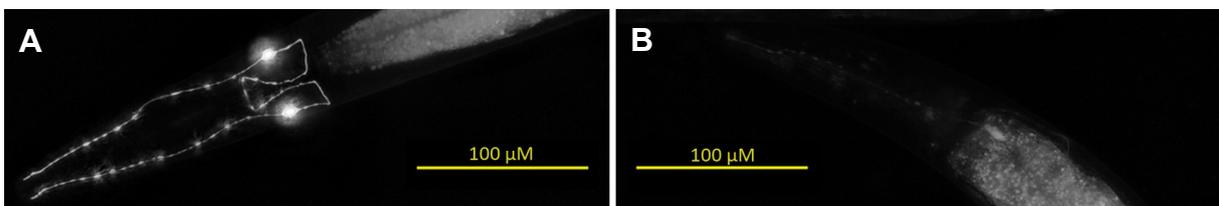
**Abbildung 19: Untersuchung der durch Fragmente des humanen Huntingtins hervorgerufenen Neurodegeneration im Stamm HA659 (OBE und Inhaltsstoffe).**

Transgene Nematoden des Stammes HA659 werden bei 20°C ab dem Eistadium mit 1 mg/ml OBE, 100 µM OP, 25 µM OS, 100 µM 3-HT oder TYR, 500 µM 3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Die Medien werden alle 2-3 Tage gewechselt. Ab dem L4-Stadium werden die Nematoden zusätzlich mit FUDR behandelt. An Tag 10 nach Beginn der Inkubation werden die Nematoden unter fluorezenzmikroskopischer Betrachtung in Nematoden mit intakten Neuronen und Nematoden mit zerstörten Neuronen unterteilt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SD, einfaktorielle Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest,  $n = 3$  (je 30 Individuen pro Gruppe), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Während der OBE die Degeneration der Neuronen stark verringert, besitzen seine Inhaltsstoffe OP und OS keine neuroprotektiven Eigenschaften in diesem Modell (Abbildung 19A). Es kommt zu keiner signifikanten Erhöhung der Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen. Bei einer Inkubation mit OP besitzen noch 26,5% der Nematoden intakte

Neuronen. Die Inkubation mit OS vermindert die Neurodegeneration zumindest in geringem Maß im Vergleich zur Kontrolle: 31,1% der Nematoden besitzen intakte Neuronen.

3-HT und TYR hingegen besitzen neuroprotektive Effekte (Abbildung 19B und C). Im Vergleich zu den Kontrolltieren hat die Gruppe, die mit 100  $\mu\text{M}$  3-HT inkubiert wird, eine 2,8-fach höhere Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen (Abbildung 19B). Werden die Nematoden mit 500  $\mu\text{M}$  3-HT inkubiert, führt das zu einer 3,1-fach höheren Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen an 3-HT ist jedoch marginal. Es zeigen 46,7% bei 100  $\mu\text{M}$  3-HT bzw. 51,1% bei 500  $\mu\text{M}$  3-HT der Nematoden intakte Neuronen.



**Abbildung 20: Beispielbilder von Nematoden des Stammes HA659.**

Abgebildet ist der Kopfbereich eines Nematoden mit intakten ASH-Neuronen (A) und eines Nematoden mit degenerierten ASH-Neuronen (B).

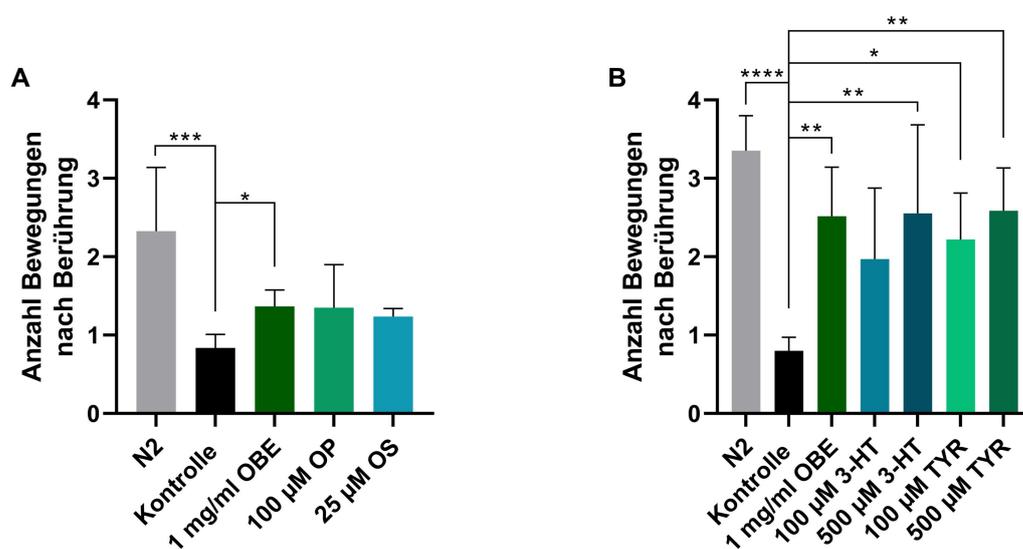
Eine Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  oder 500  $\mu\text{M}$  TYR äußert sich in einer ähnlich starken Neuroprotektion, wie sie auch 3-HT entsteht (Abbildung 19B und C). 100  $\mu\text{M}$  TYR bewirkt im Vergleich zur Kontrolle eine Erhöhung der Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen um das 2,4-Fache, während 500  $\mu\text{g/ml}$  TYR eine Erhöhung um das 2,7-Fache bewirkt (Abbildung 19B). In Prozent bedeutet das, dass durch 100  $\mu\text{M}$  TYR 40,0% und durch 44,4% 500  $\mu\text{M}$  TYR der Nematoden intakte Neuronen besitzen.

#### 4.4.3 Einfluss von OBE und seinen Inhaltsstoffen auf die Reaktionsfähigkeit der Nematoden auf mechanische Stimuli

Durch die Degeneration der ASH-Neuronen sind die Nematoden weniger gut in der Lage noxische Stimuli wahrzunehmen und darauf adäquat zu reagieren. Dies wird in Abbildung 21 deutlich: Werden Nematoden des wildtypischen Stammes an Tag 10 nach dem Eistadium an ihrer Schnauze berührt machen diese mehrere Rückwärtsbewegungen weg vom Stimulus. Nematoden des Stammes HA659, welche zum Zeitpunkt der Messung ebenfalls 10 Tage alt sind und wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben wird, unter einer starken Degeneration der ASH-Neuronen leiden, machen im Vergleich zu den wildtypischen Nematoden eine deutlich verringerte Anzahl an Rückwärtsbewegungen. Diese Nematoden sind folglich nicht mehr in

der Lage in adäquater Weise auf den Stimulus zu reagieren und machen im Mittel nur 0,8 Bewegungen rückwärts, um sich von dem noxischen Reiz zu entfernen (Abbildung 21). Der Unterschied in der Reaktionsfähigkeit zwischen den wildtypischen Nematoden und den Kontrolltieren des HA659-Stammes ist statistisch signifikant.

Werden Nematoden des Stammes HA659 während der 10 Tage bis zur Testung mit 1 mg/ml OBE behandelt, zeigen diese signifikant bessere Reaktionsstärken als die Kontrolltiere dieses Stammes (Abbildung 21). Mit OBE behandelte Nematoden machen 1,5 (Abbildung 21A) bzw. 3,8 (Abbildung 21B) Rückwärtsbewegungen.



**Abbildung 21: Untersuchung der durch Fragmente des humanen Huntingtins hervorgerufenen Reduzierung der nozizeptorischen Wahrnehmung im Stamm HA659 (OBE und Inhaltsstoffe).**

Transgene Nematoden des Stammes HA659 werden bei 20°C ab dem Eistadium mit 1 mg/ml OBE, 100 µM OP, 25 µM OS, 100 µM 3-HT oder TYR, 500 µM 3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Die Medien werden alle 2-3 Tage gewechselt. Ab dem L4-Stadium werden die Nematoden zusätzlich mit FUDR behandelt. An Tag 10 nach Beginn der Inkubation werden die Nematoden an ihrer Schnauze berührt und die Rückwärtsbewegungen gezählt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SD an Tag 10, zweifaktorielle Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest (an den Tagen 10, 12 und 14 bzw. 5, 7 und 10; gesamte Grafik dargestellt in Kapitel 9.5),  $n = 3$  (je 10 Individuen pro Gruppe), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Die Daten zu OBE, 3-HT und TYR (B) entstanden im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Alicia Chisari.

Auch eine Behandlung mit 100 µM OP bewirkt eine Verbesserung der Reaktion auf den noxischen Stimulus (Abbildung 21A). Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant. Ein ähnliches Bild zeigt sich durch eine Inkubation der Nematoden mit 25 µM OS (Abbildung 21). Auch dieser Effekt ist nicht signifikant. Die Anzahl der Rückwärtsbewegungen der Nematoden, welche mit OP oder OS behandelt werden, beträgt 1,4 bzw. 1,2.

Durch eine Behandlung mit 500  $\mu\text{M}$  3-HT kommt es zu einer signifikanten Verbesserung der Reaktion der Nematoden auf einen mechanischen Reiz an ihrer Schnauze. Sie machen im Mittel 3,8 Rückwärtsbewegungen. Eine Behandlung der Nematoden mit der niedrigeren Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  3-HT resultiert hingegen nicht in einer signifikanten Verbesserung der Reaktion, eine Tendenz ist jedoch erkennbar (Abbildung 21B). Durch die Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  oder 500  $\mu\text{M}$  TYR machen die Nematoden eine signifikant erhöhte Anzahl an Rückwärtsbewegungen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 21B). Sie bewegen sich 3,4 (100  $\mu\text{M}$  TYR) bzw. 3,5 (500  $\mu\text{M}$  TYR) Bewegungen rückwärts.

Sowohl OBE als auch 3-HT und TYR sind in der Lage, die Reaktionsfähigkeit der Nematoden signifikant zu verbessern.

#### **4.5 Allgemeine Untersuchungen verschiedener Extrakte zu antioxidativen Wirkungen und Stressresistenz**

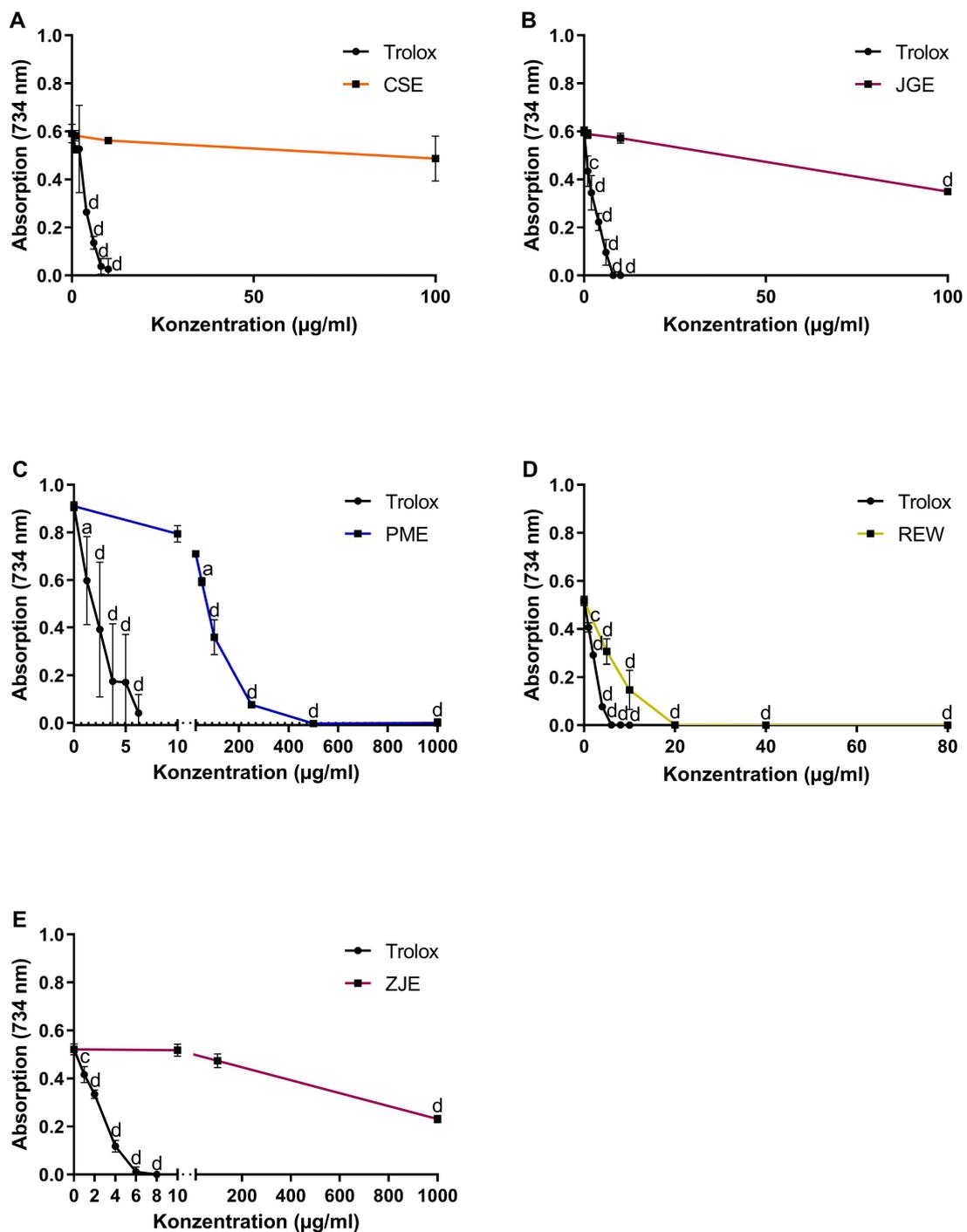
Die Daten zu antioxidativen Wirkungen und zur Stressresistenz entstanden in den im Rahmen dieser Dissertation betreuten Abschlussarbeiten von Frau Jennifer Matzner (CSE), Frau Jennifer Wermann (JGE) und Frau Clara Brauer (ZJE). Die Daten zu REW entstammen größtenteils der Abschlussarbeit von Frau Stephanie Storbeck.

##### **4.5.1 Antioxidative Effekte verschiedener Extrakte**

**Antioxidative Eigenschaften *in vitro*.** Das Vitamin E Derivat Trolox ist ein starkes Antioxidans. Dies zeigt sich auch in den mit den Extrakten im Vergleich zu Trolox durchgeführten Experimenten zur antioxidativen Kapazität *in vitro*, wie in Abbildung 22 zu sehen ist. Generell kann hier abgelesen werden, dass Trolox stärkere antioxidative Eigenschaften besitzt, als die hier untersuchten Extrakte.

Der CSE besitzt *in vitro* in den hier eingesetzten Konzentrationen keinerlei antioxidative Eigenschaften (Abbildung 22A). Auch mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  CSE gibt es keine Abnahme der Absorption und somit keine radikalfangende Wirkung des Extraktes.

Anders sieht es bei einer Untersuchung des JGE aus (Abbildung 22B). Eine Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  besitzt eine signifikante radikalfangende Wirkung. Im Vergleich zu Trolox ist die antioxidative Kapazität von JGE jedoch deutlich geringer: Während es durch 10  $\mu\text{g/ml}$  Trolox zu einer vollständigen Entfärbung der radikalischen Lösung und somit zu einer sehr starken antioxidativen Wirkung kommt, zeigt die gleiche Konzentration an JGE (10  $\mu\text{g/ml}$ ) keine Veränderung der Absorption im Vergleich zur Kontrolle.



**Abbildung 22: Radikalfangende Eigenschaften (TEAC-Assay; verschiedene Extrakte).**

Im zellfreien TEAC-Assay werden die radikalfangenden Eigenschaften von verschiedenen Konzentrationen der unterschiedlichen Extrakte bzw. DMSO als Kontrolle im Vergleich zum synthetischen Vitamin E Derivat Trolox untersucht. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3$ , einfaktorielles Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest gegen Trolox 0  $\mu\text{g/ml}$ ; a:  $p < 0,05$ ; b:  $p < 0,01$ ; c:  $p < 0,001$ ; d:  $p < 0,0001$ . CSE = Crocus sativus Extrakt; JGE = Jiaogulan Extrakt; PME = Polygonum multiflorum Extrakt; REW = Rosmarinextrakt; ZJE = Ziziphus jujuba Extrakt.

Auch PME hat *in vitro* antioxidative Wirkungen, welche jedoch deutlich schwächer sind als die der Vergleichssubstanz Trolox (Abbildung 22C). Erst ab einer Konzentration von 50 µg/ml PME kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Absorption und somit zu einer antioxidativen Wirkung. Erst bei einer Konzentration von 500 µg/ml PME findet eine vollständige Entfärbung der radikalischen Lösung durch den Extrakt statt. PME zeigt *in vitro* folglich erst in höheren Konzentrationen antioxidative Effekte.

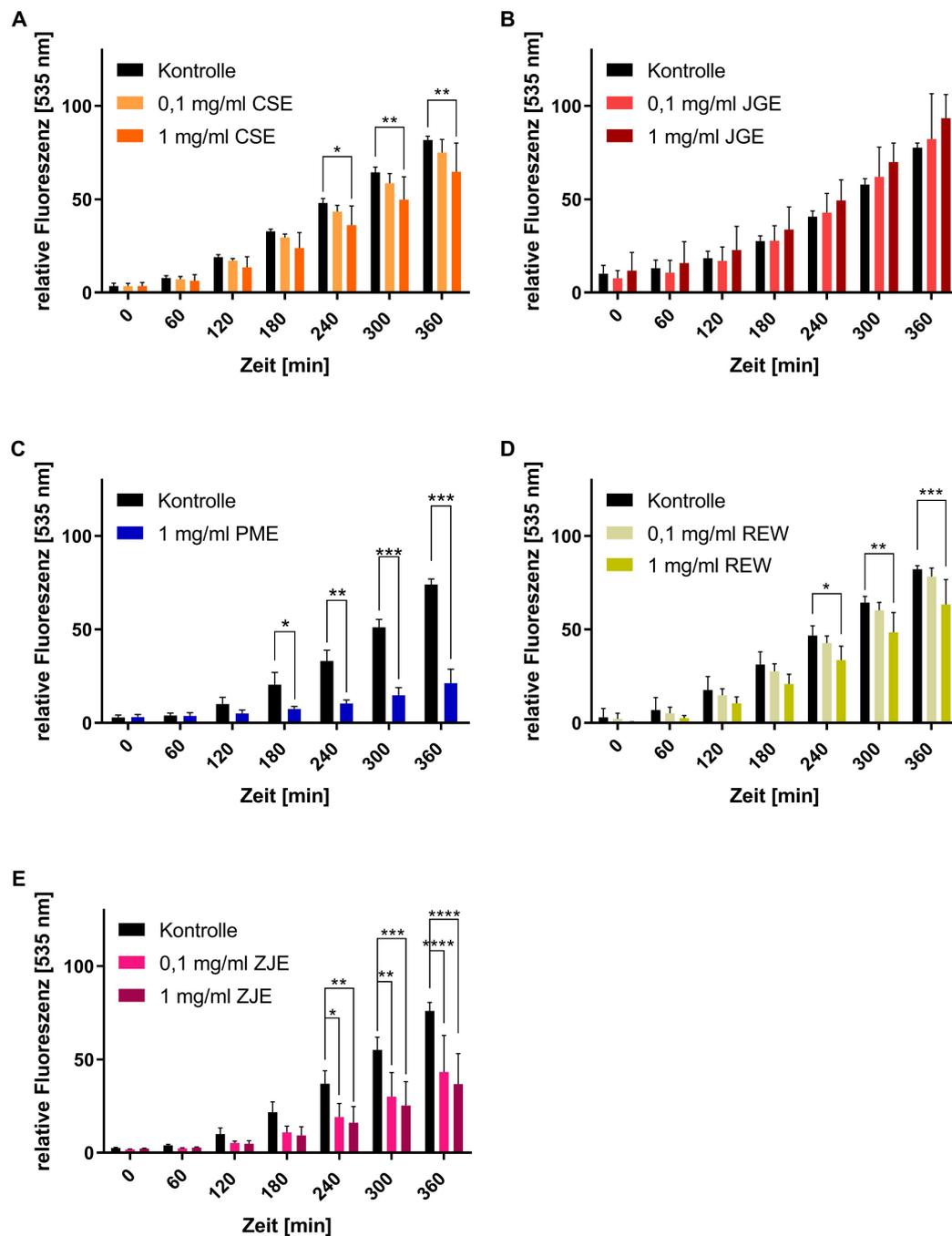
Eine im Vergleich zu PME stärkere antioxidative Wirkung besitzt REW (Abbildung 22D). Bereits ab einer Konzentration von 5 µg/ml REW kommt es zu einer signifikanten Verringerung der Absorption. Ab einer Konzentration von 20 mg/ml REW wird die radikalische Lösung vollständig entfärbt. Die Vergleichssubstanz Trolox ist jedoch auch hier stärker antioxidativ wirksam als der Extrakt. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml zeigt sich bei Trolox eine vollständige Entfärbung (Absorption: 0,0007), während REW noch eine Absorption von 0,15 aufweist.

ZJE hingegen besitzt im Vergleich zu REW schwächere antioxidative Eigenschaften *in vitro* (Abbildung 22E). Dieser Extrakt bewirkt erst bei einer Konzentration von 1000 µg/ml ZJE einen signifikanten antioxidativen Effekt und wirkt dementsprechend deutlich schwächer als die Vergleichssubstanz Trolox.

Von den hier untersuchten Extrakten hat nur CSE keinerlei antioxidative Eigenschaften *in vitro*. Alle anderen Extrakte wirken antioxidativ, jedoch schwächer als das synthetische Vitamin E Derivat Trolox.

**Antioxidative Eigenschaften *in vivo*.** Die untersuchten Extrakte werden auf antioxidative Eigenschaften *in vivo* untersucht. Einige, aber nicht alle Extrakte, sind in der Lage, das Level an ROS in den Nematoden signifikant zu verringern (Abbildung 23).

Durch eine vorherige Behandlung der Nematoden mit CSE kann das ROS-Level der Nematoden konzentrationsabhängig gesenkt werden, wobei nur eine Behandlung mit der höheren Konzentration von 1 mg/ml CSE einen signifikanten Effekt zeigt (Abbildung 23A). Diese signifikante antioxidative Wirkung von CSE ist nach 240 min unter thermalem Stress das erste mal sichtbar. Auch nach 300 bzw. 360 min bewirkt 1 mg/ml CSE ein signifikant verringertes Level an ROS im Vergleich zu den Kontrolltieren. Nach 360 min ist die Fluoreszenz der mit 1 mg/ml CSE inkubierten Nematoden um 20,8% verringert im Vergleich zu den Kontrolltieren zum selben Zeitpunkt. Durch eine Inkubation mit der geringeren Konzentration von 0,1 mg/ml CSE nimmt die gemessene Fluoreszenz tendenziell ab. Dies ist jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant.



**Abbildung 23: Thermal induzierter Anstieg der ROS-Level im Wildtyp (DCF-Assay; verschiedene Extrakte).**

Wildtypische L4-Larven (N2) werden bei 20°C für 24 h (JGE) oder für 48 h (CSE, PME, REW, ZJE) mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Nach einem einstündigen Waschschritt in PBST werden sie in Wells mit H<sub>2</sub>DCF-DA (50 µM) transferiert. Der thermal induzierte Anstieg der DCF-Fluoreszenz wird bei 535 nm und 37°C gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SD, normalisiert auf die Kontrolle bei 420 min, n = 3 (je 16 Individuen pro Gruppe), zweifaktorielle Anova mit Dunnett's multiplern Vergleichstest (CSE, JGE, REW und ZJE), bzw. ungepaarter t-Test (PME), \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001 gegen die Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt.

Werden die Nematoden mit JGE behandelt und anschließend thermalem Stress ausgesetzt, lässt sich kein antioxidativer Effekt erkennen (Abbildung 23B). Im Gegenteil – die Tendenz geht eher in Richtung eines prooxidativen Effekts. Dies ist jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikant. Im Vergleich zu den Kontrolltieren ist das Level an ROS in der Gruppe, welche mit 1 mg/ml JGE behandelt wird, nach 360 min um 20,5% erhöht.

Eine Behandlung mit 1 mg/ml PME ruft einen starken antioxidativen Effekt hervor (Abbildung 23C). Bereits nach 180 min wird das Level an ROS im Vergleich zu dem der Kontrolltiere um 63,9% verringert. Zu diesem Zeitpunkt ist die antioxidative Wirkung des Extraktes das erste Mal signifikant. Bei allen weiteren Zeitpunkten gibt es eine signifikante Abnahme des ROS-Levels der mit PME behandelten Nematoden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es handelt sich um eine Reduktion um 68,5% (240 min), 71,0% (300 min) bzw. 71,2% (360 min).

Durch eine Vorbehandlung der Nematoden mit REW werden ebenfalls reduzierte ROS-Mengen in den Nematoden im Vergleich zu den Kontrolltieren sichtbar (Abbildung 23D). Jedoch zeigt sich hier, dass eine Konzentration von 0,1 mg/ml REW nicht ausreicht, um antioxidative Effekte hervorzurufen. Eine Behandlung mit 1 mg/ml REW hingegen verursacht bereits nach 240 min eine signifikante Reduktion des ROS-Levels um 27,9% im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Nach 300 min kommt es ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion um 24,8% und nach 360 min um 22,8%.

Starke antioxidative Effekte werden durch eine Vorbehandlung der Nematoden mit ZJE hervorgerufen (Abbildung 23E). Hierbei bewirken beide untersuchten Konzentrationen ab einem Zeitpunkt von 240 min signifikante antioxidative Effekte. Zu früheren Zeitpunkten lässt sich bereits eine nicht signifikante Tendenz zur antioxidativen Wirkung des Extraktes erkennen. Die beiden Konzentrationen des ZJE besitzen in diesem Experiment ähnlich starke antioxidative Wirkungen. Die höhere Konzentration von 1 mg/ml ZJE ist dennoch ein wenig stärker als die niedrigere Konzentration. Nach 240 min zeigt sich durch eine Behandlung mit der geringeren Konzentration von 0,1 mg/ml eine Reduktion um 48,2% und durch die höhere Konzentration eine Reduktion um 56,3% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 300 min kommt es zu einer Reduktion um 45,2% (0,1 mg/ml ZJE) bzw. 54,1% (1 mg/ml ZJE) und nach 360 min zu einer Reduktion um 43,1% (0,1 mg/ml ZJE) bzw. 51,7% (1 mg/ml ZJE).

## 4.5.2 Modulation der Resistenz gegenüber thermalem und oxidativem Stress durch verschiedene Extrakte

**Resistenz gegenüber thermalem Stress.** In Abbildung 24 ist zu erkennen, dass nur zwei der hier untersuchten Extrakte dazu im Stande sind, das Überleben der Nematoden unter thermalem Stress signifikant zu verlängern. Diese Extrakte sind JGE (Abbildung 24B) und ZJE (Abbildung 24E) jeweils in der höheren Konzentration von 1 mg/ml.

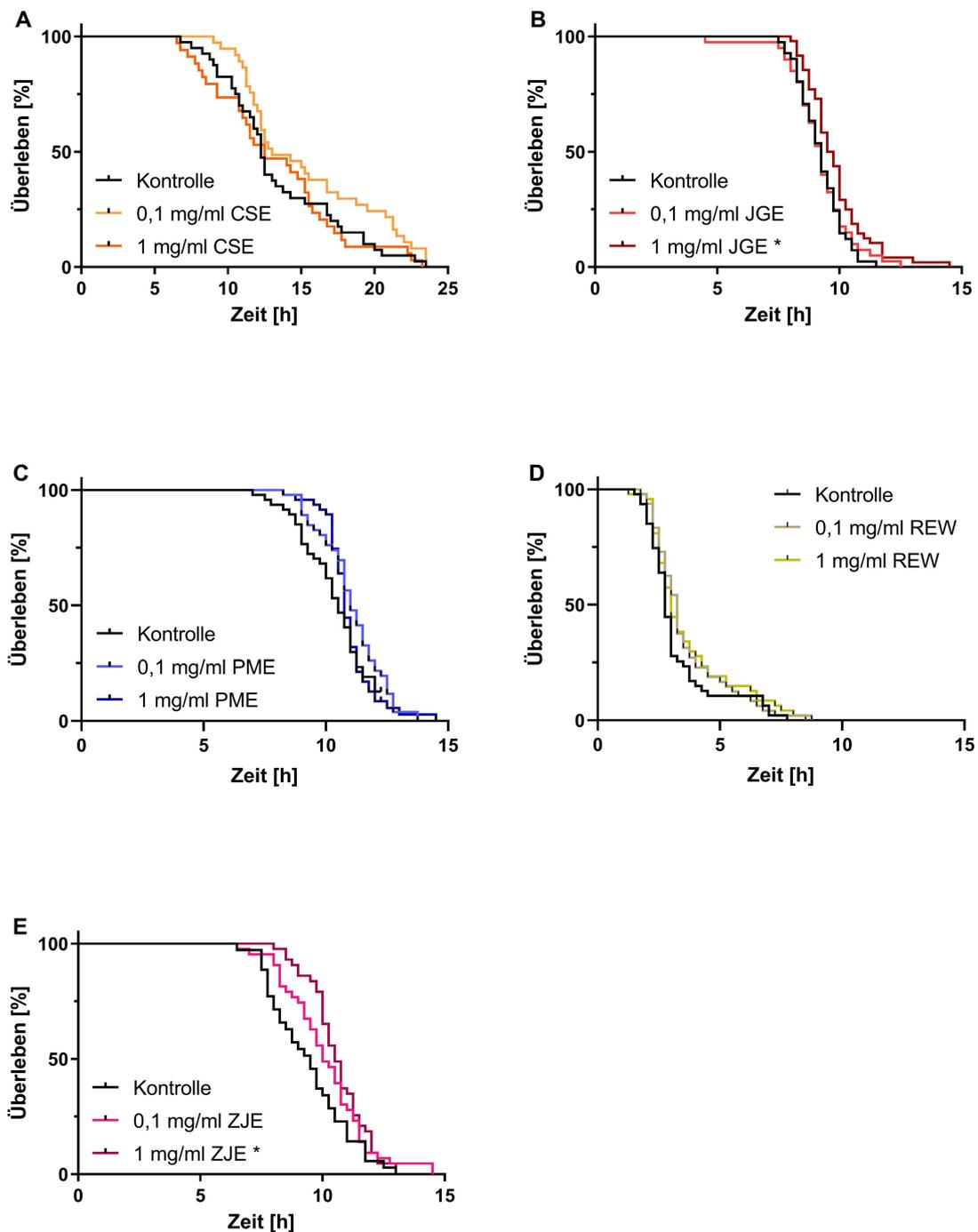
Abbildung 24A stellt die Überlebenskurven der mit 0,1 mg/ml bzw. 1 mg/ml CSE behandelten Nematoden sowie die Überlebenskurve der zugehörigen Kontrollgruppe dar. Keine der eingesetzten CSE-Konzentrationen ist in der Lage, das Überleben der Nematoden unter thermalem Stress zu verlängern und somit ihre Resistenz gegenüber thermalem Stress zu verbessern. Das mediane Überleben der Nematoden der Kontrollgruppe beträgt  $12,3 \pm 0,2$  h, das der mit 0,1 mg/ml CSE inkubierten Nematoden  $13,0 \pm 1,4$  h und das der mit 1 mg/ml CSE behandelten Tiere  $12,5 \pm 1,8$  h.

Die mittleren und medianen Überlebenszeiten der Nematoden sowie die dazugehörigen p-Werte können für alle untersuchten Extrakte Tabelle 17 entnommen werden.

Auch durch eine Behandlung mit 0,1 mg/ml JGE wird keine Verlängerung des Überlebens der Nematoden unter thermalem Stress im Vergleich zur Kontrolle hervorgerufen (Abbildung 24B). Beide Gruppen haben ein medianes Überleben von  $9,3 \pm 0,2$  h. Eine signifikante Verlängerung des Überlebens zeigt hingegen eine Behandlung mit 1 mg/ml JGE. Hier beträgt das mediane Überleben  $9,5 \pm 0,2$  h, was im Vergleich zur Kontrolle einer Verlängerung des Überlebens um 2,2% entspricht.

Werden die Nematoden mit PME behandelt, kommt es zu keiner signifikanten Verlängerung des Überlebens unter thermalem Stress (Abbildung 24C). Das mediane Überleben der Nematoden liegt bei  $10,5 \pm 0,3$  h (Kontrolle),  $11,0 \pm 0,2$  h (0,1 mg/ml PME) bzw.  $10,8 \pm 0,1$  h (1 mg/ml PME).

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei einer Inkubation der Nematoden mit REW in Abbildung 24D. Auch hier wird die thermale Stressresistenz der Tiere durch den Extrakt nicht signifikant erhöht. Das mediane Überleben der Kontrolltiere beträgt  $2,8 \pm 0,1$  h, das der mit 0,1 mg/ml REW behandelten Nematoden  $3,3 \pm 0,1$  h und das der mit 1 mg/ml REW inkubierten Tiere  $3,0 \pm 0,1$  h.



**Abbildung 24: Resistenz wildtypischer Nematoden gegenüber thermalem Stress (verschiedene Extrakte).**

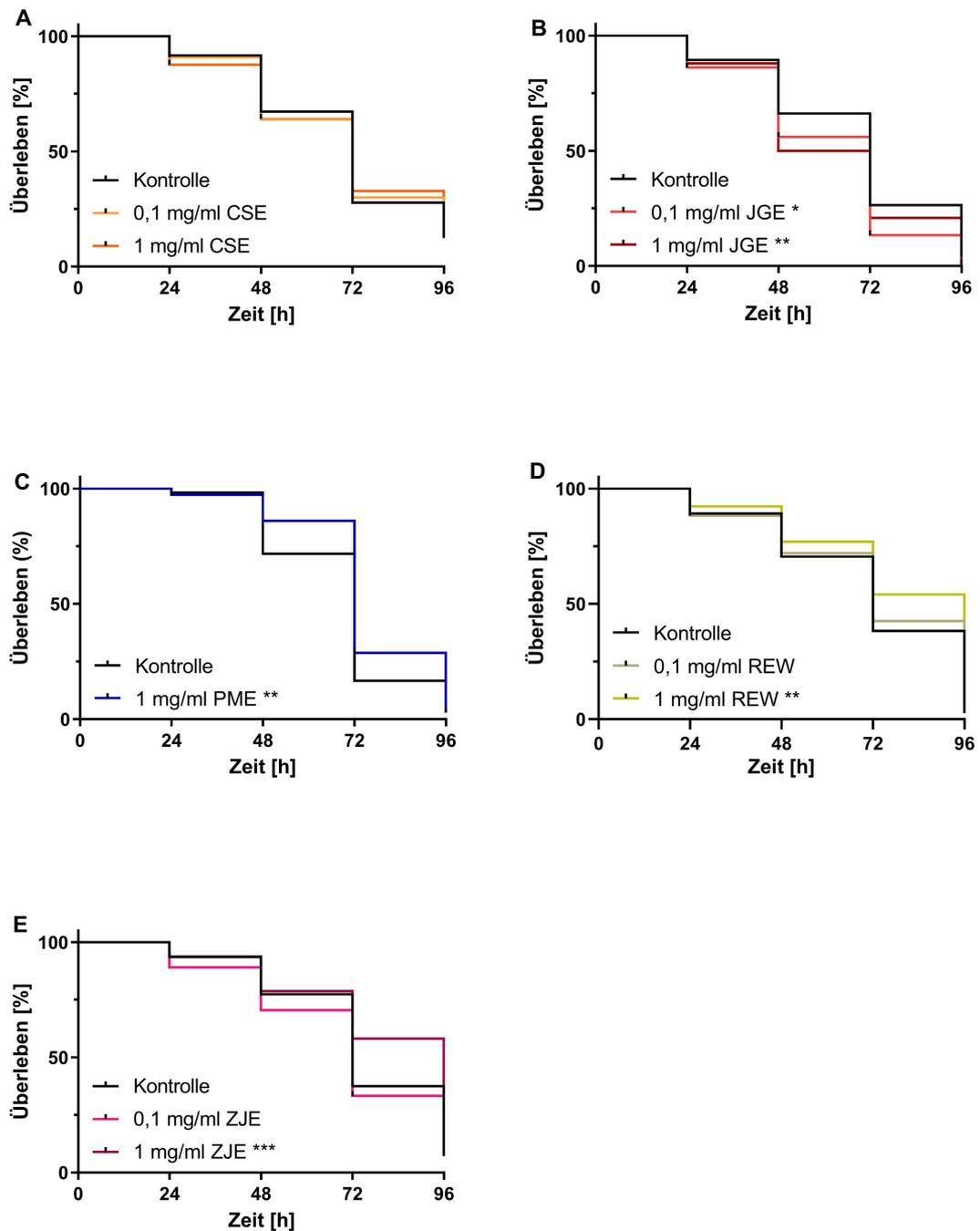
Wildtypische L4-Larven (N2) werden bei 20°C für 24 h (JGE) oder für 48 h (CSE, PME, REW, ZJE) mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Nach einem einstündigen Waschschrift in PBST werden sie in Wells mit Sytox-Green (1  $\mu$ M) transferiert. Die Messung wird bei 37°C durchgeführt und die Fluoreszenz bei 535 nm gemessen. Anschließend werden die virtuellen Todeszeitpunkte der Nematoden ermittelt. Verglichen werden die Überlebenskurven mit einer Kaplan-Meier-Statistik,  $n = 3$  (je 16 Individuen pro Gruppe), Log-Rank (Mantel-Cox) Test; \*  $p < 0,05$ .

Ein anderes Bild ergibt sich bei einer Behandlung der Nematoden mit ZJE (Abbildung 24E). Hier besteht eine konzentrationsabhängige Verlängerung des Überlebens unter thermalem Stress. Das mediane Überleben der Kontrolltiere beläuft sich auf  $9,5 \pm 0,4$  h. Behandelt man die Nematoden mit  $0,1$  mg/ml ZJE, beläuft sich das mediane Überleben auf  $10,0 \pm 0,4$  h. Dies entspricht einer Verlängerung des Überlebens um  $5,3\%$  im Vergleich zur Kontrolle, ist jedoch statistisch nicht signifikant. Mit einer Verlängerung der Überlebenszeit um  $10,5\%$  im Vergleich zur Kontrollgruppe auf  $10,5 \pm 0,2$  h ist ZJE in einer Konzentration von  $1$  mg/ml in der Lage die Resistenz der Nematoden gegenüber thermalem Stress signifikant zu erhöhen.

**Tabelle 17: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der thermalen Stressresistenz am Wildtyp (verschiedene Extrakte).**

Behandlung	Mittelwert [h] $\pm$ SD	% Differenz zur Kontrolle	Median [h] $\pm$ SD	% Differenz zur Kontrolle	p-Wert gegen Kontrolle
Kontrolle	$13,4 \pm 0,7$	-	$12,3 \pm 0,2$	-	-
$0,1$ mg/ml CSE	$15,4 \pm 0,8$	+ 14,9	$13,0 \pm 1,4$	+ 5,7	0,069
$1$ mg/ml CSE	$13,2 \pm 0,8$	- 1,5	$12,5 \pm 1,8$	+ 1,6	0,808
Kontrolle	$9,2 \pm 0,1$	-	$9,3 \pm 0,2$	-	-
$0,1$ mg/ml JGE	$9,2 \pm 0,2$	$\pm 0$	$9,3 \pm 0,2$	$\pm 0$	0,692
$1$ mg/ml JGE	$9,8 \pm 0,2$	+ 6,5	$9,5 \pm 0,2$	+ 2,2	0,012
Kontrolle	$10,3 \pm 1,2$	-	$10,5 \pm 0,3$	-	-
$0,1$ mg/ml PME	$11,1 \pm 1,2$	+ 7,8	$11,0 \pm 0,2$	+ 4,8	0,080
$1$ mg/ml PME	$10,9 \pm 1,2$	+ 5,8	$10,8 \pm 0,1$	+ 2,9	0,584
Kontrolle	$3,2 \pm 0,2$	-	$2,8 \pm 0,1$	-	-
$0,1$ mg/ml REW	$3,6 \pm 0,2$	+ 12,5	$3,3 \pm 0,1$	+ 17,9	0,216
$1$ mg/ml REW	$3,7 \pm 0,3$	+ 15,6	$3,0 \pm 0,1$	+ 7,1	0,147
Kontrolle	$9,4 \pm 0,3$	-	$9,5 \pm 0,4$	-	-
$0,1$ mg/ml ZJE	$10,2 \pm 0,3$	+ 8,5	$10,0 \pm 0,4$	+ 5,3	0,122
$1$ mg/ml ZJE	$10,6 \pm 0,2$	+ 12,8	$10,5 \pm 0,2$	+ 10,5	0,011

**Resistenz gegenüber oxidativem Stress.** Die oxidative Stressresistenz kann durch verschiedene Extrakte moduliert werden (Abbildung 25). Bis auf CSE und JGE erhöhen alle untersuchten Extrakte die Resistenz gegenüber oxidativem Stress und verlängern das Überleben unter diesen Bedingungen.



**Abbildung 25: Resistenz des Wildtyp gegenüber oxidativem Stress (verschiedene Extrakte).**

L4-Larven des wildtypischen Stammes N2 werden bei 20°C für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Anschließend werden alle Nematoden in Medien ohne Extrakte aber mit 50 mM (PME) bzw. 80 mM Paraquat (CSE, JGE, REW und ZJE) umgesetzt. Alle 24 h werden die Nematoden mittels Berührung auf ihr Überleben getestet. Verglichen werden die Überlebenskurven mit einer Kaplan-Meier-Statistik,  $n = 3$  (JGE, ZJE  $n = 4$ ) (je 40 Individuen pro Gruppe), Log-Rank (Mantel-Cox) Test; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

CSE zeigt keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 25A). Das mediane Überleben der Kontrollgruppe sowie beider mit CSE behandelten Gruppen (0,1 mg/ml und 1 mg/ml CSE) liegt bei 72,0 h. Auch das mittlere Überleben dieser Gruppen unterscheidet sich nur unwesentlich und kann Tabelle 18 entnommen werden.

Durch eine Behandlung mit JGE wird das Überleben der Nematoden unter oxidativem Stress signifikant verringert (Abbildung 25B). Diese Verringerung der Überlebenszeit ist konzentrationsabhängig. Das mittlere Überleben der Nematoden der Kontrollgruppe beträgt  $67,7 \pm 1,8$  h (Tabelle 18). Im Vergleich hierzu nimmt das mittlere Überleben der mit 0,1 mg/ml JGE inkubierten Nematoden um 9,3% und das der mit 1 mg/ml JGE behandelten Tiere um 8,3% ab (Tabelle 18). Die Nematoden, welche mit JGE behandelt werden, zeigen folglich ein im Vergleich zur Kontrollgruppe verkürztes Überleben und eine verringerte Resistenz gegenüber oxidativem Stress.

**Tabelle 18: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der oxidativen Stressresistenz am Wildtyp (verschiedene Extrakte).**

Behandlung	Mittelwert [h] ± SD	% Differenz zur Kontrolle	Median [h] ± SD	% Differenz zur Kontrolle	p-Wert gegen Kontrolle
Kontrolle	68,8 ± 2,1	-	72,0 ± 2,6	-	-
0,1 mg/ml CSE	68,4 ± 2,1	- 0,6	72,0 ± 3,0	± 0	0,89
1 mg/ml CSE	68,3 ± 2,3	- 0,7	72,0 ± 3,4	± 0	0,95
Kontrolle	67,7 ± 1,8	-	72,0 ± 2,2	-	-
0,1 mg/ml JGE	61,4 ± 1,8	- 9,3	72,0 ± 1,7	± 0	0,014
1 mg/ml JGE	62,1 ± 1,8	- 8,3	48,0 ± 2,8	- 33,3	0,009
Kontrolle	68,8 ± 1,3	-	72,0 ± 1,4	-	-
1 mg/ml PME	74,8 ± 1,2	+ 8,7	72,0 ± 1,2	± 0	0,002
Kontrolle	71,5 ± 2,2	-	72,0 ± 3,3	-	-
0,1 mg/ml REW	72,6 ± 2,3	+ 1,5	72,0 ± 3,7	± 0	0,75
1 mg/ml REW	77,6 ± 2,2	+ 8,5	96,0 ± 2,3	+ 33,3	0,01
Kontrolle	74,0 ± 1,9	-	72,0 ± 2,6	-	-
0,1 mg/ml ZJE	70,3 ± 1,9	- 5,0	72,0 ± 2,4	± 0	0,30
1 mg/ml ZJE	79,4 ± 1,8	+ 7,3	96,0 ± 2,5	+ 33,3	0,0002

Eine Behandlung der Nematoden mit PME hingegen verlängert das Überleben selbiger unter oxidativem Stress (Abbildung 25C). Durch eine Inkubation mit 1 mg/ml PME kann das

Überleben im Mittel von  $68,8 \pm 1,3$  h (Kontrolle) auf  $74,8 \pm 1,8$  h signifikant um 8,7% verlängert werden (Tabelle 18).

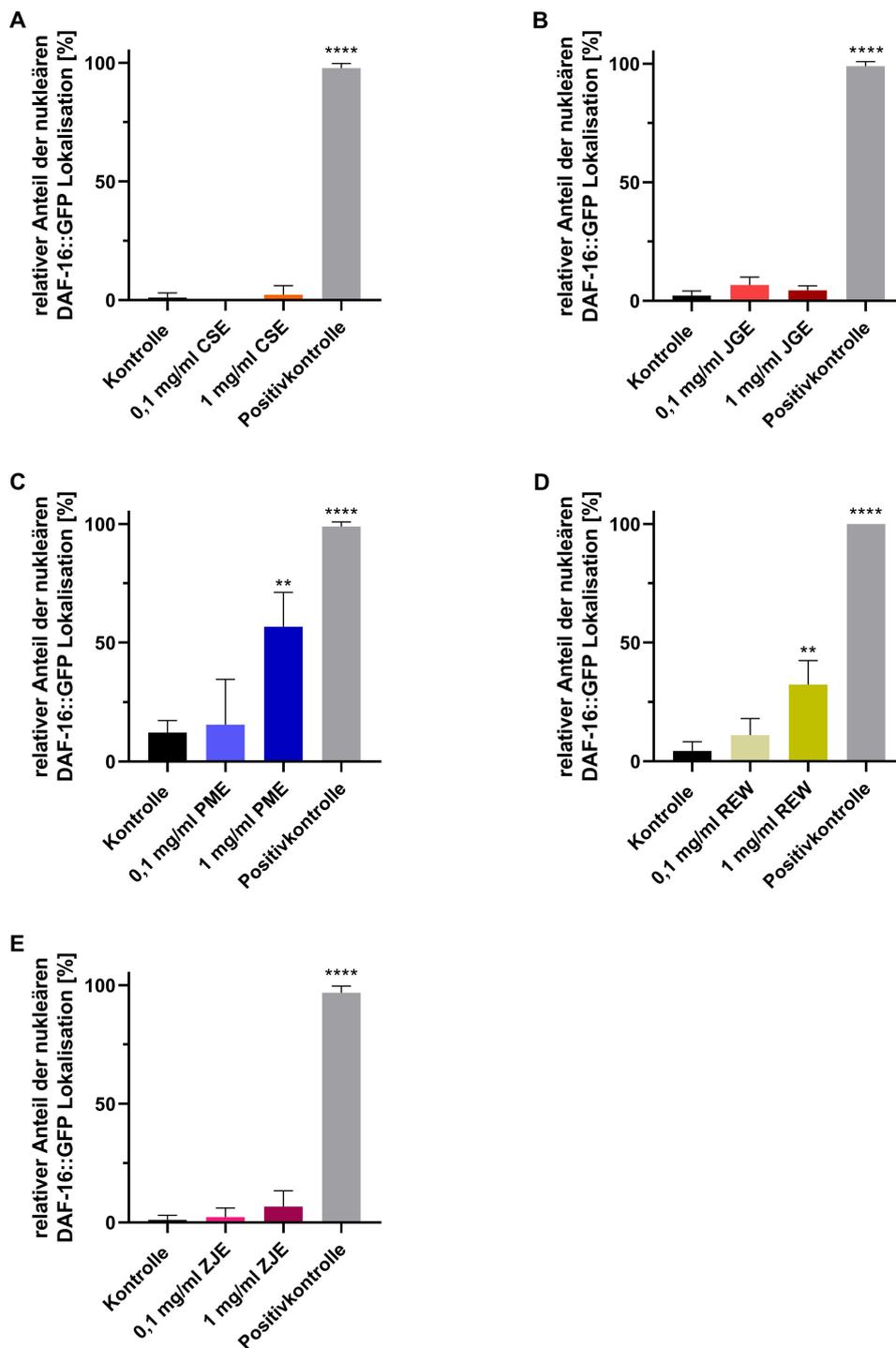
REW verursacht ebenfalls eine Verbesserung der Resistenz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress (Abbildung 25D). Jedoch bewirkt nur die höhere untersuchte Konzentration von 1 mg/ml REW eine signifikante Verlängerung des Überlebens der Nematoden unter oxidativem Stress. Im Vergleich zur Kontrollgruppe führt eine Inkubation mit 1 mg/ml REW zu einer im Mittel um 8,5% verlängerten Lebensspanne, wobei das mittlere Überleben der Kontrolltiere  $71,5 \pm 2,2$  h beträgt und das der mit 1 mg/ml REW behandelten Tiere  $77,6 \pm 2,2$  h. Durch eine Inkubation mit 0,1 mg/ml REW kommt es zu keiner Verlängerung des Überlebens unter oxidativem Stress. Die mittlere Lebensspanne dieser Nematoden beträgt  $72,6 \pm 2,3$  h (Tabelle 18).

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei einer Behandlung der Nematoden mit ZJE (Abbildung 25E). Nur die höhere Konzentration von 1 mg/ml ZJE hat eine signifikante Verbesserung der Resistenz der Tiere gegenüber oxidativem Stress zur Folge. Bei der Kontrollgruppe und der mit 0,1 mg/ml ZJE behandelten Gruppe zeigt sich ein mittleres Überleben von  $74,0 \pm 1,9$  h bzw.  $70,3 \pm 1,9$  h. Werden die Nematoden mit 1 mg/ml ZJE behandelt, beläuft sich das mittlere Überleben auf  $79,4 \pm 1,8$  h. Dies ist im Vergleich zur Kontrolle eine Verlängerung des mittleren Überlebens um 7,3% (Tabelle 18).

### **4.5.3 Modulation der Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 durch verschiedene Extrakte**

Wird die Lokalisation des Transkriptionsfaktors in den Nematoden untersucht, zeigt sich, dass nur zwei der untersuchten Extrakte eine Translokation von DAF-16 in den Zellkern hervorrufen (Abbildung 26). Diese beiden Extrakte sind PME (Abbildung 26C) und REW (Abbildung 26D).

Durch eine Inkubation mit 1 mg/ml PME kommt es zu einer im Vergleich zur Kontrolle signifikant um das 4,6-Fache erhöhten Anzahl an Nematoden mit nukleär lokalisiertem DAF-16 (Abbildung 26C). Betrachtet man die niedrigere Konzentration von 0,1 mg/ml PME, kommt es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner erhöhten Translokation von DAF-16 in den Zellkern.



**Abbildung 26: Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 (verschiedene Extrakte).**

Anhand des transgenen Stammes TJ356 (DAF-16::GFP) wird die Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Nematoden werden für eine Stunde bei 20°C in Inkubationsmedien mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle inkubiert. Als Positivkontrolle dienen Nematoden, die 5 min bei 37°C thermalem Stress ausgesetzt werden. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3$  (je 30 Individuen pro Gruppe), einfaktorische Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Ähnlich sieht es aus, wenn die Nematoden mit REW inkubiert werden (Abbildung 26D). Die niedrigere Konzentration von 0,1 mg/ml REW hat keinen signifikanten Effekt, wohingegen die höhere Konzentration von 1 mg/ml REW im Vergleich zur Kontrolle eine um das 7,2-Fache erhöhte Anzahl an Nematoden mit nukleär lokalisiertem DAF-16 aufweist. Dieser Effekt ist statistisch signifikant.

Alle weiteren untersuchten Extrakte – CSE (Abbildung 26A), JGE (Abbildung 26B) und ZJE (Abbildung 26E) – bewirken keine signifikante Translokation des Transkriptionsfaktors DAF-16 in den Zellkern der Nematoden.

Die in den jeweiligen Experimenten mitgeführten Positivkontrollen zeigen stets eine starke und statistisch signifikante Translokation von DAF-16 in den Nukleus (Abbildung 26).

#### **4.5.4 Untersuchung der Modulation des IIS durch verschiedene Extrakte mittels Deletion von DAF-16**

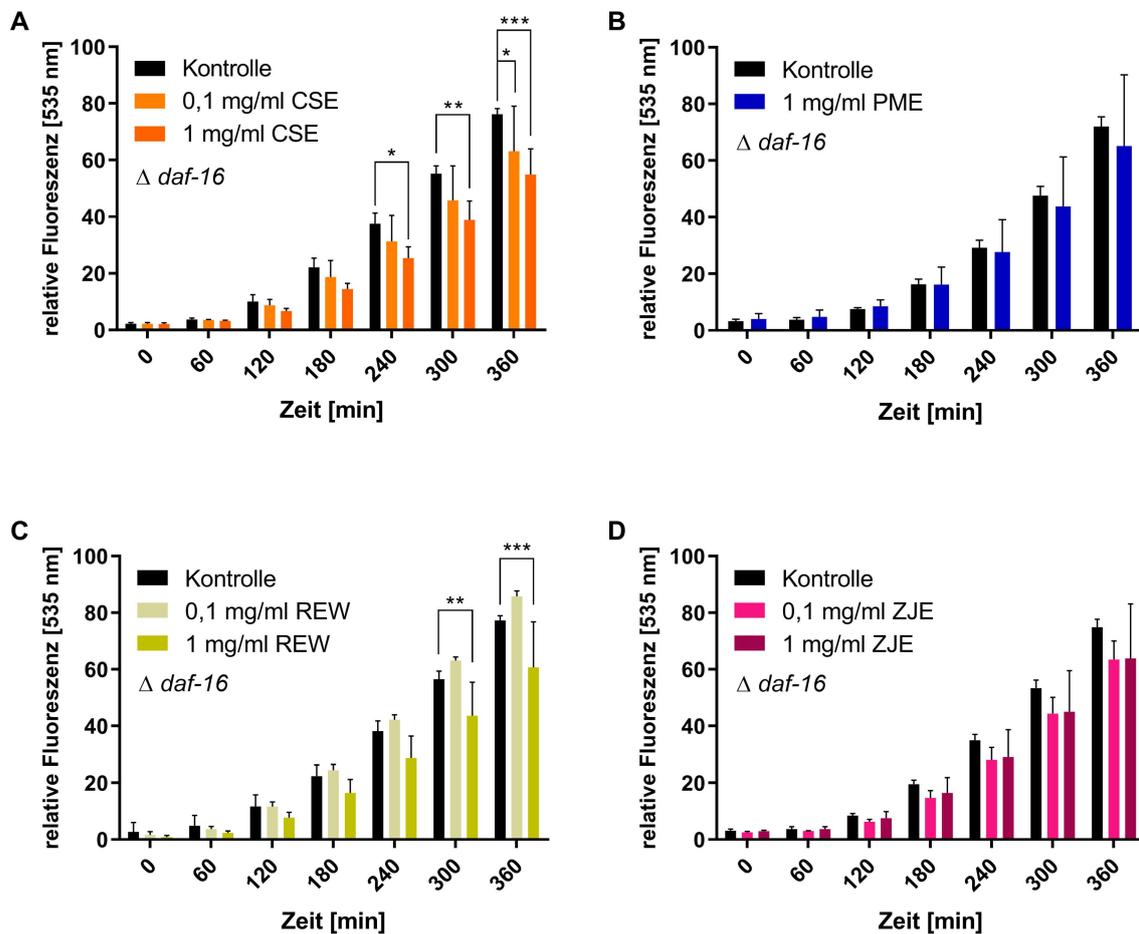
**Antioxidative Effekte in DAF-16-Deletionsmutanten *in vivo*.** Werden DAF-16-defiziente Nematoden mit CSE behandelt und anschließend unter thermalem Stress die gebildeten ROS mit Hilfe der DCF-Fluoreszenz gemessen, zeigt sich ein ähnliches Bild wie auch schon im Wildtyp (Abbildung 27A im Vgl. zu Abbildung 23A).

Auch in der Mutante besitzt CSE signifikante antioxidative Effekte (Abbildung 27A). Nach 240 min wird durch eine Inkubation mit 1 mg/ml CSE das ROS-Level der Nematoden im Vergleich zur Kontrollgruppe erstmals signifikant um 32,3% verringert. Auch nach 300 min bzw. 360 min ergibt sich eine signifikante Reduktion der Menge an ROS um 29,6% bzw. 28,0% im Vergleich zur Kontrolle. Bei 360 min hat auch die niedrigere Konzentration von 0,1 mg/ml REW eine signifikante Reduktion des ROS-Levels um 17,2% induziert. DAF-16 ist folglich für den antioxidativen Effekt von CSE nicht essentiell.

Anders verhält es sich bei einer Behandlung der Nematoden mit PME: Es gibt keinen signifikanten antioxidativen Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 27B). Der antioxidative Effekt von PME im Wildtyp ist demnach abhängig vom Transkriptionsfaktor DAF-16.

Bei der Behandlung der DAF-16-Deletionsmutante mit REW werden wie auch im wildtypischen Stamm antioxidative Effekte sichtbar (Abbildung 27C). Wie im Wildtyp bewirkt hier ebenfalls nur die höhere Konzentration von 1 mg/ml REW signifikant verringerte ROS-Mengen in den Nematoden. Nach 300 min ist das ROS-Level im Vergleich zur Kontrolle um

22,9% und nach 360 min um 21,5% reduziert. Wie auch bei CSE wird der antioxidative Effekt von REW nicht über den Transkriptionsfaktor DAF-16 vermittelt.



**Abbildung 27: Thermal induzierter Anstieg der ROS-Level in der DAF-16-Deletionsmutante (DCF-Assay; verschiedene Extrakte).**

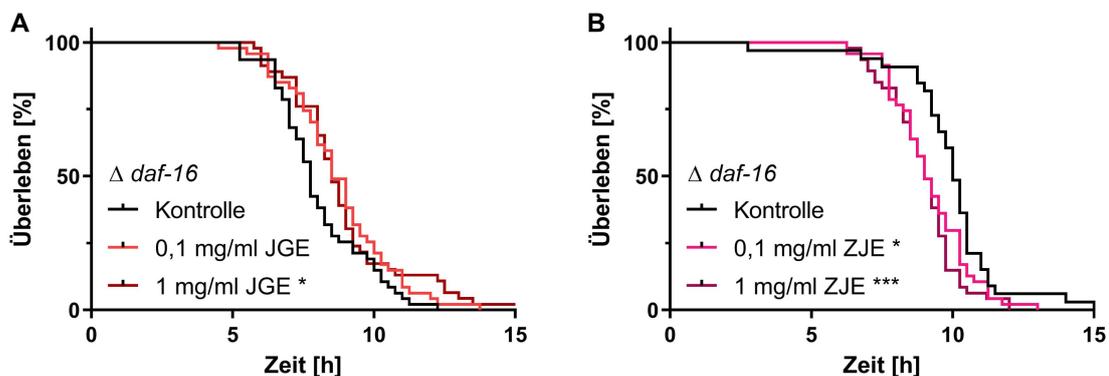
L4-Larven des DAF-16-defizienten Stammes CF1038 werden bei 20°C für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Nach einem einstündigen Waschschrift in PBST werden sie in Wells mit  $H_2DCF\text{-}DA$  (50  $\mu M$ ) transferiert. Der thermal induzierte Anstieg der DCF-Fluoreszenz wird bei einer Exzitation von 485 nm, einer Emission von 535 nm und 37°C gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD, normalisiert auf die Kontrolle bei 360 min,  $n = 3$  (je 16 Individuen pro Gruppe), zweifaktorielle Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  gegen die Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt.

In der Deletionsmutante besitzt ZJE in keiner der eingesetzten Konzentrationen antioxidative Effekte (Abbildung 27D). Auch hier ist die antioxidative Wirkung des Extraktes, welche im Wildtyp zu sehen ist (Abbildung 23E), vollständig von DAF-16 abhängig.

### Resistenz gegenüber thermalem Stress in DAF-16-Deletionsmutanten.

Werden DAF-16-Deletionsmutanten mit JGE behandelt und thermalem Stress ausgesetzt, wird das Überleben unter diesen Bedingungen gegenüber der Kontrolle erhöht (Abbildung 28A). Das mittlere Überleben wird durch die untersuchten Konzentrationen an JGE von  $8,1 \pm 0,2$  h (Kontrollgruppe) auf  $8,8 \pm 0,3$  h (0,1 mg/ml JGE) bzw.  $8,9 \pm 0,3$  h (1 mg/ml JGE) erhöht (Tabelle 19). Dieser Effekt ist jedoch nur bei der höheren Konzentration von 1 mg/ml JGE signifikant. DAF-16 scheint folglich für die durch JGE erhöhte thermale Stressresistenz, welche im Wildtyp zu sehen ist, nicht essentiell zu sein.

Eine Behandlung der DAF-16-defizienten Tiere mit ZJE resultiert jedoch in einer signifikant verringerten Überlebensrate im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 28B). Dies ist bei beiden untersuchten Konzentrationen der Fall.



**Abbildung 28: Resistenz des DAF-16-defizienten Stammes gegenüber thermalem Stress (verschiedene Extrakte).**

L4-Larven des DAF-16-defizienten Stammes CF1038 werden bei 20°C für 24 h (JGE) oder für 48 h (ZJE) mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Nach einem einstündigen Waschschrift in PBST werden sie in Wells mit Sytox-Green (1 μM) transferiert. Die Messung wird bei 37°C durchgeführt und die Fluoreszenz bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 535 nm gemessen. Anschließend werden die virtuellen Todeszeitpunkte der Nematoden ermittelt. Verglichen werden die Überlebenskurven mit einer Kaplan-Meier-Statistik,  $n = 3$  (je 16 Individuen pro Gruppe), Log-Rank (Mantel-Cox) Test; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Die Resistenz DAF-16-defizienter Nematoden gegenüber thermalem Stress nimmt folglich durch eine Behandlung mit ZJE ab (Abbildung 28B). Die mittlere Überlebensrate der Kontrollgruppe beträgt  $9,9 \pm 0,3$  h, während die Nematoden, welche mit 0,1 mg/ml ZJE behandelt werden, im Mittel  $9,2 \pm 0,2$  h überlebten. Nematoden, die mit 1 mg/ml ZJE inkubiert werden, weisen ein mittleres Überleben von  $9,0 \pm 0,2$  h auf (Tabelle 19). Auch die Wirkung von ZJE auf die thermale Stressresistenz der Nematoden scheint von DAF-16 abhängig zu sein.

**Tabelle 19: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der thermalen Stressresistenz an DAF-16-Deletionsmutanten.**

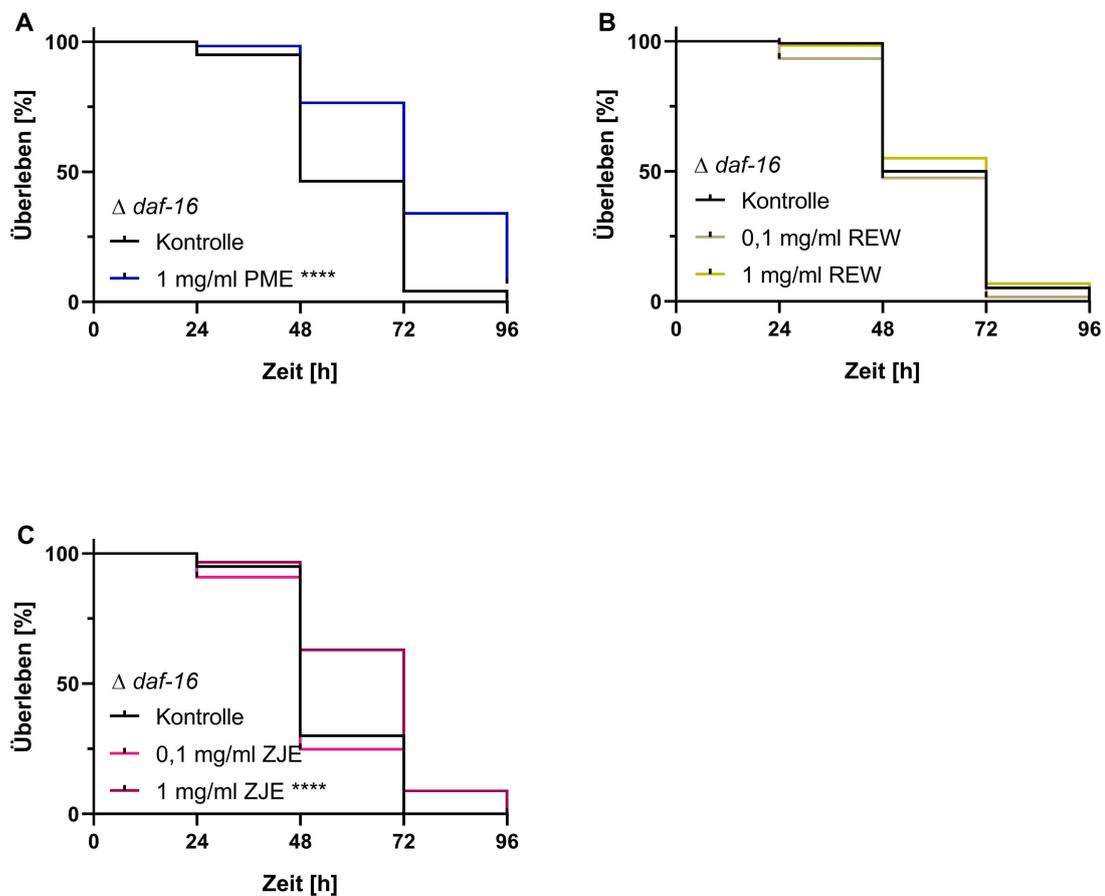
Behandlung	Mittelwert [h] ± SD	% Differenz zur Kontrolle	Median [h] ± SD	% Differenz zur Kontrolle	p-Wert gegen Kontrolle
Kontrolle	8,1 ± 0,2	-	7,8 ± 0,1	-	-
0,1 mg/ml JGE	8,8 ± 0,3	+ 8,6	8,5 ± 0,3	+ 9,0	0,058
1 mg/ml JGE	8,9 ± 0,3	+ 9,9	8,5 ± 0,2	+ 9,0	0,029
Kontrolle	9,9 ± 0,3	-	10,0 ± 0,2	-	-
0,1 mg/ml ZJE	9,2 ± 0,2	- 7,1	9,0 ± 0,2	- 10,0	0,023
1 mg/ml ZJE	9,0 ± 0,2	- 9,1	9,0 ± 0,2	- 10,0	0,001

### Resistenz gegenüber oxidativem Stress in DAF-16-Deletionsmutanten.

In den DAF-16-Deletionsmutanten zeigt sich durch eine Inkubation mit 1 mg/ml PME – wie auch schon im wildtypischen Stamm N2 – eine Verlängerung des Überlebens unter oxidativem Stress im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 29A).

Das mittlere Überleben der Kontrolltiere beträgt  $58,9 \pm 1,2$  h. Werden die Nematoden jedoch mit PME behandelt, verlängert sich das Überleben auf  $74,1 \pm 1,4$  h. Dieser Effekt ist signifikant und entspricht einem durch PME um 25,8% verlängerten Überleben der Tiere (Tabelle 20). Für die Vermittlung der erhöhten Resistenz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress durch eine Behandlung mit PME ist der Transkriptionsfaktor DAF-16 nicht essentiell.

Abbildung 29B bildet die Überlebenskurven der mit REW behandelten Nematoden im Vergleich zu der der Kontrolltiere ab. Durch eine Behandlung mit REW wird die Resistenz gegenüber oxidativem Stress nicht erhöht. Die Kurven liegen sehr nah beieinander und das mittlere Überleben der Kontrolltiere, der mit 0,1 mg/ml REW oder 1 mg/ml REW inkubierten Tiere liegt bei  $61,0 \pm 1,3$  h, bzw.  $58,2 \pm 1,4$  h und  $62,5 \pm 1,4$  h (Tabelle 20). Fehlt den Nematoden der Transkriptionsfaktor DAF-16, kommt es folglich zu keiner Verlängerung des Überlebens durch REW im Vergleich zur Kontrolle. Somit ist DAF-16 essentiell für die Vermittlung der durch REW erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress im Wildtyp.



**Abbildung 29: Resistenz des DAF-16-defizienten Stammes gegenüber oxidativem Stress (verschiedene Extrakte).**

L4-Larven des DAF-16-defizienten Stammes CF1038 werden bei 20°C für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Anschließend werden alle Nematoden in Medien ohne Extrakte aber mit 50 mM (PME) oder 80 mM Paraquat (REW und ZJE) umgesetzt. Alle 24 h wurden die Nematoden mittels Berührung auf ihr Überleben getestet. Verglichen werden die Überlebenskurven mit einer Kaplan-Meier-Statistik,  $n = 3$  (je 40 Individuen pro Gruppe), Log-Rank (Mantel-Cox) Test; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Wie auch bei einer Inkubation mit PME zeigt eine Behandlung mit 1 mg/ml ZJE trotz fehlendem DAF-16 eine erhöhte Resistenz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress (Abbildung 29C). Das mittlere Überleben wird im Vergleich zur Kontrolle von  $54,0 \pm 1,3$  h auf  $64,4 \pm 1,5$  h signifikant erhöht. Wie auch bei den wildtypischen Nematoden reicht eine Konzentration von 0,1 mg/ml ZJE bei den DAF-16-Deletionsmutanten nicht aus, um eine Verbesserung der Resistenz gegenüber oxidativem Stress hervorzurufen. Hier beträgt das mediane Überleben  $51,8 \pm 1,2$  h.

**Tabelle 20: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der oxidativen Stressresistenz an DAF-16-Deletionsmutanten (verschiedene Extrakte).**

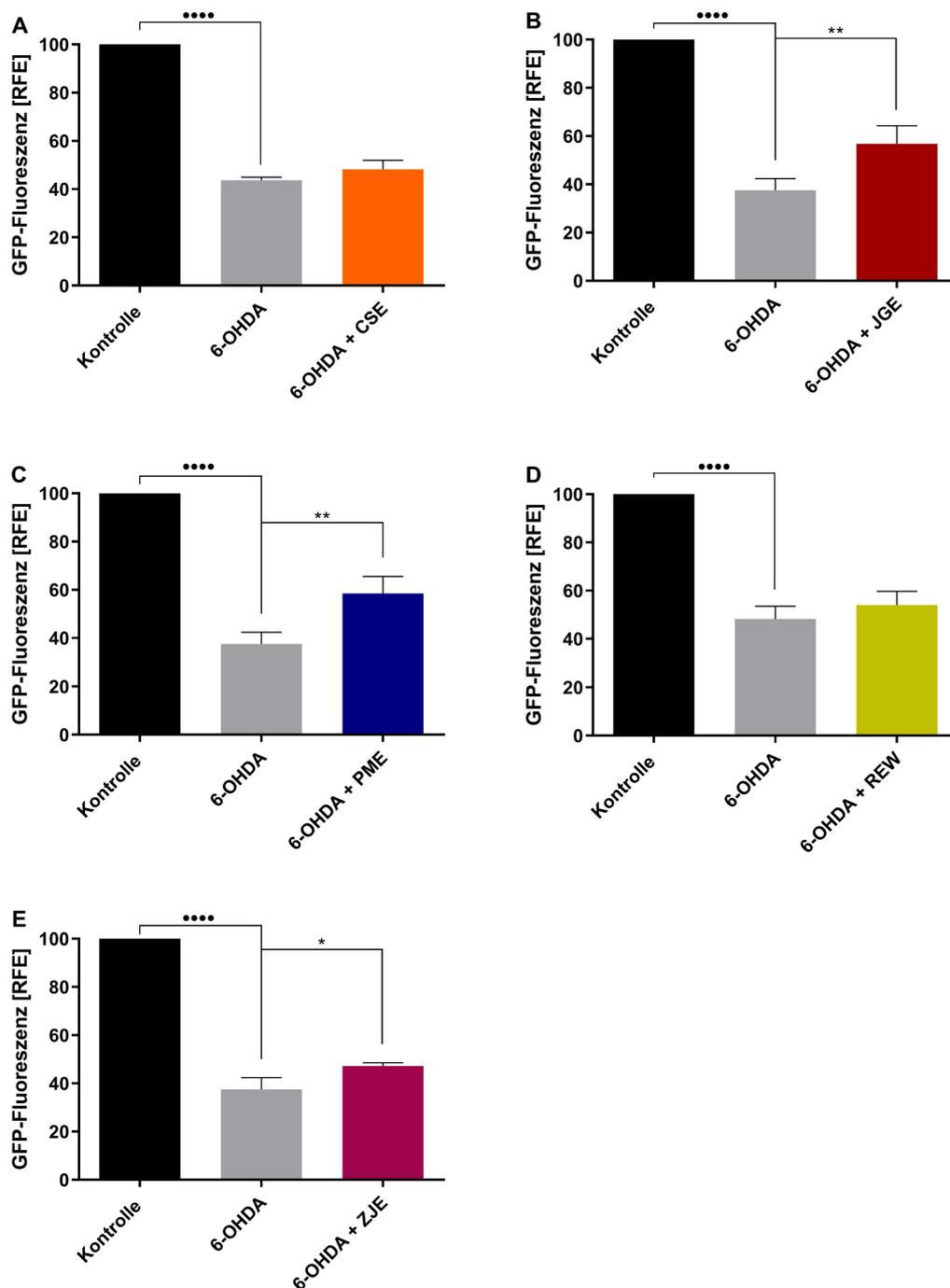
Behandlung	Mittelwert [h] ± SD	% Differenz zur Kontrolle	Median [h] ± SD	% Differenz zur Kontrolle	p-Wert gegen Kontrolle
Kontrolle	58,9 ± 1,2	-	48,0 ± 2,0	-	-
1 mg/ml PME	74,1 ± 1,4	+ 25,8	72,0 ± 2,0	+ 50,0	< 0,0001
Kontrolle	61,0 ± 1,3	-	72,0 ± 1,1	-	-
0,1 mg/ml REW	58,2 ± 1,4	- 4,6	48,0 ± 2,4	- 66,7	0,229
1 mg/ml REW	62,5 ± 1,4	+ 2,5	72,0 ± 1,2	± 0	0,427
Kontrolle	54,0 ± 1,3	-	48,0 ± 1,7	-	-
0,1 mg/ml ZJE	51,8 ± 1,2	- 4,1	48,0 ± 1,5	± 0	0,2241
1 mg/ml ZJE	64,4 ± 1,5	+ 19,3	72,0 ± 1,2	+ 50,0	< 0,0001

## 4.6 Untersuchungen verschiedener Extrakte auf neuroprotektive Wirkungen im M. Parkinson Modell

### 4.6.1 Untersuchung neuroprotektiver Effekte durch verschiedene Extrakte nach 6-OHDA-Behandlung

Werden die Nematoden für 2,5 h mit 6-OHDA behandelt, werden ihre dopaminergen Neuronen zerstört, was sich in einer Verringerung der gemessenen Fluoreszenzstärke im Kopfbereich äußert. Die Degeneration der Neuronen der mit 6-OHDA behandelten Nematoden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beläuft sich auf 51,7 bis 62,4% (Abbildung 30A-E). Dieses Ausmaß der Neurodegeneration ist bei allen durchgeführten Experimenten deutlich zu erkennen und statistisch signifikant.

Eine Vorinkubation mit den Extrakten kann, je nach Extrakt, die durch 6-OHDA hervorgerufene Neurodegeneration vermindern. Dies ist bei JGE (Abbildung 30B), PME (Abbildung 30C) und ZJE (Abbildung 30E) der Fall. CSE (Abbildung 30A) und REW (Abbildung 30D) sind in diesem Modell jedoch nicht in der Lage die durch 6-OHDA hervorgerufene Neurodegeneration zu verringern.



**Abbildung 30: Untersuchung der Neurodegeneration durch 6-OHDA im Stamm BZ555 (verschiedene Extrakte).**

Transgene Nematoden des Stammes BZ555 werden bei 20°C ab dem Eistadium mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Im L4-Larvenstadium werden sie für 2,5 h mit 6-OHDA oder Ascorbinsäure (Kontrolle) inkubiert, in M9 30 min gewaschen und für 24 h in substanzlosen Medien belassen. Anschließend werden fluoreszenzmikroskopisch Fotos der Nematoden aufgenommen und mittels Image J densitometrisch ausgewertet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD, einfaktorielles Anova mit Tukey's multiplem Vergleichstest,  $n = 3$  (je 20 Individuen pro Gruppe), ●●●●  $p < 0,0001$  gegen Kontrolle; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  gegen 6-OHDA.

Bei einer Vorinkubation mit CSE und einer darauf folgenden Behandlung mit 6-OHDA ist das Ausmaß der Neurodegeneration ähnlich wie bei 6-OHDA allein (Abbildung 30A). Die Degeneration der dopaminergen Neuronen durch 6-OHDA beträgt 56,3% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Durch eine Vorbehandlung mit CSE ist diese Degeneration geringfügig vermindert und liegt bei 51,8%. Dieser geringe neuroprotektive Effekt ist nicht statistisch signifikant.

Auch REW zeigt in diesem Modellsystem nur eine sehr geringe Neuroprotektion (Abbildung 30D). Im Vergleich zu der Gruppe, welche nur mit 6-OHDA behandelt wird, hat eine Vorinkubation der Nematoden mit REW einen protektiven Effekt um 11,8%. Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant.

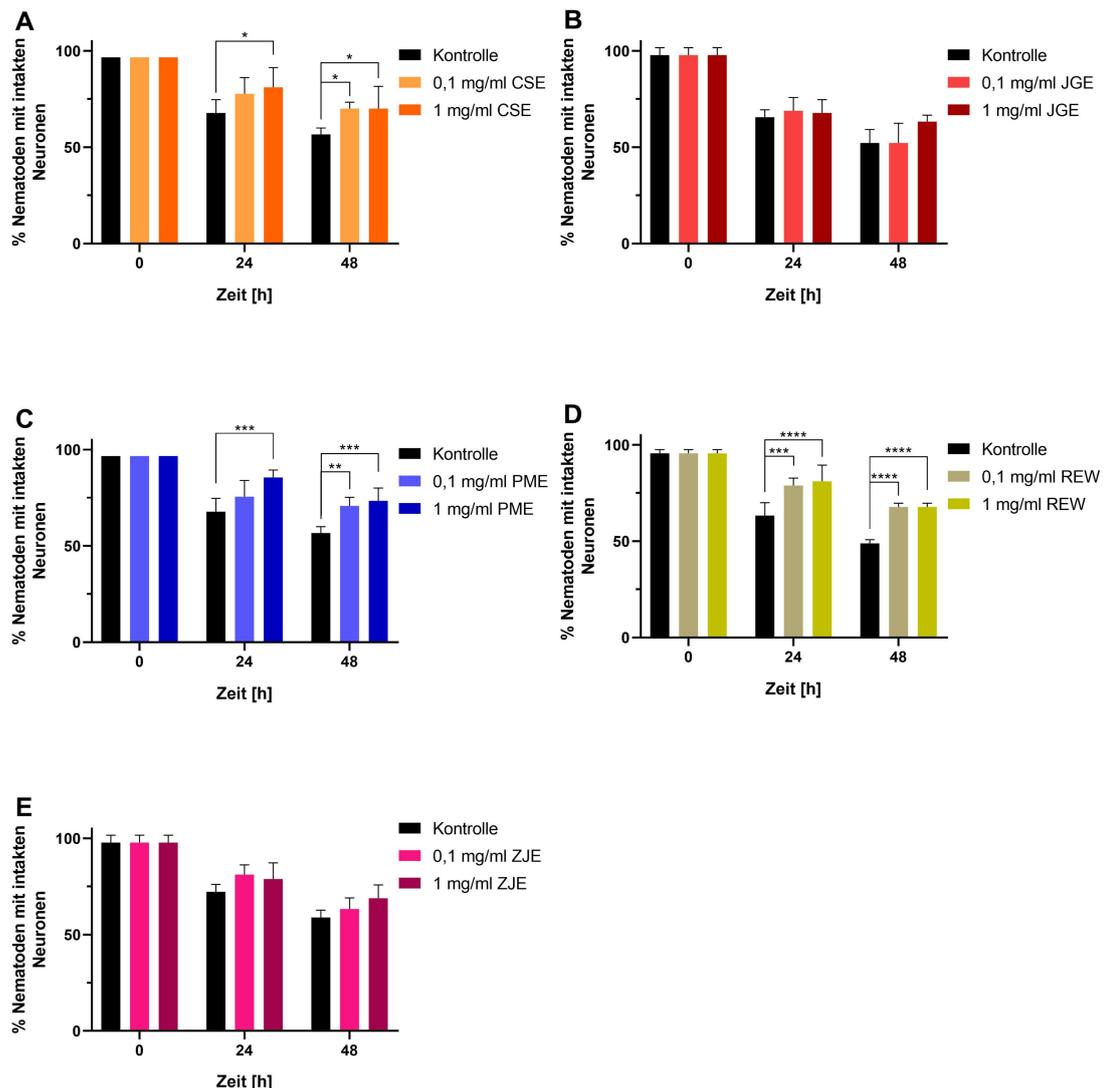
Anders verhält es sich bei einer Behandlung mit JGE (Abbildung 30B). Auch hier führt 6-OHDA zu einer starken Neurodegeneration. Die Protektion der dopaminergen Neuronen, welche durch JGE hervorgerufen wird, beträgt im Vergleich zu den nur mit 6-OHDA behandelten Nematoden 51,1% und ist statistisch signifikant.

Der protektive Effekt, den eine Vorbehandlung mit PME bewirkt, ist noch etwas stärker und beläuft sich auf 55,6% im Vergleich zu den nur mit 6-OHDA behandelten Nematoden (Abbildung 30C).

Auch ZJE zeigt einen signifikanten neuroprotektiven Effekt gegenüber der mit 6-OHDA behandelten Positivkontrolle (Abbildung 30E). Dieser Effekt ist mit 25,5% jedoch geringer als die durch PME oder JGE hervorgerufene Neuroprotektion.

#### **4.6.2 Untersuchung neuroprotektiver Effekte verschiedener Extrakte bei Überproduktion von Dopamin**

Die Neurodegeneration in Nematoden, welche durch eine Überproduktion von Dopamin hervorgerufen wird, kann durch einige der untersuchten Extrakte vermindert werden (Abbildung 31). Zu Beginn der Inkubation (0 h) besitzen 95,6 bis 97,8% der Nematoden vollständig intakte dopaminerge CEP-Neuronen in ihren Köpfen. Im Laufe der Zeit nimmt die Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen in der Kontrollgruppe deutlich ab. Nach 48 h haben nur noch 48,9% bis 58,9% der Tiere intakte dopaminerge Neuronen (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Untersuchung der Neurodegeneration durch eine erhöhte Dopaminsynthese im Stamm UA57 (verschiedene Extrakte).**

L4-Larven des transgenen Stammes UA57 werden bei 20°C ab dem Eistadium mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Nach 0 h, 24 h und 48 h werden die Nematoden unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung in Nematoden mit intakten Neuronen und Nematoden mit zerstörten Neuronen unterteilt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD, einfaktorielle Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest,  $n = 3$  (je 30 Individuen pro Gruppe), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Durch eine Inkubation mit CSE kommt es im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einer Verringerung der Neurodegeneration (Abbildung 31). Bereits nach 24 h zeigt sich, dass die höhere Konzentration an CSE, 1 mg/ml, eine signifikante Neuroprotektion in den Nematoden hervorruft. Dieser neuroprotektive Effekt ist tendenziell auch bei der geringeren Konzentration an CSE zu sehen, dies ist jedoch nicht signifikant. Durch 0,1 mg/ml CSE

erhöht sich die Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen im Vergleich zur Kontrolle um 14,7%. Durch 1 mg/ml CSE wird die Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen signifikant um 19,6% erhöht. Nach 48 h zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle ein noch stärkerer neuroprotektiver Effekt. Im Vergleich zur Kontrolle haben, unabhängig von der Konzentration an CSE, mit CSE inkubierte Nematoden 23,5% mehr intakte dopaminerge Neuronen.

Auch PME besitzt neuroprotektive Effekte (Abbildung 31C). 24 h nach Beginn der Inkubation lässt sich eine dosisabhängige Protektion der dopaminergen Neuronen erkennen. Durch 0,1 mg/ml PME erhöht sich die Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen im Vergleich zur Kontrolle um 11,5%. Durch 1 mg/ml PME sind es bereits 26,3% mehr Nematoden mit intakten Neuronen als in der Kontrollgruppe. Zu diesem Zeitpunkt ist nur die Wirkung der höheren Konzentration gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant. Nach 48 h Inkubationszeit verursachen beide Konzentrationen signifikante neuroprotektive Effekte. Hier ist die Anzahl der Nematoden mit intakten dopaminergen Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe um 24,7% bei 0,1 mg/ml PME bzw. 29,3% bei 1 mg/ml PME erhöht.

Der dritte Extrakt, welcher in diesem Experiment neuroprotektive Effekte besitzt, ist REW (Abbildung 31D). Im Gegensatz zu CSE und PME zeigen sich durch eine Inkubation mit REW bereits nach 24 h signifikante neuroprotektive Effekte durch beide eingesetzten Konzentrationen. Beide Konzentrationen haben einen ähnlich starken Effekt. Mit 0,1 mg/ml REW besitzen 24,6% mehr Nematoden intakte Neuronen als die Nematoden der Kontrollgruppe. Bei einer Inkubation mit 1 mg/ml REW erhöht sich die Anzahl der Nematoden mit intakten Neuronen im Vergleich zur Kontrolle um 28,1%. Nach weiteren 24 h Inkubationszeit ist der Effekt von REW noch stärker. Hier erhöht sich die Anzahl der Nematoden mit intakten dopaminergen Neuronen verglichen mit der Kontrolle um 38,7%. Zu diesem Zeitpunkt macht es keinen Unterschied mehr, welche Konzentration bei der Inkubation verwendet wird, da der Effekt bei beiden Konzentrationen genau gleich groß ist.

Eine Inkubation mit JGE oder ZJE ruft hingegen in diesem Modell keine signifikanten neuroprotektiven Effekte hervor (Abbildung 31B und E). Nach 24 h ist die Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen in der Gruppe, welche mit JGE inkubiert wird, im Vergleich zur Kontrollgruppe nur geringfügig erhöht (Abbildung 31B). Diese Erhöhung beträgt sowohl bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml JGE als auch bei 1 mg/ml JGE 3,4%. Nach 48 h zeigt eine Konzentration von 0,1 mg/ml JGE keinen Effekt. Der Grad der Neurodegeneration dieser Gruppe ist genau so groß wie der der Kontrolle. Eine Inkubation der Nematoden mit 1 mg/ml JGE bewirkt zu diesem Zeitpunkt eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung der Anzahl an intakten Neuronen im Vergleich zur Kontrolle. Eine

tendenzielle Protektion ist folglich zu erkennen, diese ist jedoch zu schwach um statistisch signifikant zu sein.

ZJE besitzt im Vergleich zu JGE nach 24 h Inkubation einen stärkeren, jedoch ebenfalls nicht signifikanten neuroprotektiven Effekt (Abbildung 31E). Die Anzahl an Nematoden mit intakten dopaminergen Neuronen erhöht sich im Vergleich zur Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt um 12,3% (0,1 mg/ml ZJE) bzw. um 9,3% (1 mg/ml ZJE). Nach 48 h ist ebenfalls ein geringer nicht signifikanter neuroprotektiver Effekt zu sehen. Hier sind 7,5% mehr Nematoden mit intakten Neuronen in der Gruppe, die mit 0,1 mg/ml ZJE inkubiert wird, als in der Kontrolle. Eine Inkubation mit 1 mg/ml ZJE bewirkt eine 17%ige Verbesserung im Vergleich zur Kontrolle.

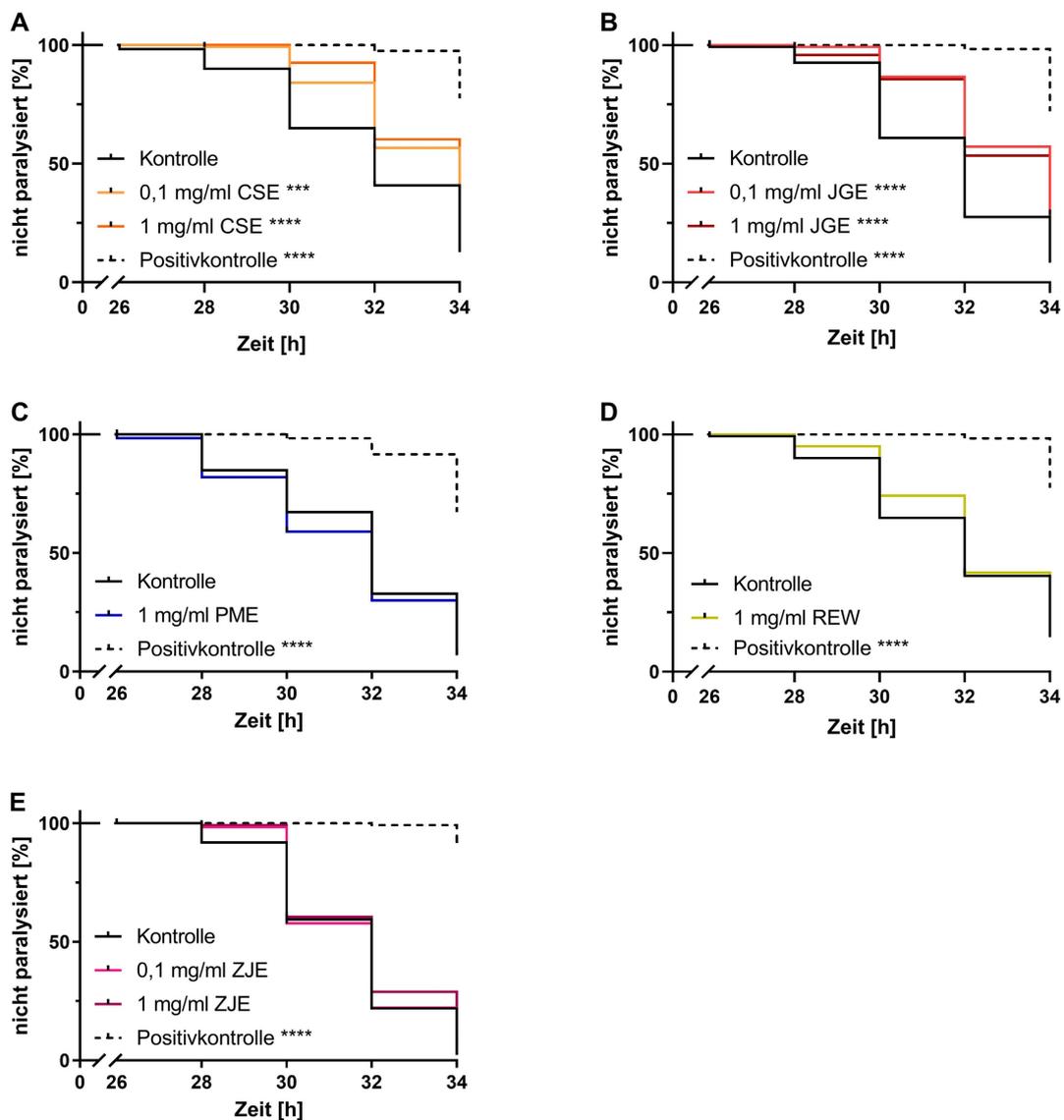
## **4.7 Untersuchungen verschiedener Extrakte auf neuroprotektive Wirkungen im M. Alzheimer Modell**

### **4.7.1 Modulation der A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Toxizität durch verschiedene Extrakte**

Eine verzögerte Paralyse der Nematoden ist mit einer verringerten Toxizität von A $\beta$ <sub>1-42</sub> gleich zu setzen. Von den hier untersuchten Extrakten sind nur CSE und JGE dazu in der Lage, die A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induzierte Paralyse zu verzögern (Abbildung 32A und B). PME, REW und ZJE hingegen bewirken keine Verzögerung der Paralyse im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Abbildung 32C, D und E). Eine Inkubation mit der hier eingesetzten Positivkontrolle bewirkt in allen durchgeführten Experimenten eine starke und signifikante Verzögerung der Paralyse (Abbildung 32).

Durch eine Vorinkubation mit CSE wird die A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induzierte Paralyse signifikant verzögert (Abbildung 32A). Die mediane Paralysezeit der Kontrolltiere beträgt  $32,0 \pm 0,4$  h. Durch 1 mg/ml CSE wird diese Zeit auf  $34,0 \pm 0,4$  h verlängert. Es lässt sich erkennen, dass die höhere Konzentration an CSE von 1 mg/ml die Zeit bis zum Eintreten der Paralyse tendenziell stärker verzögert als eine Konzentration von 0,1 mg/ml CSE. Hier beträgt die mediane Paralysezeit  $34,0 \pm 0,3$  h (Tabelle 21).

Auch eine Behandlung mit JGE führt zu einer signifikanten Verzögerung der Paralysezeit (Abbildung 32B). Die Kontrollgruppe hat eine mediane Paralysezeit von  $32,0 \pm 0,2$  h. Durch eine Inkubation mit 0,1 mg/ml JGE bzw. 1 mg/ml JGE verzögert sich das mediane Eintreten der Paralyse um 2 h, sodass sie sich auf  $34 \pm 0,3$  h beläuft (Tabelle 21).



**Abbildung 32: A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Toxizitätstest (verschiedene Extrakte).**

Transgene Nematoden des Stammes CL4176 werden bei 16°C ab dem Eistadium mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte, mit 5 mM Koffein als Positivkontrolle oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. L3-Larven werden auf Agarplatten mit OP50 überführt und bei 25°C gelagert. Nach 26, 28, 30, 32 und 34 h werden die Nematoden auf eine eingetretene Paralyse hin untersucht. Verglichen werden die Überlebenskurven mit einer Kaplan-Meier-Statistik;  $n = 3$  (je 40 Individuen pro Gruppe); Log-Rank (Mantel-Cox) Test; \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Die Daten zu ZJE entstanden im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Clara Brauer.

Eine Inkubation mit PME hingegen verzögert die Zeit bis zum Eintreten der durch A $\beta$ <sub>1-42</sub> hervorgerufenen Paralyse nicht (Abbildung 32C). Die medianen Paralysezeiten der Kontrolltiere und der Nematoden, welche mit 1 mg/ml PME behandelt werden, beträgt  $32,0 \pm 0,3$  h, während die mittlere Paralysezeit der Kontrolltiere  $31,7 \pm 0,2$  h und die der mit

dem Extrakt behandelten Nematoden  $31,4 \pm 0,2$  h beträgt (Tabelle 21). Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Abbildung 32D zeigt den Verlauf der eintretenden Paralyse von Nematoden, welche mit 1 mg/ml REW inkubiert werden, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch dieser Extrakt ist nicht in der Lage die durch  $A\beta_{1-42}$  hervorgerufene Toxizität zu verringern und somit die Zeit bis zum Eintreten der Paralyse zu verzögern. Das mediane Überleben der Kontrolltiere beläuft sich auf  $32,0 \pm 0,4$  h, das von Nematoden, welche mit 1 mg/ml REW behandelt werden, auf  $32,0 \pm 0,3$  h.

Auch ZJE kann die  $A\beta_{1-42}$ -induzierte Paralyse im Vergleich zur Kontrolle nicht verzögern (Abbildung 32E). Die medianen Paralysezeiten der Kontrolltiere und der Nematoden, welche mit 0,1 mg/ml ZJE oder 1 mg/ml ZJE behandelt werden, liegen bei  $32,0 \pm 0,2$  h (Kontrolle und 0,1 mg/ml ZJE) bzw.  $32,0 \pm 0,3$  h (1 mg/ml ZJE).

**Tabelle 21: Mittelwerte, Mediane und p-Werte der Untersuchung der  $A\beta$ -bedingten Paralyse der Nematoden des Stammes CL4176 (verschiedene Extrakte).**

Behandlung	Mittelwert [h] $\pm$ SD	% Differenz zur Kontrolle	Median [h] $\pm$ SD	% Differenz zur Kontrolle	p-Wert gegen Kontrolle
Kontrolle	$31,9 \pm 0,2$	-	$32,0 \pm 0,4$	-	-
0,1 mg/ml CSE	$32,8 \pm 0,1$	+ 2,8	$34,0 \pm 0,3$	+ 6,3	0,0004
1 mg/ml CSE	$33,1 \pm 0,1$	+ 3,8	$34,0 \pm 0,4$	+ 6,3	< 0,0001
Positivkontrolle	$34,0 \pm 0,03$	+ 6,6	-	-	< 0,0001
Kontrolle	$31,6 \pm 0,2$	-	$32,0 \pm 0,2$	-	-
0,1 mg/ml JGE	$32,9 \pm 0,1$	+ 4,1	$34,0 \pm 0,3$	+ 6,3	< 0,0001
1 mg/ml JGE	$32,7 \pm 0,2$	+ 3,5	$34,0 \pm 0,3$	+ 6,3	< 0,0001
Positivkontrolle	$34,0 \pm 0,02$	+ 7,6	-	-	< 0,0001
Kontrolle	$31,7 \pm 0,2$	-	$32,0 \pm 0,3$	-	-
1 mg/ml PME	$31,4 \pm 0,2$	- 0,9	$32,0 \pm 0,3$	$\pm 0$	0,463
Positivkontrolle	$33,8 \pm 0,1$	+ 6,6	-	-	< 0,0001
Kontrolle	$31,9 \pm 0,2$	-	$32,0 \pm 0,4$	-	-
1 mg/ml REW	$32,2 \pm 0,2$	+ 0,9	$32,0 \pm 0,3$	$\pm 0$	0,487
Positivkontrolle	$34,0 \pm 0,02$	+ 6,6	-	-	< 0,0001
Kontrolle	$31,5 \pm 0,2$	-	$32,0 \pm 0,2$	-	-
0,1 mg/ml ZJE	$31,6 \pm 0,2$	+ 0,3	$32,0 \pm 0,2$	$\pm 0$	0,597
1 mg/ml ZJE	$31,8 \pm 0,2$	+ 1,0	$32,0 \pm 0,3$	$\pm 0$	0,117
Positivkontrolle	$34,0 \pm 0,02$	+ 7,9	-	-	< 0,0001

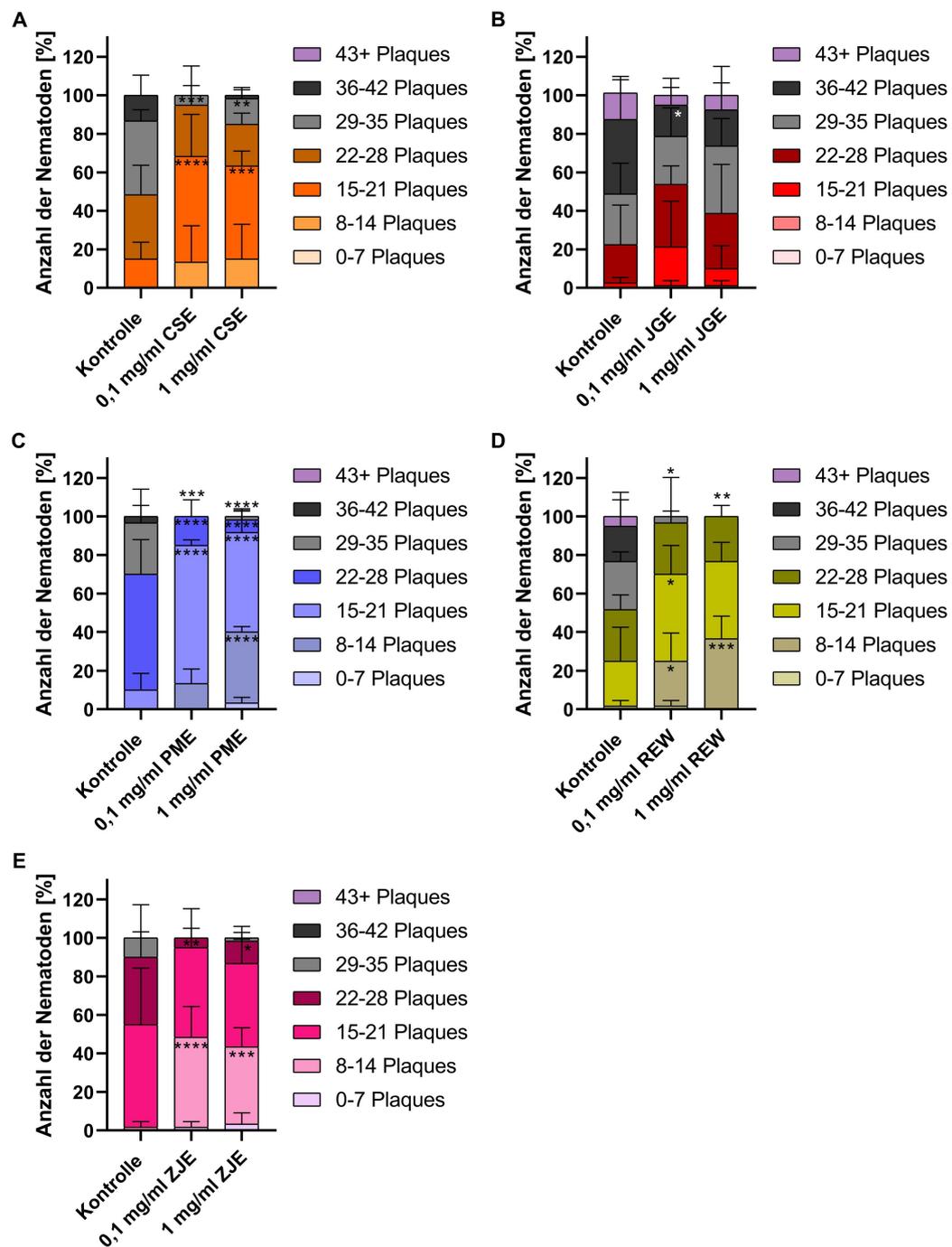
Eine Behandlung mit CSE oder JGE verringert die A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induzierte Toxizität, wohingegen PME, REW und ZJE nicht in der Lage sind die Paralysezeit zu verzögern.

#### 4.7.2 Modulation der A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Plaques durch verschiedene Extrakte

Wird die Anzahl der A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Plaques im transgenen Stamm CL2006 gezählt, ist ersichtlich, dass alle hier untersuchten Extrakte bis auf den JGE in der Lage sind, die Plaque-Anzahl im Kopf- und Schwanzbereich der Nematoden signifikant zu verringern (Abbildung 33; Tabelle 22).

Eine Behandlung mit CSE führt dazu, dass auch Nematoden mit weniger als 15 Plaques vorhanden sind, während die Nematoden der Kontrollgruppe mindestens 15 Plaques aufweisen (Abbildung 33A). Die Anzahl an Nematoden mit 15-21 Plaques nimmt durch eine Behandlung der Tiere mit CSE signifikant zu im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dahingegen nimmt die Anzahl der Nematoden mit einer höheren Anzahl an Plaques von 29-35 Plaques durch CSE signifikant ab. Dies ist sowohl bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml CSE als auch bei einer Konzentration von 1 mg/ml CSE der Fall. Der Effekt wird durch die höhere Konzentration an CSE im Vergleich zu 0,1 mg/ml CSE nicht weiter verstärkt. Auch die mittlere Plaque-Anzahl der Nematoden wird durch eine Behandlung mit CSE signifikant verringert (Tabelle 22). Die Kontrolltiere zeigen im Mittel  $28,5 \pm 0,8$  Plaques, während Nematoden, welche mit 0,1 mg/ml CSE behandelt werden, im Mittel  $19,9 \pm 3,2$  Plaques besitzen. Nematoden, die mit 1 mg/ml CSE inkubiert werden, besitzen im Mittel  $20,8 \pm 3,0$  Plaques. Diese Reduktion entspricht einer Verringerung der Plaque-Anzahl um 30,2% (0,1 mg/ml CSE) bzw. 27,0% (1 mg/ml CSE) im Vergleich zur Kontrolle.

Werden die Nematoden mit JGE behandelt, wird die mittlere Plaque-Anzahl dieser im Vergleich zu der der Kontrolltiere nicht signifikant verringert (Tabelle 22). Eine Tendenz zur Reduktion der Plaque-Anzahl lässt sich hier trotzdem erkennen. Es handelt sich um eine Verringerung der Plaque-Anzahl im Vergleich zur Kontrolle um 17,8% durch 0,1 mg/ml JGE und um 12,1% durch 1 mg/ml JGE. Werden die Nematoden nach der Anzahl der in ihnen vorhandenen Plaques in Gruppen eingeteilt, zeigt sich, dass es im Vergleich zur Kontrollgruppe durch eine Behandlung mit JGE zu keiner signifikanten Veränderung kommt (Abbildung 33B). Nur die Anzahl der Nematoden mit 36-42 Plaques wird durch eine Behandlung mit 0,1 mg/ml JGE im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert. Eine solche Tendenz ist bei einer Inkubation mit 1 mg/ml JGE ebenfalls vorhanden, jedoch nicht statistisch signifikant.



**Abbildung 33: Verteilung der Anzahl der Aβ<sub>1-42</sub>-Plaques in Nematoden des transgenen Stammes CL2006 (verschiedene Extrakte).**

Nematoden des Stammes CL2006, welche Aβ<sub>1-42</sub>-Plaques bilden, werden ab dem L4-Larvenstadium für 48 h bei 20°C mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Anschließend werden die Nematoden mit 4% PFA fixiert, permeabilisiert und mit Thioflavin-S gefärbt. Die Anzahl der Aβ<sub>1-42</sub>-Plaques im Kopf- und Schwanzbereich der Tiere wird gezählt. Es erfolgt eine Klassifizierung der Nematoden nach der Anzahl ihrer Plaques. Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte der Anzahl der Nematoden in der einzelnen Klasse ± SD, zweifaktorielle Anova mit Dunnetts multiplum Vergleichstest, n = 3 (JGE: n = 4) (je 20 Individuen pro Gruppe), \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001. Die Daten zu CSE, JGE, REW und ZJE entstanden im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Feline Frahm.

Eine Inkubation der Nematoden mit 0,1 mg/ml PME resultiert in einer im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 31,8% reduzierten mittleren Anzahl an A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Plaques in den Nematoden. Eine Erhöhung der Konzentration an PME auf 1 mg/ml bewirkt eine 47,7%ige signifikante Reduktion der mittleren Plaque-Anzahl (Tabelle 22). Auch bei der Einteilung der Nematoden anhand der Anzahl ihrer Plaques lassen sich deutliche protektive Effekte von PME erkennen: Während die Nematoden der Kontrollgruppe mindestens 15 Plaques aufweisen, gibt es durch eine Inkubation mit 0,1 mg/ml PME auch Nematoden mit 8-14 Plaques (Abbildung 33C). Dies ist auch bei einer Behandlung der Tiere mit 1 mg/ml PME der Fall. Hier ist die Anzahl an Nematoden mit 8-14 Plaques im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Zudem gibt es hier auch Nematoden mit weniger als 8 Plaques. Die Anzahl der Nematoden mit 15-21 Plaques ist durch eine Behandlung mit beiden Konzentrationen an PME im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht, während die Anzahl an Nematoden mit 22-28 Plaques oder mit 29-35 Plaques durch 0,1 mg/ml und 1 mg/ml PME signifikant verringert wird.

**Tabelle 22: Mittelwerte und p-Werte der Anzahl an A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Plaques in den Kopf- und Schwanzbereichen der Nematoden des Stammes CL2006 (verschiedene Extrakte).**

Behandlung	Mittelwert $\pm$ SD	% Differenz zur Kontrolle	p-Wert gegen Kontrolle
Kontrolle	28,5 $\pm$ 0,8	-	-
0,1 mg/ml CSE	19,9 $\pm$ 3,2	- 30,2	0,012
1 mg/ml CSE	20,8 $\pm$ 3,0	- 27,0	0,019
Kontrolle	34,8 $\pm$ 4,2	-	-
0,1 mg/ml JGE	28,6 $\pm$ 5,7	- 17,8	0,230
1 mg/ml JGE	30,6 $\pm$ 5,9	- 12,1	0,475
Kontrolle	26,7 $\pm$ 1,6	-	-
0,1 mg/ml PME	18,2 $\pm$ 1,0	- 31,8	0,0002
1 mg/ml PME	15,4 $\pm$ 0,7	- 47,7	< 0,0001
Kontrolle	28,7 $\pm$ 5,9	-	-
0,1 mg/ml REW	18,6 $\pm$ 2,9	- 35,2	0,034
1 mg/ml REW	17,3 $\pm$ 1,1	- 39,7	0,020
Kontrolle	21,9 $\pm$ 3,0	-	-
0,1 mg/ml ZJE	15,0 $\pm$ 1,7	- 31,5	0,021
1 mg/ml ZJE	15,8 $\pm$ 2,3	- 27,9	0,035

Ein ähnliches Bild ergibt sich bei einer Behandlung der Nematoden mit REW. Die mittlere Plaque-Anzahl wird durch 0,1 mg/ml REW im Vergleich zur Kontrolle um 35,1% verringert

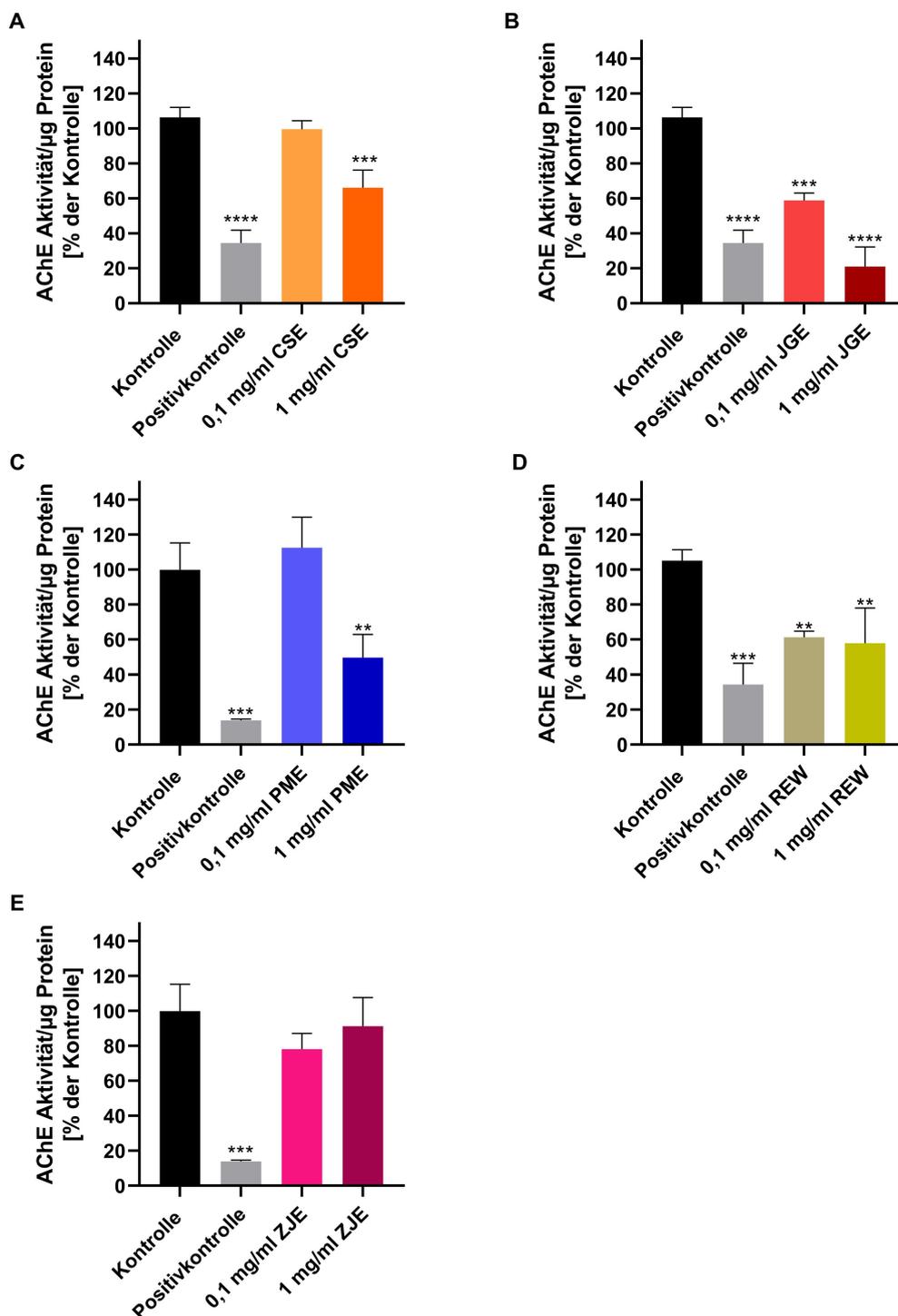
auf  $18,2 \pm 2,9$  Plaques pro Nematode. Durch eine Erhöhung der Konzentration auf 1 mg/ml REW nimmt auch der Effekt zu. Die mittlere Plaque-Anzahl wird im Vergleich zur Kontrolle um 39,7% verringert (Tabelle 22). Durch eine Behandlung der Nematoden mit REW gibt es im Vergleich zur Kontrolle signifikant mehr Nematoden mit einer geringen Plaque-Anzahl von 8-14 Plaques (Abbildung 33D). Auch die Anzahl an Nematoden mit 15-21 Plaques wird durch eine Inkubation mit 0,1 mg/ml REW im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Zudem wird die Anzahl an Nematoden mit einer hohen Plaque-Anzahl von 29-35 Plaques durch beide Konzentrationen des REW im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert.

Einen ebenfalls protektiven Effekt auf die Akkumulierung von  $A\beta_{1-42}$ -Plaques in den Nematoden besitzt ZJE. Zum Einen wird die Anzahl an Nematoden mit einer geringen Anzahl an Plaques (8-14 Plaques) durch eine Behandlung mit ZJE (0,1 mg/ml und 1 mg/ml ZJE) signifikant erhöht, zum Anderen wird durch ZJE die Anzahl an Nematoden mit 22-28 Plaques signifikant verringert (Abbildung 33E). Passend hierzu wird auch die mittlere Anzahl an Plaques in den Nematoden von  $21,9 \pm 3,0$  Plaques in der Kontrollgruppe auf  $15,0 \pm 1,7$  Plaques bei den Nematoden, welche mit 0,1 mg/ml ZJE behandelt werden, bzw. auf  $15,8 \pm 2,3$  Plaques bei den mit 1 mg/ml ZJE behandelten Nematoden verringert. Dies entspricht einer Reduktion der Plaque-Anzahl im Vergleich zur Kontrolle um 31,5% bzw. 27,9% (Tabelle 22).

### 4.7.3 Einfluss verschiedener Extrakte auf die Aktivität der AChE

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle inhibiert die Positivkontrolle Aldicarb die Aktivität der AChE der Nematoden um 67,3% bis 86,0%. Diese Inhibition ist jeweils signifikant mit einem p-Wert von  $p \leq 0,001$  (Abbildung 34).

Durch CSE kommt es ebenfalls zu einer Inhibition der AChE-Aktivität (Abbildung 34A). Bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml CSE ist die Inhibition mit 6,4% nicht signifikant. Bei der höheren Konzentration von 1 mg/ml CSE zeigt sich eine signifikante Inhibition der AChE-Aktivität. Im Vergleich zur Kontrolle ergibt sich hier eine Inhibition um 37,8%. Die durch CSE hervorgerufene Inhibition der AChE-Aktivität ist jedoch deutlich geringer als die der Positivkontrolle Aldicarb, welche sich auf 67,6% beläuft.



**Abbildung 34: Bestimmung der AChE-Aktivität (verschiedene Extrakte).**

Das Homogenat von 3000 bis 4000 wildtypischen L4-Larven wird mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte, 100 µM Aldicarb als Positivkontrolle oder DMSO als Kontrolle in eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wird in alle belegten Wells 200 µl einer Lösung mit Acetylthiocholiniodid und DTNB hinzugegeben und die Absorption bei 406 nm alle 30 Minuten für 24 Stunden gemessen. In einem 10 h-Intervall mit möglichst linearem Anstieg der Absorption wurde die Steigung der Geraden errechnet, was der Aktivität der AChE entspricht. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SD, normiert auf die erste von zwei Kontrollen, pro µg Protein, einfaktorielles Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest,  $n = 3$ , \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Durch JGE kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der AChE-Aktivität (Abbildung 34B). Durch die geringere Konzentration von 0,1 mg/ml JGE kommt es zu einer 44,8%igen Inhibition. Die Aktivität der AChE ist hier im Vergleich zur Kontrolle bereits signifikant verringert. Wird die Konzentration auf 1 mg/ml JGE erhöht, zeigt sich eine weit stärkere Inhibition von 80,3%. Dieser Effekt ist sogar etwas stärker als der der Positivkontrolle Aldicarb, die im Vergleich zur Kontrolle eine Inhibition um 67,6% erreicht.

Wie in Abbildung 34C zu sehen ist, besitzt auch eine Konzentration von 1 mg/ml PME einen signifikanten inhibierenden Effekt auf die Aktivität der AChE. Dieser Effekt ist mit einer Inhibition um 50,3% im Vergleich zur Kontrolle nicht so stark wie die durch die Positivkontrolle Aldicarb vermittelte Inhibition von 86,0%. Eine geringere Konzentration an PME (0,1 mg/ml) verursacht im Vergleich zur Kontrolle keine Inhibition der AChE.

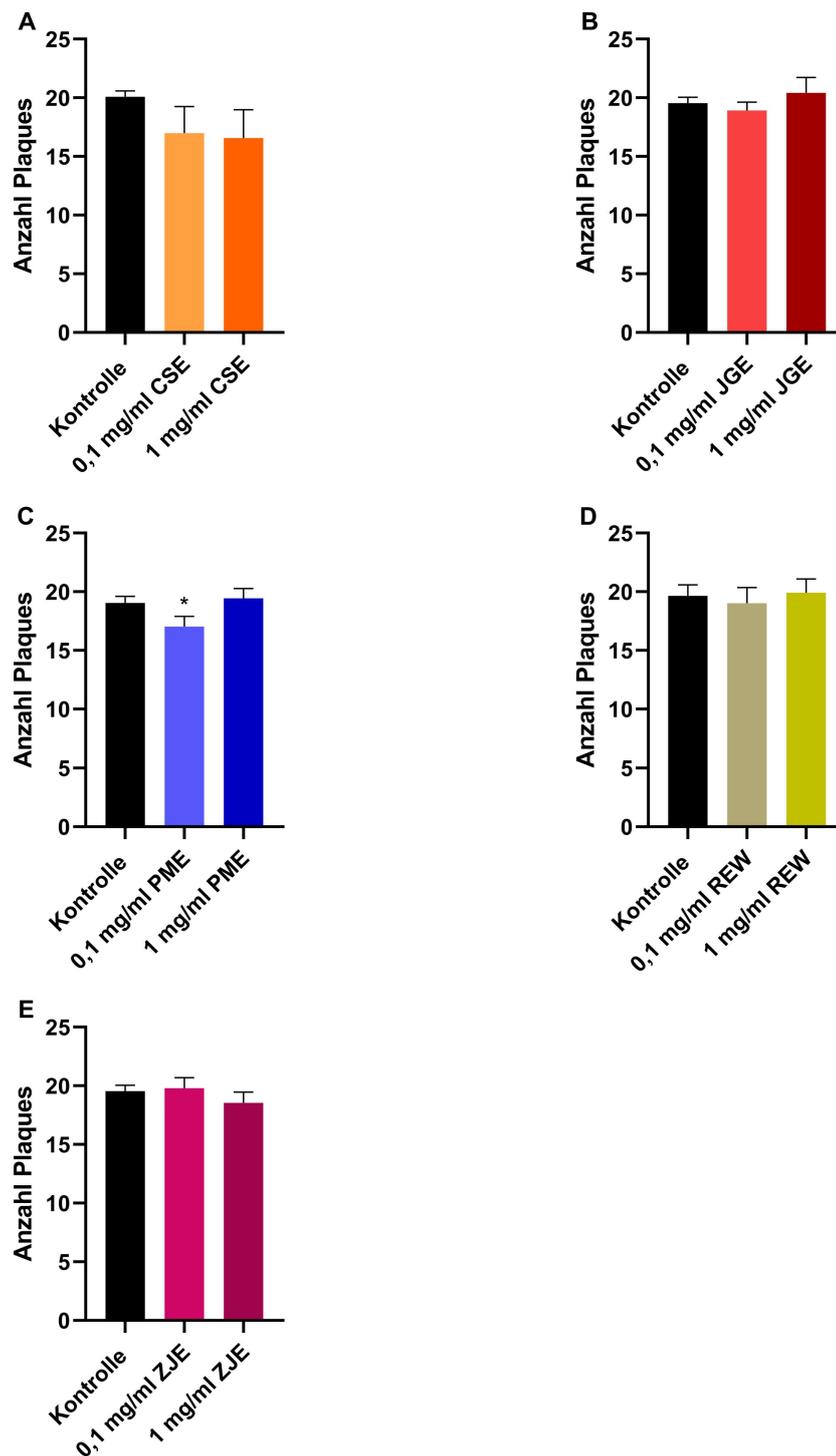
Wird das inhibitorische Potential von REW untersucht, ist ersichtlich, dass beide Konzentrationen an REW (0,1 mg/ml und 1 mg/ml) eine sehr ähnliche Effektstärke erzielen (Abbildung 34D). Es kommt zu einer Inhibition um 41,8% (0,1 mg/ml REW) bzw. 44,9% (1 mg/ml REW). Es besteht keine Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition der AChE durch REW und die Positivkontrolle Aldicarb hat einen stärkeren inhibitorischen Effekt. Dieser beträgt im Vergleich zur Kontrolle 67,3%.

Im Vergleich zu den anderen Extrakten zeigt ZJE als einziger Extrakt in beiden untersuchten Konzentrationen keinen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der AChE (Abbildung 34E). Während die Positivkontrolle Aldicarb die AChE-Aktivität um 86,0% verringert, bewirken 0,1 mg/ml ZJE eine 21,8%ige Inhibition und 1 mg/ml ZJE eine Inhibition um 8,6%. Diese Effekte sind jedoch statistisch nicht signifikant.

## **4.8 Untersuchungen verschiedener Extrakte auf neuroprotektive Wirkungen im C. Huntington Modell**

### **4.8.1 Modulation der PolyQ-Plaques durch verschiedene Extrakte**

Bei der Untersuchung der im Stamm EAK 103 gebildeten PolyQ-Plaques zeigt keiner der genutzten Extrakte eine starke Reduktion der Anzahl an gebildeten Plaques. Die Nematoden der Kontrollgruppen besitzen 19 bis 20 Plaques im Kopfbereich. Durch eine Inkubation mit JGE (Abbildung 35B), REW (Abbildung 35D) und ZJE (Abbildung 35E) verändert sich die Plaque-Anzahl im Vergleich zu der der Kontrolltiere nicht.



**Abbildung 35: Untersuchung der durch Fragmente eines mutierten humanen Huntingtinproteins hervorgerufenen Plaquebildung im Stamm EAK103 (verschiedene Extrakte).**

Transgene Nematoden des Stammes EAK103 werden bei 20°C ab dem Eistadium mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. An Tag 3 nach Beginn der Inkubation wird die Anzahl der Plaques unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung gezählt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD, einfaktorische Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest,  $n = 3$  (je 20 Individuen pro Gruppe), \*  $p < 0,05$ .

Werden die Nematoden mit CSE behandelt, kommt es zu einer leichten Verringerung der Anzahl der gebildeten Plaques (Abbildung 35A). Die Tiere der Kontrollgruppe besitzen im Mittel 20,1 Plaques. Nematoden, welche mit 0,1 mg/ml CSE inkubiert werden, besitzen im Mittel 17,0 und Nematoden, die mit 1 mg/ml CSE behandelt werden, 16,6 Plaques. Diese leichte Verringerung der Plaque-Anzahl ist jedoch nicht signifikant.

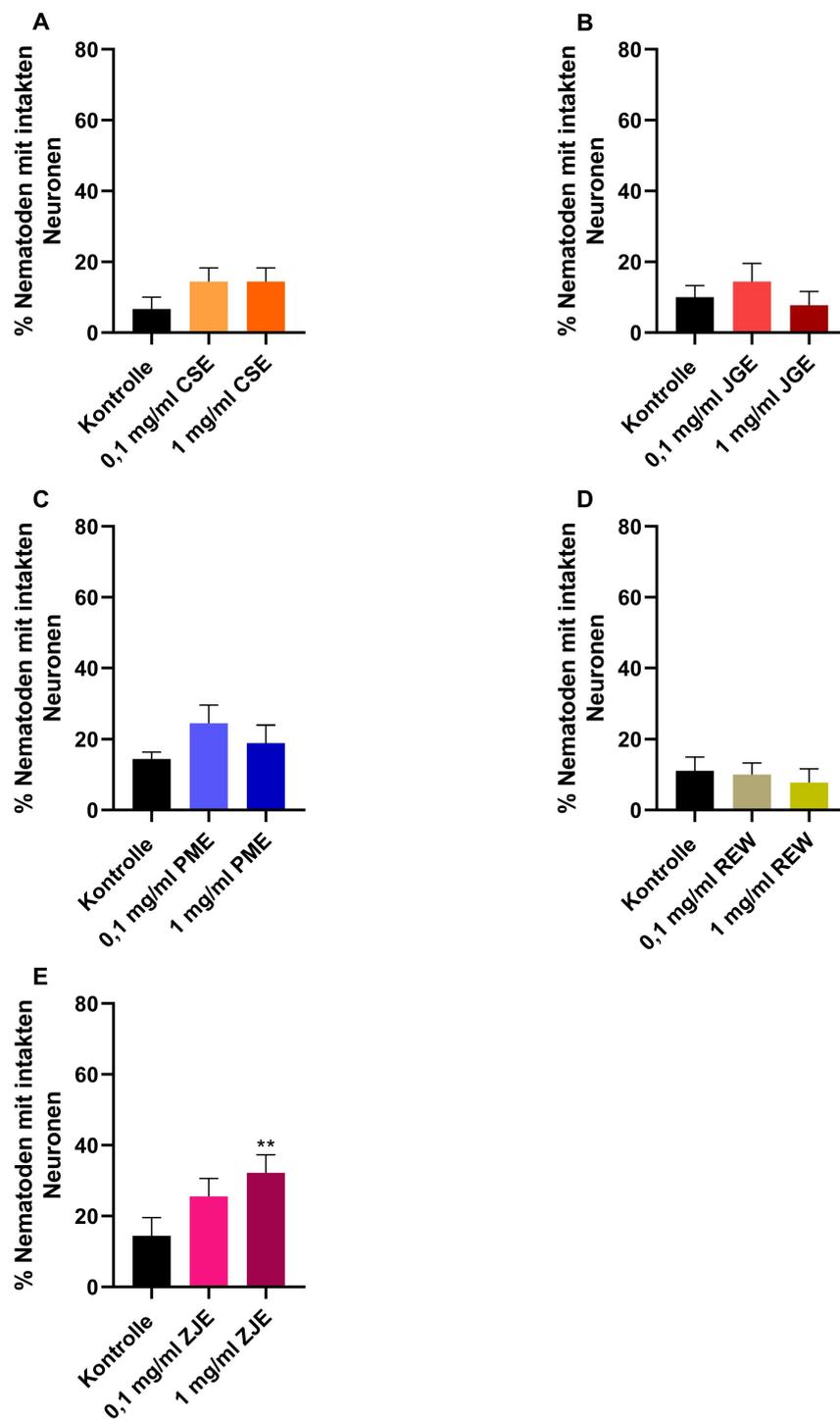
Eine Inkubation mit PME bewirkt nur bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml eine signifikante Reduktion der Plaque-Anzahl (Abbildung 35C). Hierdurch verringert sich die Anzahl der Plaques im Vergleich zu den Kontrolltieren, welche im Mittel 19,1 Plaques besitzen, um 11% auf 17,0 Plaques. Durch eine Behandlung der Nematoden mit einer höheren Konzentration an PME (1 mg/ml) zeigt sich jedoch keine Verringerung der Plaque-Anzahl im Vergleich zu den Kontrolltieren (19,5 Plaques bei 1 mg/ml PME; 19,1 Plaques in der Kontrollgruppe).

#### **4.8.2 Modulation der PolyQ-bedingten Neurodegeneration durch verschiedene Extrakte**

Die Extrakte werden hinsichtlich neuroprotektiver Effekte bezüglich der PolyQ-bedingten Neurodegeneration untersucht. Nach einer Inkubation der Nematoden für zehn Tage besitzen in der Kontrollgruppe bereits 85,6% bis 93,3% der Nematoden degenerierte ASH-Neuronen. Im Umkehrschluss besitzen nur 6,7% bis 14,4% der Nematoden intakte Neuronen.

Durch eine Inkubation mit CSE zeigt sich keine signifikante Protektion der Neuronen (Abbildung 36A). Eine Tendenz zur Neuroprotektion ist jedoch zu erkennen. Durch CSE erhöht sich die Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen um das 2,2-Fache. Hierbei macht es keinen Unterschied ob die Nematoden mit 0,1 mg/ml CSE oder mit 1 mg/ml CSE inkubiert werden.

Auch JGE, PME und REW haben keine neuroprotektiven Effekte gegenüber der PolyQ-bedingten Neurodegeneration (Abbildung 36B, C und D). Anders als bei CSE lässt sich hier jedoch keine Protektion erkennen – auch keine Tendenz.



**Abbildung 36: Untersuchung der durch Fragmente des humanen Huntingtins hervorgerufenen Neurodegeneration im Stamm HA659 (verschiedene Extrakte).**

Transgene Nematoden des Stammes HA659 werden bei 20°C ab dem Eistadium mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Die Medien werden alle 2-3 Tage gewechselt. Ab dem L4-Stadium werden die Nematoden zusätzlich mit FUDR behandelt. An Tag 10 nach Beginn der Inkubation werden die Nematoden unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung in Nematoden mit intakten Neuronen und Nematoden mit zerstörten Neuronen unterteilt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD, einfaktorielles Anova mit Dunnett's multiplum Vergleichstest,  $n = 3$  (je 30 Individuen pro Gruppe), \*\*  $p < 0,01$ .

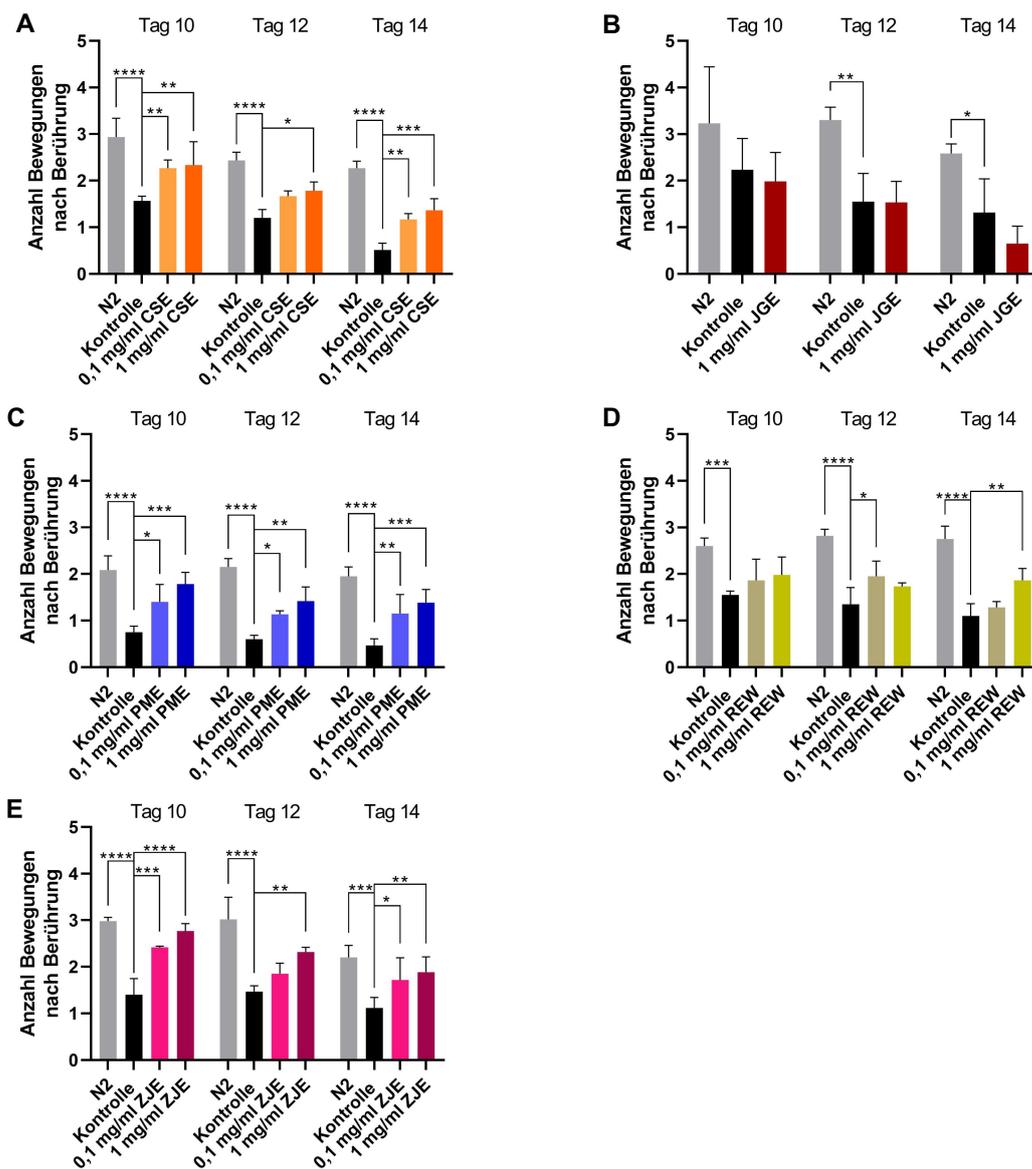
Eine signifikante Neuroprotektion wird hingegen durch eine Inkubation mit ZJE hervorgerufen (Abbildung 36E). Eine Inkubation mit 0,1 mg/ml ZJE bewirkt eine Erhöhung der Anzahl an Nematoden mit intakten Neuronen um das 1,8-Fache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant. Weiterhin zeigt sich eine dosisabhängige Verbesserung der Neuroprotektion durch ZJE: Eine Inkubation mit der höheren Konzentration von 1 mg/ml ZJE hat eine stärkere Protektion der ASH-Neuronen zur Folge als 0,1 mg/ml ZJE. Diese Protektion führt zu einer Erhöhung der Nematoden mit intakten Neuronen auf 32,2%, was im Vergleich zur Kontrolle dem 2,2-Fachen (+ 123,6%) entspricht. Dieser neuroprotektive Effekt ist signifikant.

#### **4.8.3 Einfluss verschiedener Extrakte auf die Reaktionsfähigkeit der Nematoden auf mechanische Stimuli**

Werden die Nematoden des transgenen Stammes HA659 am 10., 12. und 14. Tag nach dem Eistadium mit Hilfe eines Platindrahtes an ihrer Schnauze berührt, zeigen sie eine signifikant schwächere Reaktion in Form von Rückwärtsbewegungen im Vergleich zum wildtypischen Stamm (Abbildung 37).

Eine Behandlung der Nematoden mit CSE führt im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren des Stammes HA659 zu einer erhöhten Reaktionsfähigkeit der Nematoden (Abbildung 37A). An Tag 10 machen die mit CSE inkubierten Nematoden 2,3 Rückwärtsbewegungen, während die Kontrolltiere nur 1,6 Bewegungen machen. Dieser Effekt ist statistisch signifikant und es spielt keine Rolle, ob die Tiere mit 0,1 mg/ml CSE oder mit 1 mg/ml CSE behandelt werden. An Tag 12 hingegen bewirkt nur eine Behandlung mit 1 mg/ml CSE eine signifikante Verbesserung der Reaktionsfähigkeit im Vergleich zur Kontrolle, eine Tendenz ist aber auch bei einer Inkubation mit 0,1 mg/ml CSE zu sehen. An Tag 14 verbessern wieder beide Konzentrationen an CSE die Reaktionsfähigkeit der Nematoden signifikant. Die Kontrollgruppe macht im Mittel 0,5 Rückwärtsbewegungen, während die mit 0,1 mg/ml CSE behandelten Tiere 1,2 und die mit 1 mg/ml CSE inkubierten Nematoden 1,4 Bewegungen machen.

Werden die Nematoden mit 1 mg/ml JGE behandelt, wird die Reaktionsfähigkeit der Nematoden auf den noxischen Stimulus im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verbessert (Abbildung 37B). Im Gegenteil – an Tag 14 bewirkt eine Behandlung der Nematoden mit JGE im Vergleich zur Kontrollgruppe eine tendenziell verringerte Reaktionsfähigkeit. Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant. Die geringere Konzentration wird auf Grund des fehlenden Effekts nach einer Inkubation mit 1 mg/ml JGE nicht dargestellt.



**Abbildung 37: Untersuchung der durch Fragmente des humanen Huntingtins hervorgerufenen Reduzierung der nozizeptorischen Wahrnehmung im Stamm HA659 (verschiedene Extrakte).** Transgene Nematoden des Stammes HA659 werden bei 20°C ab dem Eistadium mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Die Medien werden alle 2-3 Tage gewechselt. Ab dem L4-Stadium werden die Nematoden zusätzlich mit FUDR behandelt. An den Tagen 10, 12 und 14 nach Beginn der Inkubation werden die Nematoden an ihrer Schnauze berührt und die Rückwärtsbewegungen gezählt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD, zweifaktorielle Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest,  $n = 3$  (je 10 Individuen pro Gruppe), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Die Daten zu CSE, JGE, REW und ZJE entstanden im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Feline Frahm.

Ein gänzlich anderes Bild zeigt sich bei einer Behandlung der Nematoden mit verschiedenen Konzentrationen an PME (Abbildung 37C). Eine Inkubation mit 0,1 mg/ml PME verbessert die Reaktionsfähigkeit der Nematoden im Vergleich zur Kontrolle zu allen untersuchten

Zeitpunkten signifikant. Auch eine Behandlung mit 1 mg/ml PME hat eine signifikante Verbesserung der Reaktionsfähigkeit zur Folge. Dieser Effekt ist stärker als der, welcher durch die niedrigere Konzentration an PME hervorgerufen wird. An Tag 10 beispielsweise machen Nematoden der Kontrollgruppe 0,8 Rückwärtsbewegungen, während Nematoden, welche mit 0,1 mg/ml PME behandelt werden, 1,4 und mit 1 mg/ml PME inkubierte Nematoden 1,8 Rückwärtsbewegungen machen. Zu diesem Zeitpunkt gibt es keinen Unterschied zwischen der Reaktionsfähigkeit der wildtypischen Nematoden und der Nematoden des Stammes HA659, welche mit 1 mg/ml PME behandelt werden.

Werden die Nematoden des Stammes HA659 mit REW inkubiert, zeigt sich auch hier ein protektiver Effekt. Die Reaktionsfähigkeit der Tiere ist im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abbildung 37D). Dieser Effekt ist an Tag 10 nach dem Eistadium noch nicht signifikant, eine Tendenz ist jedoch erkennbar. An Tag 12 bewirkt die niedrigere Konzentration von 0,1 mg/ml REW eine signifikante Verbesserung der Reaktionsfähigkeit der Nematoden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dahingegen ist an Tag 14 die Reaktionsfähigkeit der Nematoden, welche mit 1 mg/ml REW behandelt werden, im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Diese Nematoden machen 1,9 Rückwärtsbewegungen, während die Kontrolltiere nur 1,1 Bewegungen machen.

Auch durch eine Behandlung der Nematoden mit verschiedenen Konzentrationen an ZJE wird die Reaktion auf den mechanischen Stimulus im Vergleich zur Kontrollgruppe verbessert (Abbildung 37E). An Tag 10 machen die Kontrolltiere im Mittel 1,4 Rückwärtsbewegungen, während die mit 0,1 mg/ml ZJE behandelten Tiere 2,4 und die mit 1 mg/ml ZJE inkubierten Nematoden 2,8 Rückwärtsbewegungen machen. Zu diesem Zeitpunkt besteht statistisch gesehen kein Unterschied zwischen den mit ZJE behandelten Nematoden und den wildtypischen Nematoden, welche nicht von einer Neurodegeneration betroffen sind. An Tag 12 zeigt eine Behandlung der Nematoden mit 1 mg/ml ZJE im Vergleich zur Kontrolle erneut eine signifikante Verbesserung der Reaktionsfähigkeit. Auch bei der geringeren Konzentration ist eine tendenzielle Zunahme der Reaktionsfähigkeit zu erkennen, diese ist jedoch nicht signifikant. An Tag 14 wiederum verbessern beide Konzentrationen an ZJE im Vergleich zur Kontrollgruppe die Reaktionsfähigkeit der Nematoden auf den noxischen Stimulus.

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Allgemeine protektive Wirkungen von OBE und seinen Inhaltsstoffen

OBE zeigt *in vitro* antioxidative Wirkungen. Ein methanolischer Extrakt aus Olivenblättern zeigt in einem weiteren *in vitro* Experiment, bei dem der radikalfangende Effekt von Substanzen anhand des 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radikals gemessen wird, ebenfalls radikalfangende Eigenschaften (LUO et al., 2019). Diese scheinen jedoch schwächer zu sein, als die des hier untersuchten Extraktes, da bei LUO et al. (2019) erst bei etwa 0,8 mg/ml Extrakt alle Radikale abgefangen werden, während dies hier bereits bei 0,1 mg/ml der Fall ist.

In den Nematoden jedoch wird das durch thermalen Stress erhöhte Level an ROS nicht verringert. Die direkte antioxidative Wirkung, welche *in vitro* zu sehen ist, scheint demnach nicht auszureichen, um die durch Hitze entstandenen ROS in den Nematoden signifikant zu senken. Anders als in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigt der Extrakt, welcher von LUO et al. (2019) eingesetzt wird, auch *in vivo* in *C. elegans* antioxidative Eigenschaften. Möglicherweise liegt dies an der unterschiedlichen Durchführung der Messung des Gehaltes an ROS: Während in der vorliegenden Arbeit die Nematoden während der gesamten Messung thermalem Stress von 37°C ausgesetzt werden, werden die Nematoden von LUO et al. (2019) nur für 1 h mit 35°C behandelt. Zusätzlich sind die von LUO et al. (2019) eingesetzten Nematoden jünger und der Extrakt ein anderer. Es ist folglich durchaus möglich, dass Extrakte aus Olivenblättern *in vivo* antioxidative Eigenschaften besitzen, auch wenn dies in dieser Arbeit nicht gezeigt werden kann.

Die Inhaltsstoffe des OBE besitzen *in vitro* – mit Ausnahme der OS – ebenfalls antioxidative bzw. radikalfangende Eigenschaften. Die stärksten Effekte werden durch 3-HT und TYR vermittelt. Auch BEGINES et al. (2019) berichten von starken radikalfangenden Eigenschaften von 3-HT. Jedoch ist TYR nicht in der Lage, in dem von BEGINES et al. (2019) durchgeführten DPPH-Assay antioxidative Wirkungen *in vitro* zu zeigen. KIM et al. (2021) weisen jedoch radikalfangende Eigenschaften von TYR nach, wenn das gleiche Radikal genutzt wird, welches auch in dieser Arbeit Verwendung findet. Wird jedoch der DPPH-Assay angewandt, zeigt TYR keine antioxidativen Eigenschaften (KIM et al., 2021). TYR ist folglich antioxidativ *in vitro*, es scheint jedoch wichtig zu sein, unter welchen experimentellen Bedingungen das antioxidative Potential *in vitro* gemessen wird.

Im Gegensatz zum OBE besitzen OP und TYR auch *in vivo* in *C. elegans* eine antioxidative Wirkung. Der Gehalt an OP und TYR in dem für diese Arbeit verwendeten OBE scheint jedoch nicht ausreichend zu sein, das ROS-Level der Nematoden signifikant zu senken. Wie hoch die im OBE enthaltene Menge an OP und TYR ist, ist nicht bekannt. Der Extrakt, welcher durch MARTÍN-VERTEDOR et al. (2016) untersucht wird, enthält als Hauptinhaltsstoff OP, welches mehr als 50% des Polyphenolgehalts im OBE darstellt. Zusätzlich sind etwa 0,5% des Polyphenolgehalts 3-HT enthalten. Der Gehalt an TYR ist geringer (MARTÍN-VERTEDOR et al., 2016). Die genaue Zusammensetzung des für diese Arbeit genutzten Extraktes sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Von ALNUSAIRE et al. (2021) wurden in Caco-2 Zellen prooxidative Effekte eines Olivenblattextraktes entdeckt. Zudem sind in diesem Extrakt Substanzen wie Olenosid A enthalten, die basierend auf einer computergestützten Untersuchung antioxidative Enzyme wie die SOD oder die Glutathion-Reduktase inhibieren können (ALNUSAIRE et al., 2021). Dies könnte ebenfalls ein Grund für das Ausbleiben antioxidativer Effekte in den Nematoden sein.

Während 3-HT starke direkte antioxidative Wirkungen *in vitro* besitzt, kann es in den Nematoden das endogene Level an ROS nicht signifikant verringern. In Zellen, welche auf Grund einer Behandlung mit UV-Licht ein erhöhtes Level an ROS zeigen, ist 3-HT dagegen in der Lage, die Menge an ROS zu verringern (ZWANE et al., 2012). Die starken radikalfangenden Eigenschaften von 3-HT *in vitro* scheinen jedoch in *C. elegans* nicht ausreichend zu sein, eine antioxidative Wirkung zu vermitteln. Die OS zeigt weder *in vitro* noch *in vivo* antioxidative Effekte. In den Experimenten von ZHANG et al. (2015) jedoch besitzt die OS antioxidative Effekte in *C. elegans*, nachdem die Nematoden für drei Tage mit 300 µM OS behandelt wurden. Die längere Inkubationszeit mit der höheren Konzentration an OS, als sie in dieser Arbeit verwendet wird, scheint demnach ausschlaggebend zu sein für die erfolgreiche Messung des antioxidativen Potentials der OS. Da in dieser Arbeit die Inkubation der Nematoden in Flüssigmedien erfolgt, ist die einsetzbare Konzentration der OS durch ihre schlechte Löslichkeit limitiert. ZHANG et al. (2015) behandeln die Nematoden auf Agarplatten mit OS, wodurch die einsetzbare Konzentration deutlich höher ausfällt.

Durch fluoreszenzlöschende Eigenschaften (*quenching*) des OBE oder seiner Inhaltsstoffe kann die Messung der endogenen Menge an ROS beeinflusst werden, weshalb der OBE und seine Inhaltsstoffe auf diese Eigenschaft hin untersucht werden. Obwohl OBE in einer Konzentration von 1 mg/ml in der Lage ist, *in vitro* die Fluoreszenz von DCF zu verringern (Abbildung 42A), zeigt dieser Extrakt in den wildtypischen Nematoden keinen antioxidativen Effekt. Der Extrakt scheint also in den Nematoden nicht ausreichend stark zu akkumulieren,

um *in vivo* einen fluoreszenzlöschenden Effekt hervorzurufen. Auch OP zeigt in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  fluoreszenzlöschende Eigenschaften (Abbildung 42B). Dieser Effekt ist jedoch ausgesprochen gering und scheint durch die sehr kleinen Schwankungen bzw. Standardabweichungen in diesem Experiment zu Stande zu kommen. Eine Beeinflussung der Messung des antioxidativen Potentials von OP in den Nematoden scheint sehr gering bzw. unwahrscheinlich zu sein. Die Inhaltsstoffe OS, 3-HT und TYR zeigen auch in hohen Konzentrationen keine fluoreszenzlöschenden Eigenschaften (Abbildung 42C, D und E).

Obwohl OBE die Menge der durch thermalen Stress gebildeten ROS nicht verringern kann, ist der Extrakt in der Lage die Resistenz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress zu erhöhen. Anders als bei thermalem Stress, der die Bildung verschiedener ROS (Superoxidanionen, Hydroxylradikale oder Wasserstoffperoxid) induziert (FEDYAEVA et al., 2014), werden durch den Redox-Cycler Paraquat nur Superoxidanionen gebildet (COCHEMÉ und MURPHY, 2007). Der Extrakt scheint folglich verschiedene protektive Mechanismen in Gang zu setzen, welche die Nematoden schützen und ihr Überleben unter oxidativem Stress verlängern. Möglicherweise liegt dies unter anderem an der Fähigkeit des Extraktes, wie für einen methanolischen OBE *in vitro* gezeigt, Superoxidanionen abzufangen und unschädlich zu machen (LUO et al., 2019). Da nur 3-HT und TYR, nicht aber OP und OS, ebenfalls die Resistenz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress verbessern, kann davon ausgegangen werden, dass diese Substanzen – möglicherweise zusammen mit weiteren hier nicht untersuchten Inhaltsstoffen des OBE – für diese Wirkung des Extraktes verantwortlich sind. Mit Hilfe einer computergestützten Analyse und einer experimentellen Bestätigung dieser Analyse zeigen ROSSI et al. (2017), dass sowohl 3-HT als auch TYR in der Lage sind, Superoxidanionen abzufangen. Dies könnte einen möglichen Mechanismus darstellen, der zu der erhöhten Resistenz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress führt.

Werden Nematoden unter milderem oxidativem Stress (5 mM Paraquat) gehalten, kann die OS das Überleben dieser Nematoden signifikant verlängern (ZHANG et al., 2015). Allerdings werden durch ZHANG et al. (2015) im Vergleich zu dieser Arbeit deutlich höhere Konzentrationen eingesetzt (mindestens 100  $\mu\text{M}$ ). Möglicherweise ist die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  OS zu gering. Dies könnte auch bei OP der Fall sein: In einer Studie von FENG et al. (2021) wird die Lebensspanne von *C. elegans* unter oxidativem Stress (200  $\mu\text{M}$  Paraquat) durch die Gabe von OP verlängert. Die eingesetzten Konzentrationen an OP sind dabei mindestens 4-mal so hoch (FENG et al., 2021), wie die in dieser Arbeit genutzte Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Übereinstimmend mit den Ergebnissen

dieser Arbeit stellen CANUELO et al. (2012) eine durch 250  $\mu\text{M}$  TYR erhöhte Resistenz von *C. elegans* gegenüber oxidativem Stress fest.

In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten experimentellen System, sind weder OBE noch seine Inhaltsstoffe in der Lage, die Resistenz der Nematoden gegenüber thermalem Stress zu erhöhen. Ein anderer Extrakt aus Olivenblättern erhöht die Anzahl an überlebenden Nematoden, welche über 5 h hinweg mit 35°C gestresst werden (LUO et al., 2019), was zu der Annahme führt, dass OBE möglicherweise bei geringem thermalem Stress schützt, jedoch das Überleben der Nematoden unter letalem thermalem Stress nicht verlängern kann. Weiterhin könnten die unterschiedlichen Ergebnisse auch durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Extrakte zu Stande kommen. OP verlängert in hohen Konzentrationen von mindestens 180  $\mu\text{M}$  die Lebensspanne unter thermalem Stress ebenfalls (FENG et al., 2021). Die von FENG et al. (2021) eingesetzten Nematoden sind jedoch deutlich jünger, die Konzentration an OP höher und der thermale Stress moderater als in dieser Arbeit. Auch die OS kann die Resistenz der Nematoden gegenüber thermalem Stress erhöhen (ZHANG et al., 2015). Hier muss aber erneut darauf hingewiesen werden, dass die von ZHANG et al. (2015) verwendete Konzentration 12 Mal so hoch war, wie die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration von 25  $\mu\text{M}$ . Werden Nematoden mit einer Konzentration an 3-HT von mindestens 100  $\mu\text{g/ml}$  behandelt und für 3 h mit 37°C gestresst, ist das Überleben dieser Nematoden im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erhöht (BRUNETTI et al., 2020). Die höhere der beiden in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen an 3-HT – 500  $\mu\text{M}$  – entspricht einer Konzentration von 77,1  $\mu\text{g/ml}$  und ist somit geringer als die von BRUNETTI et al. (2020) eingesetzten Konzentrationen. Zusätzlich werden die Nematoden in dieser Arbeit nicht nur für 3 h, sondern bis zu ihrem Tod mit thermalem Stress (37°C) behandelt, was zu den unterschiedlichen Ergebnissen führen könnte. CANUELO et al. (2012) berichten, dass 250  $\mu\text{M}$  TYR die Anzahl überlebender Nematoden nach einer Behandlung mit thermalem Stress (35°C) für 8 h erhöht, wohingegen in dieser Arbeit auch 500  $\mu\text{M}$  die Lebensspanne unter höherem thermalem Stress (37°C) nicht verlängert. Diese Unterschiede könnten zum Einen durch die unterschiedliche Temperatur, zum Anderen durch die Haltung auf Agarplatten (CANUELO et al., 2012) bzw. in Flüssigmedien zu Stande kommen.

Es gibt keine adversen Effekte von OBE und seinen Inhaltsstoffen auf die Größe der Nematoden (Abbildung 40) oder ihre Pharynxpumpfrequenz (Abbildung 38).

## 5.2 Die Wirkungen von OBE und seinen Inhaltsstoffen werden teilweise durch DAF-16 vermittelt

Da die Zielgene von DAF-16 in den Nematoden unter anderem für die Bildung von antioxidativen Enzymen verantwortlich sind (MURPHY et al., 2003), ist eine Aktivierung von DAF-16 ein möglicher Mechanismus für die Vermittlung der antioxidativen Wirkung und der Erhöhung der oxidativen Stressresistenz durch OBE bzw. seine Inhaltsstoffe. Eine Voraussetzung für die Aktivität von DAF-16 ist die Translokation dieses Transkriptionsfaktors aus dem Zytosol in den Zellkern (MURPHY et al., 2003).

Durch OBE, aber nicht durch die untersuchten Inhaltsstoffe, kommt es zu einer Translokation von DAF-16 in den Zellkern der Nematoden. Eine über DAF-16 vermittelte Wirkung des Extraktes ist somit möglich. Auch LUO et al. (2019) können für den von ihnen verwendeten Extrakt aus den Blättern des Olivenbaumes eine erhöhte Translokation von DAF-16 in den Zellkern von *C. elegans* feststellen. Zudem stellen sie eine durch die Behandlung mit OBE erhöhte Aktivität von über DAF-16 regulierten antioxidativen Enzymen wie der SOD und Katalase fest (LUO et al., 2019). Die von FENG et al. (2021) verwendete Konzentration von 440 µM OP führt dazu, dass der Transkriptionsfaktor DAF-16 vermehrt im Zellkern lokalisiert ist und die Aktivität der SOD und Katalase erhöht sind. Eine Konzentration von 300 µM OS ist ebenfalls in der Lage, eine Translokation von DAF-16 in den Zellkern hervorzurufen (ZHANG et al., 2015). Zudem wird durch diese Menge OS die Expression von DAF-16-Zielgenen wie der SOD und Katalase erhöht (ZHANG et al., 2015). Möglicherweise sind die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen an OP und OS nicht ausreichend hoch, um eine Translokation von DAF-16 in den Zellkern hervorzurufen. Eine Wirkung über DAF-16 scheint auf Grund der Ergebnisse von FENG et al. (2021) und ZHANG et al. (2015) jedoch möglich zu sein. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist TYR in den Experimenten von CANUELO et al. (2012) nicht in der Lage, die Anzahl an *C. elegans* mit eindeutig nukleär lokalisiertem DAF-16 zu erhöhen. In der Literatur ist bisher noch nichts über 3-HT und dessen Effekt auf die Lokalisation von DAF-16/FOXO bekannt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente belegen, dass der Transkriptionsfaktor im Zytosol verbleibt.

Wird *daf-16* ausgeschaltet, wie es in den DAF-16-Deletionsmutanten der Fall ist, kann die Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der Vermittlung der Effekte von OBE und seinen Inhaltsstoffen untersucht werden. Ist der Effekt in den Deletionsmutanten nach wie vor vorhanden, ist der Transkriptionsfaktor nicht essentiell für diesen Effekt. Fehlt die im Wildtyp gezeigte protektive Wirkung jedoch, ist DAF-16 für die Wirkung von OBE oder seinen

Inhaltsstoffen essentiell. Nachdem OBE im Wildtyp keine antioxidative Wirkung zeigt, werden auch in der Deletionsmutante keine Effekte erwartet. Dies ist jedoch nicht immer der Fall. Dass OBE in der Deletionsmutante eine antioxidative Wirkung besitzt ist nicht plausibel, denn dies würde bedeuten, dass die bekannten und bereits bewiesenen Wirkungen von DAF-16 wie z. B. die Expression von antioxidativen Enzymen (MURPHY et al., 2003) in Frage gestellt würden. Möglich ist jedoch, dass die hier gezeigten antioxidativen Wirkungen des OBE in den DAF-16-Deletionsmutanten durch die starken Schwankungen in den einzelnen Experimenten zu Stande kommen und nicht durch antioxidative Eigenschaften des Extraktes. Die antioxidative Wirkung von OP, welche im Wildtyp zu sehen ist, ist in der Deletionsmutante verschwunden. Dies lässt den Schluss zu, dass dieser Effekt durch DAF-16 vermittelt wird. Eine vermehrte Translokation von DAF-16 in den Zellkern der mit OP behandelten Nematoden ist jedoch nicht zu sehen. Möglicherweise wird der antioxidative Effekt von OP dennoch über die von DAF-16/FOXO regulierten antioxidativen Enzyme vermittelt, denn in weiteren Modellorganismen bewirkt OP eine Erhöhung der Aktivität dieser Enzyme: In Ratten mit ulcerativer Colitis werden beispielsweise die Level an SOD und Katalase durch OP signifikant erhöht (MOTAWEA et al., 2020). Zudem erhöht OP die Aktivität dieser beiden Enzyme in Ratten mit Magengeschwüren (ALIREZAEI et al., 2012). Während die OS und 3-HT weder im Wildtyp noch in den Mutanten antioxidative Effekte besitzen, zeigt TYR in den Deletionsmutanten wie auch im Wildtyp eine antioxidative Wirkung. DAF-16 ist für die Vermittlung dieses Effekts folglich nicht essentiell. Es sind andere Signalwege erforderlich, um die antioxidative Wirkung hervorzurufen. Möglicherweise könnte der Effekt über den Transkriptionsfaktor SKN-1 (Homolog zum humanen Nrf2) (TULLET et al., 2017) vermittelt sein, denn Nrf2 wird durch TYR in Mäusen aktiviert (WANG et al., 2017b). In *C. elegans* wird die Expression einiger Gene des Phase-II-Metabolismus wie zum Beispiel der Glutathion-Synthetase, der Superoxiddismutase (PARK et al., 2009; AN und BLACKWELL, 2003), der Glutathion-S-Transferase oder der UDP-Glucuronosyltransferase von SKN-1 reguliert (PAEK et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010; AN und BLACKWELL, 2003).

Für die Vermittlung der durch OBE erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress ist der Transkriptionsfaktor DAF-16 nicht essentiell, denn OBE ist auch in der Deletionsmutante in der Lage, das Überleben der Nematoden unter diesen Bedingungen zu verlängern. Dies kann möglicherweise an einer erhöhten Expression von SKN-1 liegen, denn ALHAITHLOUL et al. (2019) stellen eine durch einen OBE erhöhte Expression von Nrf2 in Ratten, welche durch Cyclophosphamid erhöhtem oxidativem Stress ausgesetzt waren, fest. Anders verhält es sich bei der Wirkung von 3-HT, die in den Mutanten nicht mehr vorhanden ist. DAF-16 ist für diese Wirkung essentiell. Da in der Deletionsmutante nur die höhere der beiden

untersuchten Konzentrationen an TYR einen protektiven Effekt besitzt, während im Wildtyp bereits 100  $\mu\text{M}$  ausreichen, scheint dieser Effekt zumindest teilweise von DAF-16 abhängig zu sein. Wahrscheinlich spielen hier jedoch auch weitere Signalwege eine Rolle. Ein Beispiel hierfür kann die erhöhte Menge der Glutathion-S-Transferase 4, einem mit einer erhöhten Resistenz gegen oxidativem Stress im Zusammenhang stehenden Enzym, welches durch den Transkriptionsfaktor SKN-1 reguliert wird (PAEK et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010; AN und BLACKWELL, 2003), darstellen, welche CANUELO und PERAGÓN (2013) in ihren Untersuchungen zu TYR messen können.

### **5.3 OBE und seine Inhaltsstoffe besitzen neuroprotektive Eigenschaften in *C. elegans* Modellen für M. Parkinson**

OBE ist in der Lage, die durch 6-OHDA induzierte Degeneration von dopaminergen Neuronen zu verringern und schützt diese vor der Zerstörung. Die genaue Wirkungsweise von 6-OHDA ist noch nicht bekannt (VARESLIJA et al., 2020), eine erhöhte Produktion an ROS in den Zellen scheint hierbei jedoch eine Möglichkeit zur Vermittlung der Toxizität zu sein (FREINBICHLER et al., 2020). MOHANKUMAR et al. (2018) zeigen ein durch 6-OHDA erhöhtes Level an ROS in *C. elegans*. Eine Substanz oder ein Extrakt mit antioxidativer Wirkung könnte demnach vor 6-OHDA schützen (MOHANKUMAR et al., 2018). OBE ist in der Lage die Resistenz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress zu erhöhen, zeigt in dieser Arbeit aber *in vivo* keine antioxidativen Eigenschaften. Es scheint folglich möglich zu sein, dass Schutzmechanismen in den Zellen in Gang gesetzt werden, welche für eine erhöhte Resistenz dieser gegenüber oxidativem Stress verantwortlich sind und so dem Verfall der dopaminergen Neuronen entgegenwirken. PASBAN-ALIBADI et al. (2013) behandeln PC12 Zellen mit 6-OHDA und können ein erhöhtes Level an oxidativem Stress in den Zellen messen. Sie vermuten, dass die Behandlung der Zellen mit einem Extrakt aus Olivenblättern die Zellen durch seine antioxidative Wirkung vor dem durch 6-OHDA hervorgerufenen Schaden schützt (PASBAN-ALIBADI et al., 2013).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine erhöhte Synthese von Dopamin aus Tyrosin in den dopaminergen Neuronen von *C. elegans* eine fortschreitende Degeneration dieser Neuronen verursacht. Dies bestätigt die Ergebnisse von MANALO und MEDINA (2018). Der OBE ist in der Lage, vor dieser durch Dopamin hervorgerufenen Degeneration zu schützen und verzögert das Fortschreiten der Zerstörung.

Eine verminderte vesikuläre Verpackung von Dopamin, und demnach ein erhöhtes Level an frei in den dopaminergen Neuronen vorliegendem Dopamin, schädigt diese Neuronen und

führt zu einem höheren Level an oxidativem Stress in Mäusen (CAUDLE et al., 2007). Somit können antioxidative Effekte wie die direkten radikalfangenden Eigenschaften von OBE auch hier eine mögliche Erklärung für die neuroprotektiven Eigenschaften des Extraktes geben. Da aber *in vivo* das durch thermalen Stress erhöhte ROS-Level der Nematoden durch OBE nicht verringert wird, der Extrakt also nicht antioxidativ ist, müssen weitere neuroprotektive Mechanismen in den Nematoden ablaufen. OBE ist in der Lage, eine Translokation von DAF-16 in den Zellkern der Nematoden zu verursachen. Hierdurch kann es zur Expression von antioxidativ wirkenden Enzymen kommen, welche die Zellen vor dem oxidativen Stress (MURPHY et al., 2003), welcher durch 6-OHDA oder eine erhöhte Dopaminproduktion entsteht, schützen. LUO et al. (2019) weisen eine erhöhte Aktivität der DAF-16-regulierten antioxidativen Enzyme SOD und Katalase nach einer Behandlung von *C. elegans* mit einem methanolischen OBE nach. Eine Behandlung von Ratten mit Rotenon, was parkinsonähnliche Symptome verursacht (BETARBET et al., 2000), verringert die Menge an antioxidativen Enzymen in den Gehirnen der Ratten (SARBISHEGI et al., 2018). Werden die Ratten jedoch zusätzlich mit einem hydro-alkoholischen OBE behandelt, wird das Level der SOD, Katalase und Glutathionperoxidase signifikant erhöht (SARBISHEGI et al., 2018). Wenn *daf-2* in *C. elegans* ausgeschaltet wird, kann DAF-16 vermehrt in den Zellkern gelangen und es kommt zur Expression von DAF-16-Zielgenen (MURPHY et al., 2003). Die Abschaltung von *daf-2* und demnach die Aktivierung von DAF-16, schützt vor einer durch 6-OHDA hervorgerufenen Degeneration der dopaminergen Neuronen in *C. elegans* (YAN et al., 2019). Eine durch DAF-16 vermittelte Neuroprotektion durch den OBE scheint demnach möglich zu sein.

Auch physiologische Fähigkeiten von Modellorganismen können durch eine Behandlung mit OBE verbessert werden: Die durch eine Behandlung mit Rotenon verringerte Balance und muskuläre Koordination von Ratten kann durch eine Gabe eines hydro-alkoholischen Extraktes aus den Blättern des Olivenbaums signifikant verbessert werden (SARBISHEGI et al., 2018).

Auch eine Behandlung der Nematoden mit OP schützt die dopaminergen Neuronen vor der Zerstörung durch 6-OHDA oder einer Neurodegeneration durch eine erhöhte Menge an Dopamin in den Neuronen. Die schützende Wirkung vor Dopamin scheint jedoch erst mit der Zeit prominent zu werden, da dieser Effekt erst nach 48 h signifikant ist. Für den in den Nematoden gezeigten antioxidativen Effekt ist DAF-16 essentiell. Dies kann eine Erklärung für die neuroprotektiven Effekte von OP liefern: OP könnte durch seine direkten antioxidativen Wirkungen und die über DAF-16 vermittelten protektiven Effekte die Degeneration der dopaminergen Neuronen verringern. PASBAN-ALIBADI et al. (2013)

demonstrieren eine durch die antioxidative Wirkung von OP bedingte Neuroprotektion in PC12 Zellen. Eine Behandlung von PC12 Zellen mit 6-OHDA verursacht eine starke Reduktion der Anzahl von lebenden Zellen (ELMAZOGLU et al., 2017). Werden die Zellen zusätzlich mit OP behandelt, gibt es, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, keine Reduktion der überlebenden Zellen. Durch 6-OHDA kommt es zu einer mitochondrialen Dysfunktion. Auch dies kann durch eine Behandlung der Zellen mit OP verringert werden (ELMAZOGLU et al., 2017). Zudem ist OP in der Lage das Level der durch die Mitochondrien gebildeten Superoxidanionen in einem zellulären Parkinsonmodell zu reduzieren (ACHOUR et al., 2016). Möglicherweise spielen diese die Mitochondrien betreffenden protektiven Mechanismen bei der Vermittlung der neuroprotektiven Effekte von OP in *C. elegans* ebenfalls eine Rolle.

BRUNETTI et al. (2020) untersuchen die physiologischen Effekte des OP-Aglycons in *C. elegans*. Sie zeigen eine durch Rotenon stark reduzierte Aktivität der Nematoden, welche durch das OP-Aglycon jedoch deutlich verbessert wird. Zusätzlich ist das Aglycon in der Lage die Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein in transgenen *C. elegans* leicht zu verringern (BRUNETTI et al., 2020). Eine vergleichende Untersuchung von OP und seinem Aglycon wäre von Interesse.

Eine Behandlung der Nematoden mit OS verringert die durch 6-OHDA verursachte Degeneration der dopaminergen Neuronen. In den Nematoden, welche ein erhöhtes Level an Dopamin in den dopaminergen Neuronen haben, schützt die OS die Neuronen jedoch nicht vor der Zerstörung. Da die OS in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten weder *in vitro* noch *in vivo* antioxidative Eigenschaften zeigt und die Nematoden auch vor thermalem und oxidativem Stress nicht schützt, scheint ein weiterer Mechanismus an der Vermittlung der Neuroprotektion beteiligt zu sein. Oder die in dieser Arbeit gewählte Konzentration ist zu gering für die Vermittlung antioxidativer und die Stressresistenz-modulierender Effekte, nicht jedoch für eine neuroprotektive Wirkung. Da ZHANG et al. (2015) sowohl antioxidative als auch die thermale und oxidative Stressresistenz erhöhende Effekte der OS verzeichnen können, scheint letzteres durchaus möglich zu sein. Auch eine erhöhte Expression der SOD und Katalase (ZHANG et al., 2015) kann an der Vermittlung des neuroprotektiven Effektes der OS beteiligt sein. Durch die untersuchte Konzentration von 25  $\mu$ M OS treten neuroprotektive Effekte auf, während *in vivo* keine antioxidativen Effekte gezeigt werden können. Die antioxidative Wirkung der OS könnte für eine Neuroprotektion ausreichend sein, jedoch im DCF-Assay (Messung des endogenen ROS-Levels) dennoch unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Dies sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

Auch in Ratten, welche mit 6-OHDA behandelt werden, zeigt eine vorherige Behandlung mit OS neuroprotektive Wirkungen (MABANDLA et al., 2015). Wird den Tieren die OS jedoch erst 7 Tage nach der Injektion von 6-OHDA gegeben, zeigt diese Behandlung keine Neuroprotektion. Zudem schützt die präventive Gabe von OS die Mitochondrien vor der durch 6-OHDA verursachten Dysfunktion (MABANDLA et al., 2015). Dies könnte ein Mechanismus für die in dieser Arbeit entdeckten neuroprotektiven Effekte der OS sein und sollte in den Nematoden weiter untersucht werden. Auch die Parkinsonsymptome, welche durch eine Injektion von 6-OHDA in das Gehirn von Ratten entstehen, können durch eine präventive Gabe von OS verringert werden (MSIBI und MABANDLA, 2019). Zusätzlich ist die durch 6-OHDA verringerte Konzentration an Dopamin im Striatum der Ratten durch die Gabe von OS deutlich verbessert. Auch die Viabilität von PC12 Zellen ist durch eine Behandlung mit OS im Vergleich zu einer Behandlung mit 6-OHDA erhöht, während das durch 6-OHDA erhöhte ROS-Level durch die OS verringert wird (MSIBI und MABANDLA, 2019). Weiterhin ist die OS in der Lage, die durch das Parkinsonmediakament Levodopa als Nebenwirkung hervorgerufenen ungewollten Bewegungen in einem Rattenmodell für Parkinson zu reduzieren (NDLOVU et al., 2016).

3-HT schützt die mit 6-OHDA geschädigten dopaminergen Neuronen nicht, ist jedoch in der Lage, die durch eine erhöhte Synthese von Dopamin voranschreitende Degeneration zu verlangsamen. Hierbei ist bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  bereits der maximale Effekt erreicht, die höhere Konzentration zeigt keinen stärkeren neuroprotektiven Effekt. Diese Neuroprotektion könnte unter anderem durch die starken radikalfangenden Eigenschaften von 3-HT zustande kommen. Auch PÉREZ-BARRÓN et al. (2021) zeigen einen durch die antioxidativen Eigenschaften von 3-HT hervorgerufenen protektiven Effekt in einem Rattenmodell für M. Parkinson. YU et al. (2016) weisen eine durch eine Gabe von Dopamin verringerte Viabilität von Neuroblastomazellen nach. Durch eine Behandlung dieser Zellen mit 3-HT kann der schädigende Einfluss von Dopamin stark verringert werden (YU et al., 2016). YU et al. (2016) führen dies auf eine erhöhte Expression von Enzymen, welche im Phase-II-Metabolismus beteiligt sind, zurück. Schlussendlich könnte dies in einer erhöhten Aktivität von Glutathion und somit einer Verringerung des oxidativen Stresses münden (YU et al., 2016). Zudem kann 3-HT die Menge an schädlichen Dopaminmetaboliten verringern (GOLDSTEIN et al., 2016). Eine erhöhte Expression von Enzymen des Phase-II-Metabolismus, welche in *C. elegans* über SKN-1 reguliert werden (AN und BLACKWELL, 2003), und eine Verringerung der schädlichen Dopaminmetabolite könnten folglich mögliche Mechanismen für die schützende Wirkung von 3-HT auf Nematoden mit einer erhöhten Menge an Dopamin in den Neuronen darstellen. Zudem wird durch 3-HT die Resistenz der

Nematoden gegenüber oxidativem Stress erhöht. Dieser Effekt benötigt die Beteiligung von DAF-16. Eine über DAF-16 vermittelte Neuroprotektion ist demnach ebenfalls möglich. Bisher wurde der Effekt von 3-HT auf DAF-16/FOXO bezüglich der neuroprotektiven Wirkung jedoch nicht untersucht.

3-HT ist in der Lage, die Beweglichkeit der Nematoden zu erhöhen, wenn diese mit Rotenon geschädigt werden sowie die Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein in transgenen Nematoden zu verringern (BRUNETTI et al., 2020; DI ROSA et al., 2020). Die Degeneration von dopaminergen Neuronen in denen humanes  $\alpha$ -Synuclein exprimiert wird, kann durch 3-HT ebenfalls verringert werden (BRUNETTI et al., 2020; DI ROSA et al., 2020).

TYR zeigt neuroprotektive Wirkungen in beiden in dieser Arbeit verwendeten *C. elegans* Modellen für M. Parkinson: Es ist in der Lage, die durch 6-OHDA verursachte Neurodegeneration sowie die durch eine erhöhte Dopaminsynthese hervorgerufene Degeneration der dopaminergen Neuronen zu verringern, wobei bei letzterem die geringere Konzentration von 100  $\mu$ M TYR nicht ausreichend ist für die Vermittlung eines signifikanten Effekts. TYR kann die Bildung von durch eine Oxidation von freiem Dopamin entstehenden neurotoxischen Dopaminaddukten reduzieren (VAUZOUR et al., 2010). Zudem ist TYR in der Lage, das durch eine neurotoxische Substanz hervorgerufene erhöhte ROS-Level in Zellen signifikant zu verringern (IBRAKAW et al., 2020). Die antioxidativen Effekte, welche auch in dieser Arbeit gezeigt werden, könnten folglich wichtig sein für die Vermittlung der neuroprotektiven Eigenschaften von TYR.

TYR zeigt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* prominente antioxidative Effekte und verlängert das Überleben der Nematoden unter oxidativem Stress. Diese Effekte sind nicht abhängig von DAF-16. Auch die neuroprotektiven Effekte scheinen nicht von DAF-16 abhängig zu sein, denn GARCIA-MORENO et al. (2019) können keine erhöhte Expression von DAF-16-Zielgenen durch TYR in *C. elegans* nachweisen. Die Expression der Glutathion-S-Transferase 4 ist jedoch erhöht (GARCIA-MORENO et al., 2019). Auch WANG et al. (2017b) zeigen einen Effekt von TYR auf den Nrf2 Signalweg, was diesen zu einer Möglichkeit macht, die neuroprotektiven Effekte von TYR zu vermitteln.

Zusätzlich ist eine Konzentration von 1  $\mu$ M TYR in der Lage die Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein in *C. elegans* zu verringern (GARCIA-MORENO et al., 2019).

Der starke neuroprotektive Effekt von OBE kann durch ein Zusammenspiel der in ihm enthaltenen Substanzen zu Stande kommen, da auch die untersuchten Inhaltsstoffe gute Effekte erzielen. Eine einzelne Substanz kann hier nicht als Hauptwirkstoff erkannt werden. OBE und seine Inhaltsstoffe scheinen gute Kandidaten für die Entwicklung von Präventions-

oder Therapiemaßnahmen gegen M. Parkinson zu sein. Weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus sollten jedoch folgen. Zudem sollten weiterführend auch physiologische Effekte in *C. elegans* untersucht werden.

#### **5.4 OBE und seine Inhaltsstoffe besitzen neuroprotektive Eigenschaften in *C. elegans* Modellen für M. Alzheimer**

Eine Vorbehandlung der Nematoden mit OBE oder seinen Inhaltsstoffen OP, 3-HT und TYR schützt die Tiere vor der durch die Expression von humanem A $\beta_{1-42}$  in den Muskelzellen hervorgerufene Paralyse. Auch die OS zeigt einen dem von OP und dem Extrakt ähnlichen Effekt, dieser ist jedoch statistisch nicht signifikant. Zusätzlich sind der OBE und alle in dieser Arbeit untersuchten Inhaltsstoffe in der Lage, die Anzahl an A $\beta_{1-42}$ -Plaques in den Nematoden zu verringern. Der OBE z. B. um ca. 30% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Bei der Pathogenese von M. Alzheimer scheint oxidativer Stress beteiligt zu sein, da in den Zellen der Gehirne von Patienten oxidative Schädigungen nachgewiesen werden können (SMITH et al., 1996). Ein möglicher Mechanismus für die Protektion der Nematoden vor A $\beta_{1-42}$  durch den OBE und seine Inhaltsstoffe sind antioxidative Wirkungen. Auch wenn der OBE *in vivo* in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten das Level an ROS, welches durch thermalen Stress erhöht wird, nicht senken kann, zeigt der Extrakt dennoch eine Protektion der Tiere vor oxidativem Stress. OMAR et al. (2017) zeigen in Zellen auf antioxidativen Effekten beruhende neuroprotektive Wirkungen eines Extraktes aus den Blättern des Olivenbaums. Die Vitalität der Neuroblastomazellen unter oxidativem Stress ist erhöht (OMAR et al., 2017). Zudem kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass OBE eine Translokation von DAF-16 in den Zellkern verursacht. Auch eine erhöhte Aktivität von SOD und Katalase durch einen OBE kann in *C. elegans* nachgewiesen werden (LUO et al., 2019).

OP besitzt starke antioxidative Eigenschaften in *C. elegans*. Dieser Effekt wird über DAF-16 vermittelt, was den Schluss nahe legt, dass die antioxidativen Eigenschaften und DAF-16 möglicherweise für die Neuroprotektion durch OP mitverantwortlich sein können. In neuronalen Zellen von Ratten, welche mit A $\beta_{1-42}$  und Glucose behandelt werden, verringert OP das ROS-Level und induziert eine erhöhte Aktivität der antioxidativ wirkenden Enzyme SOD und Katalase (ELMAZOGLU et al., 2021).

In *in vitro* Experimenten bewirken sowohl ein OBE als auch OP eine Verringerung der Bildung von A $\beta_{42}$  Fibrillen (OMAR et al., 2019). Auch die A $\beta$ -Toxizität in Neuroblastomazellen ist durch eine Gabe von OBE oder OP verringert und die Zellviabilität somit erhöht (OMAR et al., 2019) Dies passt gut zu der in dieser Arbeit gefundenen verringerten Plaque-Anzahl und

A $\beta_{1-42}$ -Toxizität durch OBE und OP. Auch in Mäusen ist ein Extrakt aus Olivenblättern in der Lage, die Anzahl von A $\beta_{42}$ -Plaques zu verringern (OMAR et al., 2019). OP kann zudem nicht kovalent an A $\beta_{42}$  binden und so dessen Aggregation verringern (BAZOTI et al., 2008; CABA et al., 2021). Dies könnte ein möglicher Mechanismus für die verringerte Plaque-Anzahl und A $\beta_{1-42}$ -Toxizität in Nematoden, welche mit OP oder dem OBE behandelt werden, sein. Zudem könnte auch die Verringerung der Anzahl an Plaques in den Nematoden die Toxizität von A $\beta_{1-42}$  verringern und so die Paralyse der Nematoden verzögern.

*In vitro* wird die Aggregation von A $\beta_{1-42}$  durch 3-HT verringert (GEA-GONZÁLEZ et al., 2022). Auch die A $\beta_{25-35}$ -Toxizität in N2a Zellen wird durch 3-HT reduziert (ST-LAURENT-THIBOULT et al., 2011) und die Anzahl an A $\beta$ -Plaques im Gehirn von Mäusen wird ebenfalls verringert (NARDIELLO et al., 2018). 3-HT reduziert die Bildung von toxischen A $\beta_{1-42}$ -Fibrillen in menschlichen Neuroblastomazellen indem es die Bildung harmloser Addukte fördert (LERI et al., 2019). Dieser Prozess könnte auch in den Nematoden ablaufen und so die Bildung der A $\beta_{1-42}$ -Plaques reduzieren und die Toxizität von A $\beta_{1-42}$  verringern. Dies würde die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse untermauern und einen möglichen Wirkmechanismus bieten. Auch GEA-GONZÁLEZ et al. (2022) zeigen in transgenen *C. elegans* (CL2331) eine Reduktion der Anzahl an A $\beta_{1-42}$ -Plaques. Zudem wird das durch die Expression von A $\beta_{1-42}$  verschlechterte chemotaktische Verhalten der Nematoden durch 3-HT signifikant verbessert (GEA-GONZÁLEZ et al., 2022). 3-HT ist auch in der Lage, die kognitive Leistungsfähigkeit von Mäusen nach einer Injektion von A $\beta_{1-42}$ -Oligomeren zu verbessern (ARUNSUNDAR et al., 2015). Dies können auch NARDIELLO et al. (2018) bei ihrem A $\beta_{42}$ -Mausmodell zeigen.

TYR verringert, wie auch 3-HT, die Aggregation von A $\beta_{1-42}$  *in vitro*, wobei dieser Effekt durch 3-HT stärker ist als der von TYR (GEA-GONZÁLEZ et al., 2022). Zudem reduziert TYR die Toxizität von A $\beta_{25-35}$  in N2a Zellen (ST-LAURENT-THIBOULT et al., 2011). Auch in den Experimenten dieser Arbeit zeigt TYR eine deutliche Reduktion der Toxizität von A $\beta_{1-42}$ , denn die hierdurch hervorgerufene Paralyse wird durch TYR stark verzögert. Zudem ist die Anzahl der A $\beta_{1-42}$ -Plaques in transgenen *C. elegans* verringert. Ein möglicher Mechanismus für die verringerte Toxizität von A $\beta_{1-42}$  in den Nematoden könnte die verringerte Akkumulation darstellen oder die starken antioxidativen Eigenschaften, welche TYR *in vitro* und *in vivo* besitzt. Auch TANIGUCHI et al. (2019) zeigen antioxidative Effekte von TYR in einem Alzheimer Mausmodell und vermuten, dass dies ein Mechanismus für die Neuroprotektion darstellt.

OS kann die Paralyse der Nematoden, welche durch humanes A $\beta_{1-42}$  hervorgerufen wird, verzögern, was jedoch nicht signifikant ist. Die Toxizität von A $\beta_{1-42}$  scheint demnach reduziert

zu sein. Zusätzlich wird die Anzahl der A $\beta_{1-42}$ -Plaques signifikant durch die OS verringert. Auch in Ratten, welche eine Injektion von A $\beta_{25-35}$  erhielten, zeigt die OS protektive Eigenschaften und reduziert neuronale Schädigungen im Gehirn der Ratten (WANG et al., 2018). In einem Mausmodell für M. Alzheimer kann eine Behandlung der Tiere mit OS die kognitiven Fähigkeiten der Tiere verbessern (LIN et al., 2021). Dies ist auch in einem Rattenmodell der Fall. Zusätzlich verringert die OS in diesen Ratten die Bildung inflammatorischer Cytokine (ZHANG et al., 2018a). Die OS ist in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten nicht antioxidativ wirksam. Demnach könnte sie bisher noch nicht untersuchte Mechanismen in Gang setzen, welche für den vor A $\beta_{1-42}$  schützenden Effekt ausschlaggebend sind. Welche Mechanismen dies sind, kann hier aber nicht abschließend geklärt werden, da die Datenlage relativ schlecht ist. Es müssen weitere Untersuchungen zu möglichen Mechanismen folgen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass der antioxidative Effekt der OS ausreicht, um die Anzahl der A $\beta_{1-42}$ -Plaques zu verringern, jedoch im DCF-Assay unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Der OBE zeigt starke inhibierende Effekte auf die AChE der Nematoden. Auch in den Experimenten von SENOL et al. (2016) zeigen zwei Extrakte aus Olivenblättern eine Inhibition der AChE. Diese Inhibition ist jedoch mit 10% (SENOL et al., 2016) deutlich schwächer als die in dieser Arbeit gezeigte Reduktion von ca. 70% bis 80%. Dies kann zum Einen an der unterschiedlichen Herkunft der AChE (Zitteraal vs. *C. elegans*), zum Anderen an den Unterschieden in der genutzten Konzentration liegen (0,5 mg/ml vs. 1 mg/ml). OP hingegen zeigt weder in dieser Arbeit noch in den Experimenten von OMAR et al. (2018) eine signifikante Inhibition der AChE.

In dieser Arbeit ist 3-HT in der Lage, die AChE der Nematoden signifikant zu inhibieren. Ein inhibitorischer Effekt um 50% wird jedoch durch die eingesetzten Konzentrationen nicht erreicht. Dies wird durch die Ergebnisse von OMAR et al. (2018) bestätigt: Auch sie konnten keine 50%ige Inhibition der AChE nachweisen. TYR hingegen zeigt in dieser Arbeit keine die AChE inhibierenden Effekte – auch in einer Konzentration von 500  $\mu$ M nicht. Dies steht in Korrelation mit den Daten von BOUSADA et al. (2020), die zwar mit einer Konzentration von 50  $\mu$ M eine deutlich geringere Konzentration an TYR einsetzen, jedoch ebenfalls keine Inhibition der AChE (Zitteraal) durch TYR feststellen. Verschiedene Derivate von TYR hingegen können die AChE inhibieren (BAUSADA et al., 2020).

In der für diese Arbeit durchgeführten Messung des inhibitorischen Potentials der OS auf die AChE der Nematoden kann kein inhibitorischer Effekt festgestellt werden. Dies wird durch die Ergebnisse von SZWAJGIER und BARANOWSKA-WÓJCIK (2019) bestätigt.

Auch Medikamente, welche bei M. Alzheimer eingesetzt werden, inhibieren die AChE, um die Symptomatik der Erkrankung zu verbessern (Übersichtsartikel: RODDA und CARTER, 2012). Da auch der OBE und in geringerem Maß 3-HT die AChE inhibieren, könnte ein Einsatz in der Therapie gegen M. Alzheimer erfolgsversprechend sein. Aufgrund der protektiven Eigenschaften vor allem von OBE aber auch seiner Inhaltsstoffe gegenüber  $A\beta_{1-42}$  und den die AChE inhibierenden Eigenschaften, könnten OBE und seine Inhaltsstoffe in der Prävention oder unterstützenden Therapie bei M. Alzheimer eingesetzt werden. Jedoch müssen weitere Studien zu den zu Grunde liegenden Mechanismen durchgeführt werden. In Bezug auf die Wirkung von Olivenblättern und deren Inhaltsstoffen auf M. Alzheimer ist die allgemeine Datenlage relativ schlecht.

### **5.5 OBE und seine Inhaltsstoffe besitzen neuroprotektive Eigenschaften in *C. elegans* Modellen für C. Huntington**

Durch eine Behandlung der Nematoden mit OBE, OP oder OS während der Entwicklung wird die Anzahl an PolyQ-Plaques in den Kopfregionen der Nematoden nicht verringert. Die Inhaltsstoffe 3-HT und TYR sind jedoch in der Lage, die Plaque-Anzahl signifikant zu senken, wobei die Effektstärke von TYR größer ist als die von 3-HT. Die Anzahl an Plaques in den Nematoden wird im Lauf des Lebens der Nematoden nicht höher und hat im L4-Larvenstadium bereits den Höchststand erreicht (LEE et al., 2017). Zu diesem Zeitpunkt erfolgt die Auszählung der Plaques für die vorliegende Arbeit.

Bisher ist noch keine Publikation zu den Einflüssen von 3-HT oder TYR (oder Olivenblättern, OP und OS) auf die Akkumulation von PolyQ vorhanden. Weitere Studien zu den Wirkmechanismen von 3-HT und TYR, durch die die Anzahl an PolyQ-Plaques in *C. elegans* reduziert wird, sind nötig. Zudem sollte dieser Effekt auch in weiteren Modellorganismen untersucht werden.

Ein weiterer Inhaltsstoff von Olivenblättern ist Rutin (BENINCASA et al., 2019). Rutin verringert die PolyQ-Aggregation in den Muskeln von transgenen *C. elegans* und ist in der Lage, die ASH-Neuronen vor der PolyQ-bedingten Degeneration zu schützen (CORDEIRO et al., 2020). Auch OBE, 3-HT und TYR, nicht aber OP und OS, schützen die ASH-Neuronen von *C. elegans* vor einer durch PolyQ hervorgerufenen Neurodegeneration. Den stärksten Effekt erzielt hierbei der Extrakt.

Eine Aggregation von PolyQ-Plaques führt zu einer erhöhten Bildung von ROS (HANDS et al., 2011). Dieser durch PolyQ hervorgerufene Stress steht in direktem Zusammenhang mit dem Zelltod (WYTTENBACH et al., 2002). Eine Verringerung der Akkumulation von PolyQ

schützt folglich auch die Neuronen vor dem Untergang. Dies könnte eine mögliche Begründung sein, warum 3-HT und TYR die ASH-Neuronen der Nematoden vor der Zerstörung durch PolyQ schützen, da sie auch in der Lage sind, die Plaquebildung zu reduzieren. Andererseits zeigt der OBE, welcher die Bildung der PolyQ-Plaques nicht verringern kann, einen deutlich stärkeren Schutz der ASH-Neuronen als 3-HT oder TYR. Es sind also noch weitere schützende Mechanismen nötig, welche durch OBE in Gang gesetzt werden, um dessen neuroprotektive Wirkung zu vermitteln.

Da der Transkriptionsfaktor DAF-16 durch eine Behandlung der Nematoden mit OBE vermehrt in den Zellkern gelangt, besteht auch die Möglichkeit, dass die neuroprotektiven Effekte des OBE über eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors vermittelt werden, wie auch CORDEIRO et al. (2020) für Rutin zeigen. Dies bietet jedoch keine vollständige Erklärung, da auch die durch 3-HT vermittelte Erhöhung der Resistenz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress von DAF-16 abhängig ist und 3-HT somit ebenfalls ein Kandidat für die Aktivierung von DAF-16 ist. Möglicherweise spielen bei der neuroprotektiven Wirkung von OBE auch die Effekte weiterer Inhaltsstoffe eine Rolle. Rutin z. B. bewirkt eine Erhöhung der Aktivität der SOD, Katalase und Glutathionperoxidase (SUGANYA und SUMATHI, 2017) und könnte an der Wirkung des OBE beteiligt sein. TYR verursacht keine erhöhte Expression von DAF-16-Zielgenen in *C. elegans* (GARCIA-MORENO et al., 2019) und die in dieser Arbeit gezeigten antioxidativen und die oxidative Stressresistenz erhöhenden Wirkungen sind unabhängig von DAF-16. Durch TYR wird aber die Expression der Glutathion-S-Transferase in *C. elegans* erhöht (GARCIA-MORENO et al., 2019) und auch Rutin bewirkt eine Erhöhung der Aktivität der über Nrf2 regulierten Glutathion-S-Transferase (SUGANYA und SUMATHI, 2017). Zudem scheint eine Aktivierung des Nrf2 Signalwegs vielversprechend zu sein bei der Behandlung von *C. Huntington* (YANG et al., 2009; STACK et al., 2010). Da auch 3-HT über diesen Signalweg wirken kann (MARTÍN et al., 2010) und die Menge an Glutathion in den Gehirnen von Huntington-Modellratten erhöht (TASSET et al., 2011), scheint dies einen möglichen Wirkmechanismus von OBE, 3-HT und TYR darzustellen. Dies muss jedoch für klare Aussagen noch weiter untersucht werden. Da der OBE im Vergleich zu 3-HT und TYR eine stärkere Protektion der ASH-Neuronen bewirkt, könnten nicht nur weitere Inhaltsstoffe an dieser Wirkung beteiligt sein, sondern auch synergistische oder additive Wirkungen dieser Inhaltsstoffe. Dies sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

In Korrelation mit den neuroprotektiven Eigenschaften zeigen OBE, 3-HT und TYR auch eine Verbesserung der Reaktionsfähigkeit der Nematoden auf einen noxischen Stimulus. Dieser physiologische Effekt könnte demnach direkt auf die im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte

Anzahl an intakten Neuronen zurückzuführen sein. OP und OS sind nicht in der Lage, den Verfall der Neuronen, der durch PolyQ hervorgerufen wird, zu verringern. Weiterhin können sie die Reaktionsfähigkeit der Nematoden nicht signifikant erhöhen. In einem Rattenmodell für C. Huntington kann das in Olivenblättern enthaltene Rutin die Defizite in Bewegung und Gedächtnisleistung deutlich verbessern (SUGANYA und SUMATHI, 2017). Die Kombination von neuroprotektiven Substanzen wie 3-HT, TYR und Rutin im OBE könnten Auslöser für die starken Effekte des Extraktes sein.

Bezogen auf Olivenblätter oder die Substanzen OP, OS, 3-HT und TYR gibt es bisher kaum Studien. Da in dieser Arbeit gezeigt wird, dass der OBE und einige seiner Inhaltsstoffe vielversprechende protektive Wirkungen in *C. elegans* Modellen für C. Huntington besitzen, sollte dies weiter untersucht und der Wirkung zu Grunde liegende Mechanismen aufgeklärt werden.

## 5.6 Neuroprotektive Wirkungen von CSE

Durch eine Behandlung der Nematoden mit CSE können weder bezogen auf die Größe der Tiere (Abbildung 41) noch auf die Pharynxpumpfrequenz (Abbildung 39) adverse Effekte beobachtet werden. *In vitro* zeigt der Extrakt keine radikalfangenden Effekte, wirkt jedoch *in vivo* in den Nematoden antioxidativ und reduziert die durch thermalen Stress endogen gebildeten ROS. Auch in *Drosophila melanogaster* senken ein Safranextrakt und dessen Inhaltsstoff Crocin die Menge an endogen gebildeten ROS (RAO et al., 2016). Durch eine Behandlung von transgenen Nematoden mit CSE kann keine Translokation von DAF-16 in den Zellkern festgestellt werden. Zudem ist der antioxidative Effekt von CSE auch in DAF-16 defizienten *C. elegans* vorhanden. Dieser Effekt ist dementsprechend nicht von DAF-16 abhängig. Sowohl ein Extrakt aus *Crocus sativus* als auch der Inhaltsstoff Crocin erhöhen die Menge an antioxidativen Enzymen wie der SOD und der Glutathion-S-Transferase in *Drosophila melanogaster* (RAO et al., 2016). Diese Enzyme werden in *C. elegans* beide über den Transkriptionsfaktor SKN-1 (AN und BLACKWELL, 2003) und DAF-16 reguliert (MURPHY et al., 2003). Eine Vermittlung der antioxidativen Effekte von CSE über SKN-1 ist somit ebenfalls möglich und sollte weiter untersucht werden.

Eine Untersuchung des fluoreszenzlöschenden Effekts von CSE zeigt, dass die höchste eingesetzte Konzentration von 1 mg/ml CSE die DCF-Fluoreszenz *in vitro* signifikant verringert (Abbildung 43). Dies könnte durchaus einen Einfluss auf die *in vivo* gemessene antioxidative Kapazität des Extraktes haben und den angezeigten Effekt des CSE verstärken. Da jedoch die geringere Konzentration von 0,1 mg/ml CSE in den

Deletionsmutanten ebenfalls eine antioxidative Wirkung zeigt, jedoch keine fluoreszenzlöschenden Eigenschaften besitzt, scheint die Beeinflussung der Experimente durch eine Löschung der Fluoreszenz unwahrscheinlich zu sein. Um eine sichere Aussage treffen zu können, müsste jedoch der Gehalt an CSE in den Nematoden untersucht werden.

Eine Behandlung von *C. elegans* mit CSE erhöht weder die Resistenz der Nematoden gegenüber thermalem noch oxidativem Stress. Rutin, ein weiterer Inhaltsstoff von Safran (MYKHEILENKO et al., 2021), ist ebenfalls nicht in der Lage, die Resistenz von *C. elegans* gegenüber thermalem Stress zu erhöhen, besitzt jedoch antioxidative Effekte in den Nematoden (KAMPKÖTTER et al., 2007). Die im Vergleich zu anderen Experimenten zur thermalen Stressresistenz sehr lange Lebensspanne bei CSE in dieser Arbeit scheint mit der Durchführung dieses Experiments im Hochsommer zusammen zu hängen, da die Experimente zu JGE, PME und ZJE im Frühling bzw. Herbst durchgeführt wurden und die Experimente zu REW, in denen die Lebensspanne unter thermalem Stress vergleichsweise kurz ist, im Winter. Die im Labor herrschende Raumtemperatur unterliegt über das Jahr hinweg leichten Schwankungen, was einen Einfluss auf die Experimente haben kann.

CSE zeigt keine neuroprotektiven Eigenschaften bezogen auf dopaminerge Neuronen, wenn diese mit 6-OHDA geschädigt werden. Bei einer durch eine erhöhte Produktion an Dopamin bedingten Degeneration der dopaminergen Neuronen hingegen zeigt CSE eine signifikante Verzögerung der Degeneration und demnach schützende Effekte. Möglicherweise könnte diese Protektion durch die antioxidativen Eigenschaften des Extraktes, welche in dieser Arbeit und von RAO et al. (2016) beschrieben werden, und durch die Induktion von antioxidativen Enzymen (RAO et al., 2016) unter Kontrolle von SKN-1/Nrf2 zu Stande kommen. Safranal kann den durch Rotenon verursachten Untergang von dopaminergen Neuronen verringern, bewirkt eine Translokation von Nrf-2 in den Zellkern und induziert die Bildung von durch Nrf2-regulierten antioxidativen Enzymen *in vitro* (PAN et al., 2016). In einem durch Rotenon geschädigten Mausmodell für M. Parkinson kann Crocin die Schäden im Verhalten der Tiere verbessern und induziert antioxidative Enzyme wie die SOD und Glutathion-S-Transferase im Gehirn der Tiere (RAO et al., 2019). Zusammengefasst deutet dies auf eine Vermittlung der neuroprotektiven Wirkungen von CSE über SKN-1/Nrf2 hin. Weitere mechanistische Untersuchungen in *C. elegans* sollten jedoch folgen.

Zusätzlich ist Safran in der Lage, die durch  $\alpha$ -Synuclein induzierte Toxizität auf Neuroblastomazellen zu verringern und genau wie Crocetin die physiologischen Schäden, welche durch  $\alpha$ -Synuclein in *Drosophila melanogaster* hervorgerufen werden, zu reduzieren (INOUE et al., 2021).

In den in dieser Arbeit genutzten *C. elegans* Modellen für M. Alzheimer zeigt CSE protektive Effekte: Er verzögert die Zeit bis zum Eintreten der  $A\beta_{1-42}$ -bedingten Paralyse und reduziert die Anzahl an  $A\beta_{1-42}$ -Plaques in den Kopf- und Schwanzbereichen der Nematoden. *In vitro* ist Safran in der Lage, die Fibrillogenese von  $A\beta_{1-40}$  zu reduzieren (PAPANDREOU et al., 2006). In einem Mausmodell, in welchem sich  $A\beta_{40}$  im Gehirn akkumuliert, wird gezeigt, dass ein Safranextrakt die Akkumulation von  $A\beta_{40}$  im Gehirn der Mäuse verringert und die Degradation von  $A\beta_{40}$  verstärkt (BATARSEH et al., 2017). Auch Crocin verringert die Akkumulation von  $A\beta_{40}$ , jedoch weniger stark als der Extrakt (BATARSEH et al., 2017). Crocetin ist in der Lage, die Akkumulation von  $A\beta$  *in vitro* (AHN et al., 2011) und in einem Mausmodell für M. Alzheimer zu reduzieren (ZHANG et al.; 2018c). Eine verringerte Akkumulation und ein verstärkter Abbau von  $A\beta$  könnte folglich eine Erklärung für die in *C. elegans* beobachtete Verzögerung der durch  $A\beta_{1-42}$  verursachten Paralyse sein.

Die höhere Konzentration von CSE ist zudem in der Lage, die AChE der Nematoden signifikant um 37,8% zu inhibieren. Auch GEROMICHALOS et al. (2012) berichten von einer Inhibition der AChE (Zitteraal) um bis zu 30%, wobei die eingesetzten Konzentrationen jedoch nicht aufgeführt werden. Safranal (21  $\mu$ M) und Crocetin (96  $\mu$ M) inhibieren die AChE um 50% (GEROMICHALOS et al., 2012). Diese beiden Inhaltsstoffe könnten folglich für den die AChE inhibierenden Effekt von CSE verantwortlich sein. Die Zusammensetzung von CSE sollte jedoch genauer untersucht werden.

Werden Nematoden, in denen sich PolyQ-Plaques bilden, mit CSE behandelt, kommt es nur zu einer leicht verringerten Anzahl an Plaques. Dies ist jedoch nicht signifikant. Auch auf die ASH-Neuronen zeigt CSE nur einen geringen und nicht signifikanten neuroprotektiven Effekt. Die neuroprotektiven Eigenschaften von Safran bezogen auf *C. Huntington* sind bisher noch nicht untersucht worden. Das in Safran enthaltene Rutin zeigt in *C. elegans* jedoch eine Reduktion der Plaque-Akkumulation und eine Protektion der ASH-Neuronen (CORDEIRO et al., 2020). Die schwachen neuroprotektiven Effekte des CSE könnten somit durch Rutin hervorgerufen werden, wobei die Konzentration dieser Substanz im CSE nicht ausreicht, um signifikante Effekte zu erzielen.

Möglicherweise schützt CSE durch eine leichte Reduzierung der Plaque-Anzahl und die hieraus resultierende Verringerung des oxidativen Stresses (HANDS et al., 2011) die Neuronen vor dem Verfall (WYTTENBACH et al., 2002). Auch wenn dies keine signifikante neuroprotektive Wirkung ist, wird durch CSE die Reaktionsfähigkeit der Nematoden, deren ASH-Neuronen durch PolyQ geschädigt werden, auf den noxischen Stimulus deutlich verbessert. Dies weist darauf hin, dass eine verringerte Neurodegeneration allein nicht

ausschlaggebend für die Verbesserung der physiologischen Symptome durch CSE ist. Das in Safran enthaltene Safranal ist in einem Rattenmodell für C. Huntington in der Lage, den Verlust der Beweglichkeit und Kraft zu verringern (FOTOOHI et al., 2021). Zudem ist die Aktivität von SOD und Katalase in diesem Modell durch Safranal erhöht (FOTOOHI et al., 2021), was auf antioxidative Wirkungen als möglichen Mechanismus der Neuroprotektion hinweist. Auch in den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit können antioxidative Effekte des CSE *in vivo* nachgewiesen werden. Diese sind jedoch nicht abhängig vom Transkriptionsfaktor DAF-16. Eine weitere Untersuchung der molekularen Wirkmechanismen von Safran ist demnach nötig.

Auf Grund der hier entdeckten neuroprotektiven Wirkungen könnte der CSE in der Prävention und begleitenden Therapie von neurodegenerativen Krankheiten von Nutzen sein. Die Wirkmechanismen dieses Extraktes sollten jedoch weiter untersucht werden.

## 5.7 Neuroprotektive Wirkungen von JGE

Der Extrakt aus Jiaogulan zeigt *in vitro* antioxidative Eigenschaften. Auch ein aus dieser Pflanze isoliertes Polysaccharid besitzt in zellfreien Systemen radikalfangende Eigenschaften (WANG et al., 2020). *In vivo* hingegen wird die endogene Menge an ROS in den Nematoden durch JGE nicht verringert. Da der Extrakt keine fluoreszenzlöschenden Eigenschaften besitzt (Abbildung 43), kann ausgeschlossen werden, dass er *in vivo* prooxidative Eigenschaften besitzt. Die thermale Stressresistenz der Tiere kann durch 1 mg/ml JGE leicht erhöht werden, das Überleben unter diesen Bedingungen ist verlängert. Da JGE unter diesen Bedingungen die Menge an ROS in *C. elegans* jedoch nicht verringert, müssen die protektiven Effekte durch andere molekulare Wirkmechanismen zu Stande kommen, welche weiter untersucht werden sollten. Die Resistenz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress wird durch eine Behandlung der Tiere mit JGE sogar verkürzt, was auf eine toxische Wirkung des Extraktes unter diesen Bedingungen hindeutet. In verschiedenen Zellen kann ein Gypenosid jedoch vor oxidativem Stress schützen, auch vor oxidativem Stress durch Superoxidanionen (LI et al., 1993). WANG et al. (2020) zeigen ebenfalls, dass das von ihnen untersuchte Polysaccharid aus Jiaogulan in einem zellfreien Experiment Superoxidanionen abfangen kann. Da hier jedoch jeweils isolierte Substanzen eingesetzt werden, ist es durchaus möglich, dass der Extrakt, welcher in der vorliegenden Arbeit Anwendung findet, nicht in der Lage ist, präventiv vor den durch Paraquat generierten Superoxidanionen zu schützen und im Gegenteil, die Lage sogar verschlimmert. Weitere toxische Wirkungen des Extraktes können in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Die

Größe der Nematoden (Abbildung 41B) und die Pumpfrequenz ihres Pharynx (Abbildung 39B) sind durch JGE im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Auch in der Literatur wird von keinen adversen Wirkungen von *G. pentaphyllum* berichtet (ATTAWISH et al., 2004; CHIRANTHANUT et al., 2013).

JGE ist nicht in der Lage, die Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 hinsichtlich einer vermehrten nukleären Lokalisation zu verändern und die im Wildtyp erhöhte thermale Stressresistenz zeigt sich ebenfalls in den DAF-16-Deletionsmutanten. Daher ist der Transkriptionsfaktor DAF-16 für die Vermittlung dieses Effektes nicht essentiell. Ein Saponin aus Jiaogulan erhöht in diabetischen Ratten die Expression des Transkriptionsfaktors Nrf2 (GAO et al., 2016). Eine Vermittlung des Effekts von JGE auf die thermale Stressresistenz in *C. elegans* über diesen Transkriptionsfaktor ist möglich und sollte daher weiter untersucht werden.

Einerseits ist JGE in der Lage, präventiv vor einer Schädigung der dopaminergen Neuronen von *C. elegans* durch 6-OHDA zu schützen. Passend zu diesen Ergebnissen kann ein ethanolischer Extrakt aus Jiaogulan auch die Schädigung von dopaminergen Neuronen in Ratten, welche zuvor mit 6-OHDA behandelt werden, deutlich verringern (CHOI et al., 2010). Gypenoside schützen die dopaminergen Neuronen von Ratten, bei denen die neuronalen Schäden mit Hilfe des Neurotoxins 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) hervorgerufen werden, wobei eine präventive Gabe, wie sie auch in dieser Arbeit eingesetzt wird, bessere Effekte erzielt als eine parallele oder spätere Gabe (WANG et al., 2010). Da in diesen Ratten die Aktivität der SOD, Katalase und Glutathionperoxidase erhöht ist, vermuten WANG et al. (2010) dies als Wirkmechanismus der Gypenoside. Zudem ist das Level an Glutathion erhöht (WANG et al., 2010). Da die Glutathion-Synthetase über SKN-1 reguliert wird (AN und BLACKWELL, 2003), deutet die Entdeckung von WANG et al. (2010) auch auf eine Beteiligung von SKN-1/Nrf2 an den neuroprotektiven Effekten hin. Dies stellt auch einen möglichen Wirkmechanismus für die neuroprotektiven Effekte in den Nematoden dar.

Andererseits zeigt der Extrakt keine signifikanten neuroprotektiven Eigenschaften in einem *C. elegans* Parkinsonmodell, in dem die dopaminergen Neuronen durch eine Überproduktion an Dopamin geschädigt werden. Das durch 6-OHDA (CHOI et al., 2010) oder MPTP (WANG et al., 2010) verringerte Level an Dopamin im Gehirn der Versuchstiere kann durch die Gabe von Gypenosiden verbessert werden (CHOI et al., 2010; WANG et al., 2010). Dieser modulatorische Effekt scheint jedoch nicht vor einer Überproduktion an Dopamin zu schützen, scheint die Situation aber auch nicht weiter zu verschlimmern. Weitere

mechanistische Untersuchungen sollten folgen, um den Wirkmechanismus von JGE zu verstehen.

JGE verzögert die durch humanes A $\beta_{1-42}$  induzierte Paralyse der Nematoden im Vergleich zur Kontrolle signifikant, ist jedoch nicht in der Lage, die mittlere Anzahl der in einem weiteren *C. elegans* Modell für M. Alzheimer gebildeten A $\beta_{1-42}$ -Plaques signifikant zu verringern. Da die Anzahl der Plaques jedoch zumindest ein wenig reduziert wird, könnte diese Reduktion der Akkumulation von A $\beta_{1-42}$  mitverantwortlich für die verzögerte Paralyse sein. Es müssen jedoch noch weitere Mechanismen an der Verzögerung der Paralyse beteiligt sein. Ein möglicher Mechanismus könnte beispielsweise ein durch JGE vermehrter Abbau von A $\beta$  sein. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von MENG et al. (2016) gestützt, welche zeigen, dass ein Inhaltsstoff von Jiaogulan, Gypenosid 17 den Abbau von A $\beta_{1-40}$  und A $\beta_{1-42}$  in Zellen fördert. Zudem kann dieser Inhaltsstoff die Formierung von A $\beta$ -Plaques in einem Mausmodell für M. Alzheimer verringern (MENG et al., 2016). Das Gypenosid 17 erhöht die Viabilität von Zellen, welche mit A $\beta_{25-35}$  behandelt werden, verringert das Level an ROS in diesen Zellen, erhöht die Menge an Glutathion und aktiviert den Nrf2-Signalweg (MENG et al., 2014). Auch in den Nematoden könnte eine Aktivierung von SKN-1 wichtig für die Verzögerung der A $\beta_{1-42}$ -bedingten Paralyse sein. Dies sollte weiter untersucht werden.

Zusätzlich ist JGE in den in dieser Arbeit untersuchten Konzentrationen ein potenter Inhibitor der AChE und könnte somit auch deshalb in der Prävention und Therapie von M. Alzheimer eingesetzt werden. Zu Effekten von JGE oder seinen Inhaltsstoffen auf die AChE sind bisher noch keine Studien zu finden.

JGE zeigt in den in dieser Arbeit verwendeten *C. elegans* Modellen für C. Huntington keinerlei protektive Wirkungen. Bisher sind noch keine Studien vorhanden, welche sich mit der Pflanze *G. pentaphyllum* oder ihren Inhaltsstoffen bezogen auf C. Huntington beschäftigen. Da Jiaogulan und seine Inhaltsstoffe in Modellen für M. Parkinson und M. Alzheimer protektive Eigenschaften besitzen, wären Studien zu seinen protektiven Effekten bei C. Huntington von Interesse, wobei der Nutzen dieser Untersuchungen auf Grund der in dieser Arbeit gezeigten fehlenden protektiven Wirkungen von JGE, fraglich ist.

## 5.8 Neuroprotektive Wirkungen von PME

PME besitzt keine adversen Effekte auf die Größe (Abbildung 41C) und die Pharynxpumpfrequenz der Nematoden (Abbildung 39C).

Der hier untersuchte Extrakt aus der Wurzel von *P. multiflorum* zeigt in höheren Konzentrationen starke antioxidative Effekte *in vitro*. BÜCHTER et al. (2015) können für

TSG, einen Inhaltsstoff der Wurzel, ebenfalls starke antioxidative Effekte *in vitro* nachweisen und auch LV et al. (2014) entdecken antioxidative Effekte zweier Polysaccharide aus *P. multiflorum*. Der Extrakt zeigt jedoch nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* starke antioxidative Effekte. Das endogene ROS-Level der Nematoden kann durch den Extrakt stark verringert werden. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch einen fluoreszenzlöschenden Effekt von PME besteht nicht (Abbildung 43C). TSG zeigt sowohl direkte antioxidative Effekte im TEAC-Assay als auch eine indirekte antioxidative Kapazität durch die Modulation von antioxidativen Enzymen (BÜCHTER et al., 2015). Da auch Emodin die Expression von antioxidativen Enzymen erhöhen kann (ZHAO et al., 2017a), ist es möglich, dass PME nicht nur durch direkte antioxidative Effekte, sondern auch durch eine erhöhte Expression von antioxidativen Enzymen das ROS-Level der Nematoden verringern kann.

PME erhöht die Resistenz der Nematoden gegenüber thermalem Stress nicht. Dies wird durch die Ergebnisse von SUN et al. (2021), die ebenfalls einen Extrakt aus der Wurzel von *P. multiflorum* untersuchen, bestätigt. BÜCHTER et al. (2015) können hingegen eine erhöhte Thermoresistenz von *C. elegans* durch TSG feststellen. Hier verlängern 50 µM TSG die mittlere Überlebenszeit bei 37°C um 22%. Auch Resveratrol (BÜCHTER et al., 2015) und Quercetin (KAMPKÖTTER et al., 2007) erhöhen die Resistenz von *C. elegans* gegenüber thermalem Stress und sind in der Wurzel von *P. multiflorum* enthalten (WANG et al., 2017a). Diese sich widersprechenden Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die Konzentration an TSG oder anderen Bestandteilen, die ebenfalls die Thermoresistenz von *C. elegans* erhöhen können, in dem hier untersuchten PME zu gering ist, als dass ein positiver Effekt auf die Thermoresistenz sichtbar werden kann. Genauere Untersuchungen des Extraktes hinsichtlich seiner Zusammensetzung sollten deshalb folgen.

Die Resistenz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress ist durch eine Vorbehandlung der Tiere mit PME erhöht. Auch dies wird durch SUN et al. (2021) bestätigt. Es ist möglich, dass dies durch eine Aktivierung von Stressabwehrmechanismen in *C. elegans* zustande kommt, wie es für TSG (BÜCHTER et al., 2015) und Emodin (ZHAO et al., 2017a) bereits bekannt ist.

Durch eine Inkubation mit dem Extrakt kommt es bei den Nematoden zu einer Translokation von DAF-16 in den Zellkern. Zusätzlich ist DAF-16 für die Vermittlung des antioxidativen Effektes *in vivo* essentiell. Die direkte radikalfangende Wirkung von PME ist nicht ausreichend, um die durch Hitze induzierte Erhöhung des Levels an ROS zu verringern. Eine Untersuchung der Resistenz von DAF-16 defizienten Nematoden gegenüber oxidativem

Stress ergibt jedoch, dass der Extrakt trotz des fehlenden DAF-16 die oxidative Stressresistenz der Nematoden erhöht und somit deren Lebensspanne unter diesen Bedingungen im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant verlängert. Die erhöhte Resistenz der wildtypischen Nematoden gegenüber oxidativem Stress ist folglich unabhängig vom Transkriptionsfaktor DAF-16. Dies kann mit den unterschiedlichen Bedingungen in den Experimenten erklärt werden: Da der Stress durch Paraquat relativ mild ist (die Tiere überleben einige Tage) im Vergleich zum thermalen Stress, bei dem die Nematoden nur noch wenige Stunden leben, könnte ein alternativer Signalweg in Gang gesetzt werden und die Nematoden so schützen. Ein Beispiel für einen solchen Mechanismus wäre eine Wirkung über SKN-1.

Durch eine Behandlung der Nematoden mit PME kann sowohl die durch 6-OHDA als auch die durch eine Überproduktion an Dopamin hervorgerufene Degeneration der dopaminergen Neuronen signifikant verringert werden. In einem Mausmodell für M. Parkinson zeigt PME eine Verringerung der Neurodegeneration und einen verringerten Verfall der motorischen Fähigkeiten (LI et al., 2005). Und auch der Inhaltsstoff TSG besitzt protektive Effekte gegenüber dopaminergen Neuronen in Ratten, welche mit 6-OHDA behandelt werden (HUANG et al., 2018). In Zellen, die mit 6-OHDA geschädigt werden, kann TSG die Viabilität verbessern und das Level an ROS senken (TAO et al., 2011). Auch in mit MPTP geschädigten Mäusen reduziert TSG das Level an ROS und die Degeneration der dopaminergen Neuronen (HE et al., 2015). Der antioxidative Effekt von PME könnte folglich ein Wirkmechanismus für die in den Nematoden vorhandenen neuroprotektiven Effekte sein. Da der Transkriptionsfaktor DAF-16 durch PME vermehrt im Nukleus der Nematoden lokalisiert ist, könnte auch seine Aktivierung und demnach eine erhöhte Expression antioxidativer Enzyme einen Einfluss auf die Neuroprotektion durch PME haben. Dies muss jedoch in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

PME verzögert die im transgenen Stamm CL4176 durch  $A\beta_{1-42}$  hervorgerufene Paralyse nicht, die Anzahl an  $A\beta_{1-42}$ -Plaques in einem weiteren transgenen Stamm (CL2006) wird jedoch signifikant reduziert. Dies weist darauf hin, dass eine reduzierte Menge an Plaques allein nicht unbedingt vor der toxischen Wirkung von  $A\beta_{1-42}$  schützt. Ein anderer Extrakt aus der Wurzel von *P. multiflorum* hingegen verringert die Anzahl an  $A\beta_{3-42}$ -Plaques in *C. elegans* und ist zusätzlich in der Lage, die Paralyse des Stammes CL4176 zu verzögern (SUN et al., 2021). Dieser Unterschied könnte auf die verschiedenen Extrakte, welche in dieser und in der Arbeit von SUN et al. genutzt werden, und deren unterschiedliche Zusammensetzung zurückzuführen sein. Auch in transgenen *Drosophila melanogaster*, welche  $A\beta_{1-42}$  exprimieren, besitzt ein PME protektive Effekte: Das Überleben der Tiere wird verlängert, die

Anzahl an zerstörten Zellen im Gehirn der Fliegen und das Level an ROS wird reduziert (LIU et al., 2015). Dies weist auf eine Wirkung des Extraktes durch seine antioxidativen Eigenschaften hin. Auch der in dieser Arbeit genutzte Extrakt zeigt starke antioxidative Wirkungen. TSG verbessert die kognitiven Fähigkeiten von mit  $A\beta_{1-42}$  behandelten Mäusen und erhöht die Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD und Katalase (XIE et al., 2018). Eine Beteiligung von DAF-16/FOXO an der protektiven Wirkung von PME scheint demnach ebenfalls möglich zu sein.

Werden Mäuse mit  $A\beta_{25-35}$  und einem Extrakt aus der Wurzel von *P. multiflorum* behandelt, verbessert PME die kognitive Leistung dieser Tiere im Vergleich zur nur mit  $A\beta_{25-35}$  behandelten Kontrolle (UM et al., 2006). Auch in *C. elegans*, welche  $A\beta_{1-42}$  in den Neuronen exprimieren, zeigen sich positive physiologische Effekte: Die chemotaktischen Fähigkeiten der Nematoden werden durch einen PME verbessert (SUN et al., 2021).

Zusätzlich ist PME in der höheren der beiden untersuchten Konzentrationen in der Lage, die AChE von wildtypischen Nematoden stark zu inhibieren, was ihn zu einem Kandidaten für die Behandlung von M. Alzheimer macht. Im Einklang mit diesem Ergebnis inhibiert der von Um et al. genutzte Extrakt die AChE im Gehirn von Mäusen (UM et al., 2006). Auch verschiedene Stilbenglucoside, isoliert aus der Wurzel von *P. multiflorum*, zeigen inhibierende Effekte auf die AChE (Zitteraal) *in vitro* (KIM et al., 2008).

Eine Behandlung von transgenen Nematoden mit PME verringert die Anzahl an PolyQ-Plaques im Kopfbereich der Tiere nur bedingt: Die geringere Konzentration ist in der Lage, die Plaque-Anzahl zu verringern, während die höhere Konzentration keinen Einfluss hat. Auch die ASH-Neuronen werden durch eine Behandlung der Nematoden mit PME nicht vor dem durch Fragmente des humanen Huntingtins hervorgerufenen Untergang geschützt. Die Reaktionsfähigkeit der Nematoden gegenüber einem mechanischen Stimulus an der Schnauze der Tiere ist jedoch durch PME konzentrationsabhängig verbessert. Bei der Einteilung der Nematoden des Stammes HA659 in Nematoden mit intakten oder degenerierten ASH-Neuronen, genügt bereits ein zerstörtes Neuron, um die Tiere in die Kategorie „defekt“ einzuteilen. Möglicherweise kommt die bessere Reaktionsfähigkeit der Nematoden dadurch zu Stande, dass nur ein Neuron, nicht jedoch beide Neuronen, durch die Huntingtin-Fragmente zerstört wird, das andere jedoch noch funktionstüchtig ist. Weiterhin könnte es daran liegen, dass die Neuronen bereits optische Merkmale einer Zerstörung besitzen, die Funktion jedoch noch nicht vollständig verloren ist. Dies sollte in weiteren Experimenten genauer untersucht werden. Bisher sind die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente die ersten, welche PME in Verbindung mit C. Huntington

untersuchen. Auch zu TSG, Emodin oder Rhein gibt es bisher keine Daten. Resveratrol ist in der Lage, die motorischen Fähigkeiten von einem Mausmodell für C. Huntington zu verbessern (NAIA et al., 2017). In transgenen *C. elegans*, welche PolyQ128 exprimieren, ist Resveratrol in der Lage, die Funktion der Neuronen zu erhalten (PARKER et al., 2005). Dies ist in DAF-16-Deletionsmutanten jedoch nicht der Fall, die Neuroprotektion wird über DAF-16 vermittelt (PARKER et al., 2005). Da auch der in dieser Arbeit verwendete Extrakt eine Translokation des Transkriptionsfaktors DAF-16 in den Zellkern fördert, scheint dies auch ein möglicher Wirkmechanismus des PME zu sein.

PME besitzt vielversprechende neuroprotektive Effekte in den hier untersuchten *C. elegans* Modellen und könnte für die Prävention und Therapie neurodegenerativer Krankheiten eingesetzt werden. Deshalb sollten weitere Experimente zu den Wirkmechanismen des Extraktes gemacht werden.

## 5.9 Neuroprotektive Wirkungen von REW

Der REW zeigt in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten keinerlei adverse Effekte und auch die Größe der Nematoden (Abbildung 41D) und ihre Pharynxpumpfrequenz (Abbildung 39D) bleiben durch eine Behandlung mit dem Extrakt unverändert.

In einem zellfreien System besitzt REW starke radikalfangende Eigenschaften und wirkt auch in den Nematoden antioxidativ. Eine Beeinflussung der *in vivo* vorhandenen antioxidativen Kapazität durch einen fluoreszenzlöschenden Effekt (Abbildung 43D) scheint jedoch möglich zu sein. Dies sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden, z. B. durch eine Messung der in den Nematoden vorhandenen Menge an REW. Da REW sehr starke radikalfangende Eigenschaften besitzt, WANG et al. (2017c) eine durch Rosmarin erhöhte Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD und Katalase in *Drosophila melanogaster* zeigen (WANG et al., 2017c) und auch die Rosmarinsäure in *C. elegans* antioxidativ wirkt (SAIER et al., 2020), ist eine antioxidative Wirkung des REW wahrscheinlich. Die Lebensspanne der Nematoden unter thermalem Stress wird durch REW nicht verlängert. Gleichermäßen ist die Rosmarinsäure nicht in der Lage, die thermale Stressresistenz von *C. elegans* zu verbessern und auch die oxidative Stressresistenz bleibt durch 200 µM Rosmarinsäure unverändert (SAIER et al., 2020). Das Überleben unter oxidativen Stressbedingungen wird jedoch durch 1 mg/ml REW verlängert. Dies kann unter anderem auf die gute direkte antioxidative Wirkung des Extraktes zurückgeführt werden, kann jedoch auch an einer durch DAF-16 vermittelten Wirkung liegen. Da die in Rosmarin enthaltene Carnosolsäure die Resistenz von *C. elegans* gegenüber oxidativem Stress erhöht (LIN et al.,

2019), könnte dieser Inhaltsstoff für diesen Effekt des REW verantwortlich bzw. mitverantwortlich sein. Die Zusammensetzung des in dieser Arbeit verwendeten REW sollte untersucht werden.

REW verursacht eine Translokation von DAF-16 in den Zellkern der Nematoden. In *Drosophila melanogaster* ist die Aktivität der SOD und Katalase durch einen Rosmarinextrakt erhöht (WANG et al., 2017c). Auch durch die Carnosolsäure wird die Menge an SOD in *C. elegans* erhöht (LIN et al., 2019). Dies spricht ebenfalls für eine Wirkung des Extraktes über DAF-16. Während der antioxidative Effekt von REW in *C. elegans* jedoch nicht von DAF-16 abhängig ist, ist für die Erhöhung der Resistenz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress der Transkriptionsfaktor DAF-16 essentiell. Der durch die Rosmarinsäure hervorgerufene antioxidative Effekt in *C. elegans* ist im Gegensatz zu REW von DAF-16 abhängig (SAIER et al., 2020). Da aber nicht alle Effekte von REW DAF-16-abhängig sind, müssen zusätzlich noch weitere Mechanismen für die Wirkungen des REW verantwortlich sein. Dies kann z. B. eine über SKN-1/Nrf2 vermittelte Wirkung sein. Dafür spricht, dass ein Rosmarinextrakt eine erhöhte Expression von Nrf2 in Zellen hervorruft (TONG et al., 2017). Zudem wird das Leben von *C. elegans* durch die Carnosolsäure verlängert. Dieser Effekt ist von SKN-1 abhängig (LIN et al., 2019).

Eine präventive Behandlung mit REW zeigt keinen schützenden Effekt auf die dopaminergen Neuronen von Nematoden, die mit 6-OHDA behandelt werden. Der Extrakt ist jedoch in der Lage, die durch eine Überproduktion an Dopamin hervorgerufene Degeneration der dopaminergen Neuronen in *C. elegans* zu verringern. In einem *C. elegans* Modell für M. Parkinson verringert die Rosmarinsäure (100  $\mu$ M) die Akkumulation von ROS. (HANUMANTHAPPA et al., 2020). Da freies Dopamin durch eine Reaktion mit ROS schnell hoch reaktive Dopaminquinone bilden kann (JANA et al., 2011), könnte dies für den in dieser Arbeit gezeigten neuroprotektiven Effekt im UA57 Stamm verantwortlich sein. Möglicherweise ist auch DAF-16 an der Neuroprotektion beteiligt, denn die Rosmarinsäure erhöht in einem *C. elegans* Modell für M. Parkinson die Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD und Katalase (HANUMANTHAPPA et al., 2020). Aber auch eine Aktivierung des SKN-1/Nrf2-Signalwegs könnte mitverantwortlich sein für die Neuroprotektion: In Zebrafischen reduziert die Rosmarinsäure die durch MPTP induzierte Neurodegeneration, erhöht die nukleäre Lokalisation von Nrf2 und die Menge an Glutathion und verringert so das Level an ROS in den Tieren (ZHAO et al., 2020). Auch der durch Carnosolsäure induzierte protektive Effekt in Neuroblastomazellen zeigt eine Abhängigkeit von Nrf2: Die Carnosolsäure erhöht die Aktivität von Nrf2 und die Menge an Glutathion und verringert das Level an ROS (DE OLIVEIRA et al., 2016).

Auch die Beweglichkeit der Nematoden, welche in dem von HANUMANTHAPPA et al. (2020) genutzten Parkinsonmodell im Vergleich zum Wildtyp verringert ist, wird durch die Rosmarinsäure verbessert. Der REW sollte ebenfalls hinsichtlich dieses physiologischen Effekts untersucht werden.

Der REW ist nicht in der Lage, die durch  $A\beta_{1-42}$  induzierte Paralyse der Nematoden zu verringern. Wie auch bei PME der Fall, bewirkt der REW jedoch eine Reduktion von  $A\beta_{1-42}$ -Plaques in *C. elegans*. Auch hier scheint die Reduktion der Plaque-Anzahl die Toxizität nicht so weit zu beeinflussen, als dass die eintretende Paralyse der Nematoden verzögert werden würde. Im Gegensatz zu dem hier verwendeten Rosmarinextrakt, verzögert die Carnosolsäure die eintretende Paralyse von  $A\beta_{1-42}$ -exprimierenden Nematoden signifikant (LIN et al., 2019). Die Menge an Carnosolsäure in dem für diese Arbeit verwendeten REW ist unbekannt, scheint jedoch nicht auszureichen, die Paralyse zu verzögern. Die Zusammensetzung des Extraktes sollte weiterführend untersucht werden. Die Carnosolsäure erhöht die Viabilität von humanen Neuroblastomazellen, welche mit  $A\beta_{1-42}$  behandelt werden, und verringert die Anzahl an  $A\beta_{1-42}$ -Plaques (LIU et al., 2016). Auch die Menge an ROS in diesen Zellen wird durch die Carnosolsäure reduziert (LIU et al., 2016). Die Rosmarinsäure verringert ebenfalls das Level an ROS in Zellen (PC12). Zudem wird die Aktivität von Nrf2 erhöht (RONG et al., 2018). Dies könnten mögliche Wirkmechanismen von REW sein. Möglicherweise spielt bei der durch REW verringerten Plaque-Anzahl auch DAF-16 eine Rolle. Dies muss jedoch in weiteren Experimenten untersucht werden.

Ein weiterer Effekt des REW, der für REW als präventives bzw. therapeutisches Mittel bei M. Alzheimer spricht, ist sein inhibitorischer Effekt auf die AChE von *C. elegans*. Auch im Gehirn von Ratten inhibieren ein Rosmarinextrakt und die Rosmarinsäure die AChE (OZAROWSKI et al., 2013). Dies steht im Einklang mit den in dieser Arbeit generierten Ergebnissen und fördert die Annahme, dass Rosmarin bei der Behandlung von M. Alzheimer Anwendung finden kann.

Bezogen auf die in dieser Arbeit eingesetzten *C. elegans* Modelle für C. Huntington besitzt REW kaum protektive Effekte: Die Anzahl an PolyQ-Plaques wird durch REW nicht reduziert und auch die Degeneration der ASH-Neuronen kann durch REW nicht verringert werden. Die Reaktionsfähigkeit der Nematoden gegenüber dem noxischen Stimulus hingegen wird durch REW zwar nur leicht, aber dennoch signifikant verbessert. In einem Rattenmodell für C. Huntington kann durch die Gabe von mit Rosmarinsäure beladenen Nanopartikeln die motorische Koordination und die motorischen Fähigkeiten der Tiere verbessert werden (BHATT et al., 2014). Zusätzlich werden die Mengen an Katalase und Glutathion im Gehirn

der Ratten erhöht (BHATT et al., 2014). Eine Vermittlung der Effekte über SKN-1/Nrf2 und DAF-16/FOXO scheint möglich zu sein. Da REW in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten eine Translokation von DAF-16 in den Zellkern verursacht und die oxidative Stressresistenz der Nematoden über DAF-16 vermittelt wird, sollte die Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der die Reaktionsfähigkeit der Nematoden verbessernden Wirkung von REW weiter untersucht zu werden. Es sollten weitere Studien zu Rosmarin und seinen Inhaltsstoffen und *C. Huntington* folgen, da es bisher kaum Daten hierzu gibt.

Ein Einsatz von Rosmarin in der Prävention und begleitenden Therapie von neurodegenerativen Krankheiten scheint auf Grund der vorliegenden positiven Effekte des Extraktes möglich zu sein und sollte weiter untersucht werden.

### 5.10 Neuroprotektive Wirkungen von ZJE

In einem zellfreien Umfeld zeigt ZJE radikalfangende Eigenschaften. Diese scheinen im Vergleich zu den *in vivo* in *C. elegans* beobachteten starken antioxidativen Wirkungen eher schwach zu sein. Dieser Extrakt besitzt wahrscheinlich nicht nur direkte, sondern auch indirekte antioxidative Wirkungen. Die Messung des endogenen ROS-Levels wird nicht durch fluoreszenzlöschende Eigenschaften des ZJE beeinflusst (Abbildung 43E). Auch weitere Extrakte aus den Früchten von *Z. jujuba* zeigen radikalfangende Eigenschaften (CHOI et al., 2011; RAJAEI et al., 2020). Die thermale und die oxidative Stressresistenz der Nematoden, welche mit ZJE behandelt werden, ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant erhöht. Diese protektiven Eigenschaften des Extraktes können möglicherweise zumindest zum Teil auf die guten antioxidativen Eigenschaften des Extraktes zurückgeführt werden. Auch in *Drosophila melanogaster* ist ein Extrakt aus den Früchten der chinesischen Dattel in der Lage, die Resistenz der Tiere gegenüber oxidativem Stress in Form von Paraquat zu erhöhen (GHIMIRE und KIM, 2017).

Eine Translokation von DAF-16 in den Zellkern findet durch eine Behandlung der Nematoden mit ZJE nicht statt. Und auch an der die oxidative Stressresistenz erhöhenden Wirkung ist DAF-16 nicht beteiligt, da auch in Deletionsmutanten das Überleben der Nematoden unter oxidativem Stress erhöht ist. Für die erhöhte thermale Stressresistenz der Tiere ist DAF-16 jedoch essentiell. Die Lebensspanne der DAF-16-Deletionsmutanten ist unter thermalem Stress durch eine Behandlung der Tiere mit ZJE sogar deutlich verkürzt. Ohne DAF-16 scheint der zuvor protektiv wirkende Extrakt eher toxische Effekte zu besitzen. Der im Wildtyp vorhandene antioxidative Effekt ist in den Mutanten ebenfalls nicht zu sehen. Für diese Wirkung des Extraktes ist DAF-16 essentiell. Dies bestätigt die Annahme, dass für den

antioxidativen Effekt *in vivo* vor allem die indirekte antioxidative Aktivität des Extraktes wichtig ist, denn die direkten radikalfangenden Eigenschaften des Extraktes sind nicht ausreichend, um in DAF-16-Deletionsmutanten antioxidative Wirkungen hervorzurufen. Folglich sind auch im Wildtyp indirekte antioxidative Effekte an der Wirkung beteiligt. Obwohl es zu keiner signifikanten Translokation von DAF-16 in den Zellkern der Nematoden kommt, ist der Transkriptionsfaktor für die Vermittlung von bestimmten Effekten des Extraktes notwendig. Auch in *Drosophila melanogaster* scheinen die Effekte des Fruchtextraktes über FOXO zu wirken: Der Extrakt hemmt einen Faktor (14-3-3 $\epsilon$ ), welcher diesen Transkriptionsfaktor im Zytosol hält (GHIMIRE und KIM, 2017). Jujubosid A verringert den oxidativen Stress von diabetischen Mäusen und erhöht die Aktivität von antioxidativen Enzymen wie der SOD, Katalase und Glutathionperoxidase (ZHONG et al., 2022). Zusätzlich scheint ein Extrakt aus den Früchten der chinesischen Dattel auch über SKN-1/Nrf2 wirken zu können, denn CHEN et al. (2014) können in Zellen eine durch den Extrakt erhöhte Expression der Glutathion-S-Transferase nachweisen. Dies wird durch Untersuchungen an murinen Makrophagen unterstützt, denn hier zeigt sich ebenfalls eine erhöhte Expression von Nrf2-Zielgenen (CHEN et al., 2016). In diesem Fall könnte die in den Nematoden nicht von DAF-16 abhängige Verbesserung der oxidativen Stressresistenz z. B. über SKN-1 vermittelt sein.

ZJE verursacht keine Veränderung der Größe (Abbildung 41E) der Nematoden und auch keine Verringerung der Nahrungsaufnahme (Abbildung 39E).

Er ist in der Lage, die Degeneration der durch 6-OHDA geschädigten dopaminergen Neuronen zu verringern. Dieser Effekt ist zwar signifikant, jedoch relativ gering. Wird die Degeneration der dopaminergen Neuronen durch eine erhöhte Produktion an Dopamin in den Zellen hervorgerufen, zeigt ZJE nur eine leichte und nicht signifikante Protektion. Da bisher noch keine Studien zu *Z. jujuba* oder den charakteristischen Inhaltsstoffen Jujubosid A und B und ihren Wirkungen in Modellen für M. Parkinson vorliegen, ist eine genaue Betrachtung der Mechanismen, welche der Neuroprotektion zu Grunde liegen, schwierig. Ein weiterer Inhaltsstoff der Früchte von *Z. jujuba*, Quercetin (KHAN et al., 2020), schützt ein Rattenmodell für M. Parkinson vor Verhaltensveränderungen und oxidativem Stress durch Rotenon (EL-HORANY et al., 2016). Möglicherweise spielen die antioxidativen Eigenschaften bei der Vermittlung der Neuroprotektion in *C. elegans* eine Rolle, da auch 6-OHDA die Bildung von ROS fördert (FREINBICHLER et al., 2020). Auch DAF-16 oder SKN-1 könnten am Wirkmechanismus beteiligt sein. Weitere Untersuchungen hierzu sollten folgen.

Die durch A $\beta$ <sub>1-42</sub> in den Nematoden hervorgerufene Paralyse wird durch eine Behandlung der Nematoden mit ZJE nicht verzögert. ZJE schützt folglich nicht vor der Toxizität von A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Dennoch verringert der Extrakt die Akkumulation von A $\beta$ <sub>1-42</sub> in transgenen Nematoden. Die verringerte Plaque-Anzahl scheint jedoch, wie auch bei PME und REW, nicht in der Lage zu sein, die Toxizität ausreichend zu verringern und so die Paralyse zu verzögern. Der Inhaltsstoff Jujubosid A verbessert die kognitiven Fähigkeiten von Mäusen und zeigt vielversprechende A $\beta$ <sub>1-42</sub>-reduzierende Eigenschaften in ihrem Gehirn (LIU et al., 2014). Die Reduktion von A $\beta$ <sub>1-42</sub> durch Jujubosid A ist sogar stärker als die durch Donepezil (LIU et al., 2014), einem Medikament gegen M. Alzheimer (Übersichtsartikel: HAMPEL et al., 2019; Übersichtsartikel: RAMACHANDRAN et al., 2021). Zudem ist in diesen Mäusen die Aktivität der SOD und Glutathionperoxidase erhöht (LIU et al., 2014). Möglicherweise könnte DAF-16 an der Plaque-reduzierenden Wirkung von ZJE in *C. elegans* beteiligt sein. Von einer verringerten Plaque-Akkumulation im Gehirn von Mäusen durch Jujubosid A und einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten berichten auch ZHANG et al. (2018b). Vor allem die Plaque-reduzierenden Eigenschaften von ZJE scheinen für die Vermittlung der protektiven Effekte in Modellen für M. Alzheimer wichtig zu sein. Der genaue Wirkmechanismus und die Beteiligung von DAF-16/FOXO oder SKN-1/Nrf2 sollten weiter untersucht werden.

Der für diese Arbeit genutzte Extrakt aus den Früchten von *Z. jujuba* inhibiert die AChE von *C. elegans* nicht. Dahingegen zeigt das Peptid Snakin-Z, ein Inhaltsstoff der Frucht, inhibitorische Effekte auf die AChE (ZARE-ZARDINI et al., 2013). Jujubosid A reduziert das Level der AChE im Gehirn von Mäusen (LIU et al., 2014). Da ZJE jedoch keine Inhibition der AChE von *C. elegans* zeigt, scheint der Gehalt an die AChE inhibierenden Substanzen in diesem Extrakt zu gering zu sein.

Die Akkumulation von PolyQ-Plaques in transgenen *C. elegans* wird durch ZJE nicht verringert. Die ASH-Neuronen werden jedoch vor der durch Fragmente des humanen Huntingtins verursachten Degeneration geschützt. In den mit ZJE behandelten Nematoden sind mehr Tiere mit intakten Neuronen vorhanden als in der unbehandelten Kontrollgruppe. Passend zur verringerten Degeneration der ASH-Neuronen wird auch die Reaktionsfähigkeit dieser Nematoden gegenüber einem mechanischen Stimulus an ihrer Schnauze signifikant verbessert. Da einige der Effekte von ZJE über DAF-16 vermittelt werden, könnte dieser auch ein möglicher Vermittler des Schutzes vor der durch Fragmente des humanen Huntingtins verursachten Degeneration der ASH-Neuronen sein. Bisher gibt es noch keine Daten zu C. Huntington im Zusammenhang mit *Z. jujuba* oder den Hauptwirkstoffen Jujubosid A und B. Quercetin ist in der Lage, das Verhalten eines Rattenmodells für C.

Huntington zu verbessern und die Aktivität der SOD und Katalase im Gehirn der Tiere zu erhöhen (SANDHIR und MEHROTRA, 2013) und ist ebenfalls in den Früchten der chinesischen Dattel enthalten (KHAN et al., 2020). Eine Wirkung über DAF-16/FOXO scheint demnach möglich zu sein, dies sollte jedoch weiter untersucht werden, genau wie die Zusammensetzung und die Inhaltsstoffe des ZJE.

Auf Grund der in dieser Arbeit gezeigten positiven Effekte von ZJE in *C. elegans* Modellen für neurodegenerative Krankheiten kann ein Einsatz in der Prävention und Therapie dieser Erkrankungen lohnenswert sein, es sollten jedoch weitere Untersuchungen hierzu folgen.

## 6 Fazit und Ausblick

Sowohl der OBE und seine Inhaltsstoffe als auch die weiterhin untersuchten Extrakte CSE, JGE, PME, REW und ZJE besitzen im Modellorganismus vielseitige neuroprotektive Wirkungen. Die allgemeine Datenlage zu den untersuchten Extrakten und Inhaltsstoffen bezüglich der neurodegenerativen Krankheiten M. Parkinson, M. Alzheimer und C. Huntington ist dabei recht begrenzt. Vor allem zu C. Huntington fehlen Studien. In dieser Arbeit wird erstmalig von neuroprotektiven Effekten verschiedener Extrakte wie z. B. durch OBE, CSE, PME oder REW berichtet. Auf Grund dieser protektiven Effekte könnten die hier untersuchten pflanzlichen Extrakte und Substanzen in der Prävention und Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden. Weiterführende Experimente sind jedoch notwendig, um beispielsweise die genauen Wirkmechanismen zu verstehen. Hier könnte zunächst die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren DAF-16 und SKN-1 und ihrer Zielgene in *C. elegans* untersucht werden.

Zudem sollten weitere Untersuchungen zu den physiologischen Effekten der Extrakte und Substanzen in *C. elegans* erfolgen. Bezogen auf M. Parkinson könnte unter anderem die Wirkung der Extrakte auf die Verlangsamung der Bewegungen, wenn die Tiere auf eine Nahrungsquelle stoßen, untersucht werden.

Weiterführend sollten die Inhaltsstoffe und die Zusammensetzungen der Extrakte untersucht werden. So könnten die Hauptwirkstoffe identifiziert und etwaige synergistische oder additive Effekte der Inhaltsstoffe untersucht werden.

Da in anderen Studien im Vergleich zu dieser Arbeit höhere Konzentrationen z. B. an OS (ZHANG et al., 2015) oder 3-HT (BRUNETTI et al., 2020) untersucht werden, könnte es sich auch lohnen, höhere Konzentrationen einzusetzen. Hier bestehen jedoch Limitationen bezüglich der Löslichkeit der Substanzen (v. a. bei OS). Um dies zu umgehen könnten

weiterführende Experimente mit *C. elegans* auf Agarplatten durchgeführt werden, anstatt in Flüssigmedien.

Der Modellorganismus *C. elegans* erweist sich als sehr nützlich für die Erforschung der neuroprotektiven Wirkungen unterschiedlichster Extrakte, bevor weitere Experimente in anderen Organismen vorgenommen werden. Zusätzlich kann er zur Aufdeckung von Wirkmechanismen eingesetzt werden.

## 7 Zusammenfassung

Eine kausale Therapie der neurodegenerativen Krankheiten M. Parkinson, M. Alzheimer und C. Huntington gibt es noch nicht. Bisher erfolgt nur eine symptomatische Behandlung dieser Krankheiten. Pflanzliche Extrakte sind vielversprechende Kandidaten für Prävention und Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen. Aus diesem Grund werden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen am Modellorganismus *C. elegans* hinsichtlich der antioxidativen Effekte verschiedener pflanzlicher Extrakte und ausgewählter Inhaltsstoffe und deren Wirkungen auf die thermale und oxidative Stressresistenz durchgeführt. Zudem werden die Extrakte auf neuroprotektive Effekte hinsichtlich M. Parkinson, M. Alzheimer und C. Huntington untersucht.

In einem *C. elegans* Modell für M. Parkinson ist ein Olivenblattextrakt (*Olea europaea*) in der Lage, die dopaminergen Neuronen vor einer durch 6-Hydroxydopamin hervorgerufenen Degeneration zu schützen: Die GFP-Fluoreszenz dieser Neuronen wird um bis zu 56% erhöht. Auch die in Olivenblättern enthaltenen Substanzen Oleuropein, Oleanolsäure und Tyrosol schützen die dopaminergen Neuronen, Hydroxytyrosol jedoch nicht. Bezogen auf M. Alzheimer verzögert der Extrakt die durch Amyloid- $\beta$  induzierte Paralyse der Nematoden um bis zu 0,8 h. Auch eine Behandlung der Nematoden mit Oleuropein, Hydroxytyrosol und Tyrosol schützt vor Amyloid- $\beta$ . Zudem sind sowohl der Extrakt als auch alle hier untersuchten Inhaltsstoffe in der Lage, die Anzahl an Amyloid- $\beta$ -Plaques in den Nematoden zu reduzieren. Durch den Extrakt (1 mg/ml) erfolgt eine Inhibition der Acetylcholinesterase um bis zu 84%. In einem *C. elegans* Modell für C. Huntington, bei dem es durch die Expression von Fragmenten des humanen Huntingtins zu einer Degeneration der ASH-Neuronen kommt, bewirkt eine Behandlung der Nematoden mit dem Extrakt eine bis zu vierfach erhöhte Anzahl an Nematoden mit intakten ASH-Neuronen. Die Reaktionsfähigkeit dieser Nematoden ist durch den Extrakt ebenfalls signifikant erhöht. Diese Effekte werden auch durch Hydroxytyrosol und Tyrosol vermittelt, jedoch in geringerem Ausmaß.

Die weiterhin untersuchten pflanzlichen Extrakte aus *Crocus sativus*, *Gynostemma pentaphyllum*, *Polygonum multiflorum*, *Rosmarinus officinalis* und *Ziziphus jujuba* besitzen ebenfalls neuroprotektive Effekte in verschiedenen Modellen von *C. elegans* für neurodegenerative Krankheiten und können beispielsweise in der Lage sein, die dopaminergen Neuronen vor dem Untergang zu schützen, die Toxizität von Amyloid- $\beta$  zu verringern oder die Reaktionsfähigkeit von Nematoden, deren ASH-Neuronen durch die Expression von humanen Huntingtinf Fragmenten zerstört werden, zu verbessern.

Die hier untersuchten pflanzlichen Extrakte und Substanzen sind mögliche Kandidaten für die Prävention und unterstützende Therapie bei den neurodegenerativen Krankheiten M. Parkinson, M. Alzheimer und C. Huntington, weitere Experimente zur Wirkungsweise und den Wirkmechanismen der Extrakte und Substanzen bezüglich der neuroprotektiven Eigenschaften sollten jedoch folgen. *C. elegans* eignet sich gut als Modellsystem für die initiale Untersuchung von pflanzlichen Extrakten und Einzelsubstanzen, weitere Untersuchungen in komplexeren Modellorganismen, z. B. in Säugern, sind jedoch notwendig.

## 7.1 Abstract

Until now, there is no cure for the neurodegenerative disorders Parkinson's, Alzheimer's and Huntington's disease and medical treatment only relieves symptoms. Plant derived extracts are promising candidates for prevention and therapy of neurodegenerative diseases. Therefore, several extracts and selected compounds are screened for antioxidant and stress resistance improving properties in the model organism *C. elegans*. Furthermore, neuroprotective effects on Parkinson's, Alzheimer's and Huntington's disease are examined.

In a *C. elegans* model for Parkinson's disease an extract of olive leaves (*Olea europaea*) protects dopaminergic neurons from 6-Hydroxydopamine-induced damage: GFP-fluorescence of these neurons is increased by up to 56%. Likewise, tested compounds of olive leaves, oleuropein, oleanolic acid, and tyrosol but not hydroxytyrosol have protective effects on dopaminergic neurons. In relation to Alzheimer's disease, olive leaf extract delays Amyloid- $\beta$ -induced paralysis about up to 0.8 h. Treatment of nematodes with oleuropein, hydroxytyrosol and tyrosol protects against Amyloid- $\beta$ , too. The extract as well as all tested compounds reduce the number of Amyloid- $\beta$ -plaques in the nematodes. Furthermore, the extract (1 mg/ml) inhibits acetylcholinesterase up to 84%. Treatment of a *C. elegans* model of C. Huntington expressing fragments of human huntingtin with olive leaf extract protects against degeneration of ASH-neurons and increases the number of nematodes with intact ASH-neurons up to fourfold. Likewise, responsiveness of these nematodes is increased by the extract, too. These effects are mediated by hydroxytyrosol and tyrosol as well, but to a lesser extend.

Other plant derived extracts from *Crocus sativus*, *Gynostemma pentaphyllum*, *Polygonum multiflorum*, *Rosmarinus officinalis* and *Ziziphus jujuba* induce neuroprotective effects in *C. elegans* model of Parkinson's, Alzheimer's and Huntington's disease, too: They protect dopaminergic neurons, reduce the toxicity of Amyloid- $\beta$  or improve responsiveness of nematodes whose ASH-neurons degenerate due to an expression of fragments of human huntingtin.

In conclusion, the extracts and substances examined here are promising candidates for prevention and therapy of Parkinson's, Alzheimer's and Huntington's disease. However, further investigations on underlying mechanisms are needed. *C. elegans* is a good model system for the initial analysis of plant derived extracts and substances, but investigation in more complex model organisms, e. g. in mammals, is required.

## 8 Literaturverzeichnis

- ACHOUR, I.; AREL-DUBEAU, A.-M.; RENAUD, J.; LEGRAND, M.; ATTARD, E.; GERMAIN, M.; MARTINOLI, M.-G. (2016): Oleuropein Prevents Neuronal Death, Mitigates Mitochondrial Superoxide Production and Modulates Autophagy in a Dopaminergic Cellular Model. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1293
- AHN, J. H.; HU, Y.; HERNANDEZ, M.; KIM, J. R. (2011): Crocetin inhibits beta-amyloid fibrillization and stabilizes beta-amyloid oligomers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **414** (1), 79-83
- ALHAITHLOUL, H. A. S.; ALOTAIBI, M. F.; BIN-JUMAH, M.; ELGEBALY, H.; MAHMOUD, A. M. (2019): Olea europaea leaf extract up-regulates Nrf2/ARE/HO-1 signaling and attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat kidney. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **111**, 676-685
- ALIREZAEI, M.; DEZFOULIAN, O.; NEAMATI, S.; RASHIDIPOUR, M.; TANIDEH, N.; KHERADMAND, A. (2012): Oleuropein prevents ethanol-induced gastric ulcers via elevation of antioxidant enzyme activities in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry* **68**, 583-592
- ALNUSAIRE, T. S.; SAYED, A. M.; ELMAIDOMY, A. H.; AL-SANEA, M. M.; ALBOGAMI, S.; ALBQMI, M.; ALOWAIESH, B. F.; MOSTAFA, E. M.; MUSA, A.; YOUSSEF, K. A.; REFAAT, H.; OTHMAN, E. M.; DANDEKAR, T.; ALAAELDIN, E.; GHONEIM, M. M.; ABDELMOHSEN, U. R. (2021): An In Vitro and In Silico Study of the Enhanced Antiproliferative and Pro-Oxidant Potential of *Olea europaea* L. cv. Arbosana Leaf Extract via Elastic Nanovesicles (Spanlastics). *Antioxidants* **10**, 1860
- ALTUN, Z. F.; HALL, D. H. (2009): Introduction. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.1
- AN, J. H.; BLACKWELL, T. K. (2003): SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes & Development* **17**, 1882-1893
- ANDORFER, C.; KRESS, Y.; ESPINOZA, M.; DE SILVA, R.; TUCKER, K. L.; BARDE, Y.-A.; DUFF, K.; DAVIES, P. (2003): Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *Journal of Neurochemistry* **86**, 582-590
- ARUNSUNDAR, M.; SHANMUGARAJAN, T. S.; RAVICHANDRAN, V. (2015): 3,4-Dihydroxyphenylethanol Attenuates Spatio-Cognitive Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model: Modulation of the Molecular Signals in Neuronal Survival-Apoptotic Programs. *Neurotoxicity Research* **27**, 143-155
- ATTAWISH, A.; CHIVAPAT, S.; PHADUNGPAT, S.; BANSIDDHI, J.; TECHADAMRONGSIN, Y.; MITRIJIT, O.; CHAORAI, B.; CHAVALITTUMRONG, P. (2004): Chronic toxicity of *Gynostemma pentaphyllum*. *Fitoterapia* **75** (6), 539-551
- BAKIREL, T.; BAKIREL, U.; KELES, O. Ü.; ÜLGEN, S. G.; YARDIBI, H. (2008): In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* **116**, 67-73
- BANY, I. A.; DONG, M.-Q.; KOELLE, M. R. (2003): Genetic and Cellular Basis for Acetylcholine Inhibition of *Caenorhabditis elegans* Egg-Laying Behavior. *The Journal of Neuroscience* **23** (22), 8060-8069
- BASS, D. A.; PARCE, J. W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; THOMAS, M. (1983): Flow cytometric of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *The Journal of Immunology* **130** (4), 1910-1917

- BATARSEH, Y. S.; BHARATE, S. S.; KUMAR, V.; KUMAR, A.; VISHWAKARMA, R. A.; BHARATE, S. B.; KADDOUMI, A. (2017): Crocus sativus Extract Tightens the Blood-Brain Barrier, Reduces Amyloid  $\beta$  Load and Related Toxicity in 5XFAD Mice. *ACS Chemical Neuroscience* **8** (8), 1756-1766
- BAUSADA, G. M.; DE SOUSA, B. L.; FURLANI, G.; AGRIZZI, A. P.; FERREIRA, P. G.; LEITE, J. P. V.; MENDES, T. A. DE O.; VAREJAO, E. V. V.; PILAU, E. J.; DOS SANTOS, M. H. (2020): Tyrosol 1,2,3-triazoleanalogues as new acetylcholinesterase (AChE) inhibitors. *Computational Biology and Chemistry* **88**, 107359
- BAZOTI, F. N.; BERGQUIST, J.; MARKIDES, K.; TSARBOPOULOS, A. (2008): Localization of the Noncovalent Binding Site Between Amyloid- $\beta$ -Peptide and Oleuropein Using Electrospray Ionization FT-ICR Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **19**, 1078-1085
- BECHER, M. W.; KOTZUK, J. A.; SHARP, A. H.; DAVIES, S. W.; BATES, G. P.; PRICE, D. L.; ROSS, C. A. (1998): Intranuclear Neuronal Inclusions in Huntington's Disease and Dentatorubral and Pallidoluysian Atrophy: Correlation between the Density of Inclusions and IT15 CAG Triplet Repeat Length. *Neurobiology of Diseases* **4**, 387-397
- BEGINES, P.; BIEDERMANN, D.; VALENTOVÁ, K.; PETRÁSKOVÁ, L.; PELANTOVÁ, H.; MAYA, I.; FERNÁNDEZ-BOLANOS, J. G.; KREN, V. (2019): Chemoenzymatic Synthesis and Radical Scavenging of Sulfated Hydroxytyrosol, Tyrosol, Acetylated Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **67**, 7281-7288
- BENBOW, S. J.; STROVAS, T. J.; DARVAS, M.; SAXTON, A.; KRAEMER, B. C. (2020): Synergistic toxicity between tau and amyloid drives neuronal dysfunction and neurodegeneration in transgenic *C. elegans*. *Human Molecular Genetics* **29** (3), 495-505
- BENINCASA, C.; SANTORO, I.; NARDI, M.; CASSANO, A.; SINDONA, G. (2019): Eco-Friendly Extraction and Characterisation of Nutraceuticals from Olive Leaves. *Molecules* **24**, 3481
- BETARBET, R.; SHERER, T. B.; MACKENZIE, G.; GARCIA-OSUNA, M.; PANOV, A. V.; GERRNAMYRE, J. T. (2000): Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience* **3** (12), 1301-1306
- BHATT, R.; SINGH, D.; PRAKASH, A.; MISHRA, N. (2014): Development, characterization and nasal delivery of rosmarinic acid-loaded solid lipid nanoparticles for the effective management of Huntington's disease. *Drug Delivery* **22** (7), 931-939
- BICKEL, U.; THOMSEN, T.; WEBER, W.; FISCHER, J. P.; BACHUS, R.; NITZ, M.; KEWITZ, H. (1991): Pharmacokinetics of galanthamine in humans and corresponding cholinesterase inhibition. *Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **50** (4), 420-428
- BONURA, A.; VLAH, S.; LONGO, A.; BULATI, M.; MELIS, M. R.; CIBELLA, F.; COLOMBO, P. (2016): Hydroxytyrosol mediates Par j 1-induced IL-10 production by PBMCs in healthy subjects. *Immunobiology* **221**, 1374-1377
- BRANDT, R.; GERGOU, A.; WACKER, I.; FATH, T.; HUTTER, H. (2009): A *Caenorhabditis elegans* model of tau hyperphosphorylation: Induction of developmental defects by transgenic overexpression of Alzheimer's disease-like modified tau. *Neurobiology of Aging* **30**, 22-33
- BRENNER, S. (1974): The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94

- BRIEGER, K.; SCHIAVONE, S.; MILLER, F. J.; KRAUSE, K.-H. (2012): Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly* **142**, w13659
- BRUNETTI, G.; DI ROSA, G.; SCUTO, M.; LERI, M.; STEFANI, M.; SCHMITZ-LINNEWEBER, C.; CALABRESE, V.; SAUL, N. (2020): Healthspan Maintenance and Prevention of Parkinson's-like Phenotypes with Hydroxytyrosol and Oleuropein Aglycone in *C. elegans*. *International Journal of Molecular Sciences* **21** (2588)
- BÜCHTER, C.; ZHAO, L.; HAVERMANN, S.; HONNEN, S.; FRITZ, G.; PROKSCH, P.; WÄTJEN, W. (2015): TSG (2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside) from the Chinese Herb *Polygonum multiflorum* Increases Life Span and Stress Resistance of *Caenorhabditis elegans*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**, 124357
- BYERLY, L.; CASSADA, R. C.; RUSSELL, R. L. (1976): The Life Cycle of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **51**, 23-33
- CABA, I. C.; STEFANESCU, R.; TAMBA, B. I. (2021): Observation of Intact and Proteolytically Cleaved Amyloid-Beta (1-40)-Oleuropein Noncovalent Complex at Neutral pH by Mass Spectrometry. *Molecules* **26**, 3261
- CANUELO, A.; GILBERT-LÓPEZ, B.; PACHECO-LINÁN, P.; MARTÍNEZ-LARA, E.; SILES, E.; MIRANDA-VIZUETE, A. (2012): Tyrosol, a main phenol present in extra virgin olive oil, increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Aging and Development* **133**, 563-574
- CANUELO, A.; PERAGÓN, J. (2013): Proteomics analysis in *Caenorhabditis elegans* to elucidate the response induced by tyrosol, an olive phenol that stimulates longevity and stress resistance. *Proteomics* **13**, 3064-3075
- CAO, P.; YUAN, Y.; PEHEK, E. A.; MOISE, A. R.; HUANG, Y.; PALCZEWSKI, K.; FENG, Z. (2010): Alpha-Synuclein Disrupted Dopamine Homeostasis Leads to Dopaminergic Neuron Degeneration in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* **5** (2), e9312
- CAUDLE, W. M.; RICHARDSON, J. R.; WANG, M. Z.; TAYLOR, T. N.; GUILLOT, T. S.; MCCORMACK, A. L.; COLEBROOKE, R. E.; DI MONTE, D. A.; EMSON, P. C.; MILLER, G. W. (2007): Reduced Vesicular Storage of Dopamine Causes Progressive Nigrostriatal Neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience* **27** (30), 8138-8148
- C. elegans* Sequencing Consortium (1998): Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-2018
- CHASE, D. L.; PEPPER, J. S.; KOELLE, M. R. (2004): Mechanism of extrasynaptic dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Neuroscience* **7** (10), 1096-1103
- CHEN, Y.; WANG, M.; ROSEN, R. T.; HO, C.-T. (1999): 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical-Scavenging Active Components from *Polygonum multiflorum* Thunb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 2226-2228
- CHEN, J.; YAN, A. L.; LAM, K. Y. C.; LAM, C. T. W.; LI, N.; YAO, P.; XIONG, A.; DONG, T. T. X.; TSIM, K. W. K. (2014): A Chemically Standardized Extract of *Ziziphus jujuba* Fruit (Jujube) Stimulates Expressions of Neurotrophic Factors and Anti-oxidant Enzymes in Cultured Astrocytes. *Phytotherapy Research* **28**, 1727-1730
- CHEN, J.; LAM, C. T. W.; LI, Z.; YAO, P.; LIN, H.; DONG, T. T. X.; TSIM, K. W. K. (2016): Extract of *Ziziphus jujuba* Fruit (Jujube) Stimulates Expression of Enzymes Responsible for Heme Recycle via Anti-oxidant Response Element in Cultured Murine Macrophages. *Phytotherapy Research* **30**, 267-271

- CHEON, S.-M.; JANG, I.; LEE, M.-H.; KIM, D. K.; JEON, H.; CHA, D. S. (2017): *Sorbus alnifolia* protects dopaminergic neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmaceutical Biology* **55** (1), 481-486
- CHIRANTHANUT, N.; TEEKACHUNHATEAN, S.; PANTHONG, A.; KHONSUNG, P.; KAJANAPOTHI, D.; LERTPRASERTSUK, N. (2013): Toxicity evaluation of standardized extract of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Journal of Ethnopharmacology* **149** (1), 228-234
- CHOI, H. S.; PARK, M. S.; KIM, S. H.; HWANG, B. Y.; LEE, C. K.; LEE, M. K. (2010): Neuroprotective Effects of Herbal Ethanol Extracts from *Gynostemma pentaphyllum* in the 6-Hydroxydopamine-Lesioned Rat Model of Parkinson's Disease. *Molecules* **15** (4), 2814-2824
- CHOI, S.-H.; AHN, J.-B.; KOZUKUE, N.; LEVIN, C. E.; FRIEDMAN, M. (2011): Distribution of Free Amino Acids, Flavonoids, Total Phenolics, and Antioxidative Activities of Jujube (*Ziziphus jujuba*) Fruits and Seeds Harvested from Plants Grown in Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 6594-6604
- CLÁUDIO, A. F. M.; COGNIGNI, A.; DE FARIA, E. L. P.; SILVESTRE, A. J. D.; ZIRBS, R.; FREIRE, M. G.; BICA, K. (2018): Valorization of olive tree leaves: Extraction of oleanolic acid using aqueous solutions of surface-active ionic liquids. *Separation and Purification Technologies* **204**, 30-37
- COCHEMÉ, H. M.; MURPHY, M. P. (2007): Complex I is the Major Site of Mitochondrial Superoxide Production by Paraquat. *Journal of Biological Chemistry* **283** (4), 1786-1798
- COHEN, E.; BIESCHKE, J.; PERCIAVALLE, R. M.; KELLY, J. W.; DILLIN, A. (2006): Opposing Activities Protect Against Age-Onset Proteotoxicity. *Science* **313**, 1604-1610
- COHEN, E.; PAULSSON, J. F.; BLINDER, P.; BURSTYN-COHEN, T.; DU, D.; ESTEPA, G.; ADAME, A.; PHAM, H. M.; HOLZBERGER, M.; KELLY, J. W.; MASLIAH, E.; DILLIN, A. (2009): Reduced IGF-1 Signaling Delays Age-associated Proteotoxicity in Mice. *Cell* **139** (6), 1157-1169
- CORDEIRO, L. M.; MACHADO, M. L.; DA SILVA, A. S.; BAPTISTA, F. B. O.; DA SILVEIRA, T. L.; SOARES, F. A. A.; ARANTES, L. P. (2020): Rutin protects Huntington's disease through the insulin/IGF1 (IIS) signaling pathway and autophagy activity: Study in *Caenorhabditis elegans* model. *Food and Chemical Toxicology* **141**, 111323
- CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. (2015): A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **200**, 387-407
- DAIGLE, I.; LI, C. (1993): *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human  $\beta$ -amyloid protein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 12045-12049
- DANYSZ, W.; PARSONS, C. G.; MÖBIUS, H.-J.; STÖFFLER, A.; QUACK, G. (2000): Neuroprotective and Symptomatological Action of Memantine Relevant for Alzheimer's Disease – A Unified Glutamatergic Hypothesis on the Mechanism of Action. *Neurotoxicity Research* **2**, 85-97
- DAR, N. J.; AHMAD, M. (2020): Neurodegenerative diseases and *Withania somnifera* (L.): An update. *Journal of Ethnopharmacology* **256**, 112769
- DE BOCK, M.; DERRAIK, J. G. B.; BRENNAN, C. M.; BIGGS, J. B.; MORGAN, P. E.; HODGKINSON, S. C.; HOFMAN, P. L.; CUTFIELD, W. S. (2013): Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Polyphenols Improve Insulin Sensitivity in Middle-Aged Overweight Men: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *PLOS ONE* **8** (3), e57622

- DE OLIVEIRA, M. R.; FERREIRA, G. C.; SCHUCK, P. F. (2016): Protective effect of carnosic acid against paraquat-induced redox impairment and mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y cells: Role for PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *Toxicology in Vitro* **32**, 41-54
- DE OLIVEIRA, J. R.; CAMARGO, S. E. A.; DE OLIVEIRA, L. D. (2019): *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *Journal of Biomedical Science* **26** (5)
- DE TORRE, M. P.; CAVERO, R. Y.; CALVO, M. I.; VIZMANOS, J. L. (2019): A Simple and a Reliable Method to Quantify Antioxidant Activity In Vivo. *Antioxidants* **8** (142)
- DIFONZO, G.; SQUEO, G.; PASQUALONE, A.; SUMMO, C.; PARADISO, V. M.; CAPONIO, F. (2020): The challenge of exploiting polyphenols from olive leaves: addition to foods to improve their shelf-life and nutritional value. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **101**, 3099-3116
- DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TALALAY, P. (2008): Direkt and indirekt antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Molecular Nutrition and Food Research* **52**, 128-138
- DI ROSA, G.; BRUNETTI, G.; SCUTO, M.; SILANARO, A. T.; CALABRESE, E. J.; CREA, R.; SCHMITZ- LINNEWEBER, C.; CALABRESE, V.; SAUL, N. (2020): Healthspan Enhancement by Olive Polyphenols in *C. elegans* Wild Type and Parkinson's Models. *International Journal of Molecular Sciences* **21** (3893)
- DJEUZONG, E.; KANDEDA, A. K.; DJIOGUE, S.; LEWALE, S.; NGUEDIA, D.; NGUEGUIM, F.; DJIENTCHEU, J. P.; KOUAMOUO, J.; DIMO, T. (2021): Antiamnesic and Neuroprotective Effects of an Aqueous Extract of *Ziziphus jujuba* Mill. (Rhamnaceae) on Scopolamine-Induced Cognitive Impairments in Rats. *Hindawi, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2021**, 5577163
- DODSON, P. D.; DREYER, J. K.; JENNINGS, K. A.; SYED, E. C. J.; WADE-MARTINS, R.; CRAGG, S. J.; BOLAM, J. P.; MAGILL, P. J. (2016): Representation of spontaneous movement by dopaminergic neurons is cell-type selective and disrupted in parkinsonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **E2180-E2188**
- DOHERTY, C. P. A.; ULAMEC, S. M.; MAYA-MARTINEZ, R.; GOOD, S. C.; MAKEPEACE, J.; KHAN, G. N.; VAN OOSTEN-HAWLE, P.; RADFORD, S. E.; BROCKWELL, D. J. (2020): A short motif in the N-terminal region of  $\alpha$ -Synuclein is critical for both aggregation and function. *Nature structural & molecular biology* **27**, 249-259
- DONG, N.; DONG, Z.; CHEN, Y.; GU, X. (2020): Crocetin Alleviates Inflammation in MPTP-Induced Parkinson's Disease Models through Improving Mitochondrial Functions. *Hindawi, Parkinson's Disease* **2020**, 9864370
- DRAKE, J.; LINK, C. D.; BUTTERFIELD, A. A. (2003): Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid  $\beta$ -peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiology of Aging* **24**, 415-420
- DUERR, J. S.; GASKIN, J.; RAND, J. B. (2001): Identified neurons in *C. elegans* coexpress vesicular transporters for acetylcholine and monoamines. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* **280**, C1616-C1622
- EBLY, E. M.; PARHAD, I. M.; HOGAN, D. B.; FUNG, T. S. (1994): Prevalence and types of dementia in the very old: Results from the Canadian Study of Health and Aging. *American Academy of Neurology* **44** (9)
- EL-HORANY, H. E.; EL-LATIF, R. N. A.; ELBATSH, M. M.; EMAM, M. N. (2016): Ameliorative Effect of Quercetin on Neurochemical and Behavioral Deficits in Rotenone Rat Model

- of Parkinson's Disease: Modulating Autophagy (Quercetin on Experimental Parkinson's Disease). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **30** (7), 360-369
- ELMAZOGLU, Z.; ERGIN, V.; SAHIN, E.; KAYHAN, H.; KARASU, C. (2017): Oleuropein and rutin protect against 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells through modulation of mitochondrial function and unfolded protein response. *Interdisciplinary Toxicology* **10** (4), 129-141
- ELMAZOGLU, Z.; GALVÁN-ARZANTE, S.; ASCHNER, M.; RANGEL-LÓPEZ, E.; BAYRAKTAR, O.; SANTAMARÍA, A.; KARASU, C. (2021): Redox-active phytoconstituents ameliorate cell damage and inflammation in rat hippocampal neurons exposed to hyperglycemia+A $\beta_{1-42}$  peptide. *Neurochemistry International* **145**, 104993
- ENZ, A.; BODDEKE, H.; GRAY, J.; SPIEGEL, R. (1991): Pharmacologic and clinicopharmacologic properties of SDZ ENA 713, a centrally selective acetylcholinesterase inhibitor. *Annals of the New York Academy of Sciences* **640**, 272-275
- FABER, P. W.; ALTER, J. R.; MACDONALD, M. E.; HART, A. C. (1999): Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 179-184
- FARINA, F.; LAMBERT, E.; COMMEAU, L.; LEJEUNE, F.-X.; ROUDIER, N.; FONTE, C.; PARKER, J. A.; BODDAERT, J.; VERNY, M.; BAULIEU, E.-E.; NERI, C. (2017): The stress response factor *daf-16*/FOXO is required for multiple compound families to prolong the function of neurons with Huntington's disease. *Scientific Reports* **7**, 4014
- FEDYAEVA, A. V.; STEPANOV, A. V.; LYUBUSHKINA, I. V.; POBEZHIMOVA, T. P.; RIKHVANOV, E. G. (2014): Heat Shock Induces Production of Reactive Oxygen Species and Increases Inner Mitochondrial Membrane Potential in Winter Wheat Cells. *Biochemistry* **79** (11), 1202-1210
- FENG, S.; ZHANG, C.; CHEN, T.; ZHOU, L.; HUANG, Y.; YUAN, M.; LI, T.; DING, C. (2021): Oleuropein Enhances Stress Resistance and Extends Lifespan via Insulin/IGF-1 and SKN-1/Nrf2 Signaling Pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants* **10**, 1697
- FREINBICHLER, W.; MISINI, B.; COLIVICCHI, M. A.; LINERT, W.; TIPTON, K. F.; DELLA CORTE, L. (2020): The application of bathophenanthroline for the determination of free iron in parallel with hROS in microdialysis samples. *Journal of Neuroscience Methods* **331**
- GAO, D.; ZHAO, M.; QI, X.; LIU, Y.; LI, N.; LIU, Z.; BIAN, Y. (2016): Hypoglycaemic effect of *Gynostemma pentaphyllum* saponins by enhancing the Nrf2 signaling pathway in STZ-inducing diabetic rats. *Archives of Pharmacal Research* **39**, 221-230
- GARCIA-MORENO, J. C.; PORTA DE LA RIVA, M.; MARTÍNEZ-LARA, E.; SILES, E.; CANUELO, A. (2019): Tyrosol, a simple phenol from EVOO, targets multiple pathogenic mechanisms of neurodegeneration in a *C. elegans* model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* **82**, 60-68
- GALLREIN, C.; IBURG, M.; MICHELBERGER, T.; KOCAK, A.; PUCHKOV, D.; LIU, F.; MARISCAL, S. M. A.; NAYAK, T.; KAMINSKI SCHIERLE, G. S.; KIRSTEIN, J. (2021): Novel amyloid-beta pathology *C. elegans* model reveals distinct neurons as seeds of pathogenicity. *Progress in Neurobiology* **189**, 101907

- GEA-GONZÁLEZ, A.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, S.; HENAREJOS-ESCUADERO, P.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, P.; GARCÍA-CARMONA, F.; GANDÍA-HERRERO, F. (2022): Polyphenols from traditional Chinese medicine and Mediterranean diet are effective against A $\beta$  toxicity *in vitro* and *in vivo* in *Caenorhabditis elegans*. *Food and Function*, DOI: 10.1039/d1fo02147h
- GEROMICHALOS, G. D.; LAMARI, F. N.; PAPANDREOU, M. A.; TRAFALIS, D. T.; MARGARITY, M.; PAPAGEORGIOU, A.; SINAKOS, Z. (2012): Saffron as a Source of Novel Acetylcholinesterase Inhibitors: Molecular Docking and *in Vitro* Enzymatic Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 6131-6138
- GHIMIRE, S.; KIM, M. S. (2017): Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit feeding extends lifespan and increases tolerance to environmental stresses by regulating aging-associated gene expression in *Drosophila*. *Biogerontology* **18**, 263-273
- GOLDSTEIN, D. S.; JINSMAA, Y.; SULLIVAN, P.; HOLMES, C.; KOPIN, I. J.; SHARABI, Y. (2016): 3,4-Dihydroxyphenylethanol (Hydroxytyrosol) Mitigates the Increase in Spontaneous Oxidation of Dopamine during Monoamine Oxidase Inhibition in PC12 Cells. *Neurochemical Research* **41** (9), 2173-2178
- GOOD, P. F.; WERNER, P.; HSU, A.; OLANOW, C. W.; PERL, D. P. (1996): Evidence for Neuronal Oxidative Damage in Alzheimer's Disease. *American Journal of Pathology* **149** (1), 21-28
- GOSWAMI, P.; BANERJEE, R.; MUKHERJEE, A. (2019): Potential antigenotoxicity assessment of *Ziziphus jujuba* fruit. *Heliyon* **5**, e01768
- GOURAS, G.K.; OLSSON, T. T.; HANSSON, O. (2015):  $\beta$ -amyloid Peptides and Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Neuritherapeutics* **12**, 3-11
- GUO, Y.; XIE, J.; LI, X.; YUAN, Y.; ZHANG, L.; HU, W.; LUO, H.; YU, H.; ZHANG, R. (2018): Antidepressant Effects of Rosemary Extracts Associate With Anti-inflammatory Effect and Rebalance of Gut Microbiota. *Frontiers in Pharmacology* **8** (1126)
- GUO, Q.; HE, J.; ZHANG, H.; YAO, L.; LI, H. (2020): Oleanolic acid alleviates oxidative stress in Alzheimer's disease by regulating stanniocalcin-1 and uncoupling protein-2 signalling. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **47**, 1263-1271
- HAERI, P.; MOHAMMADIPOUR, A.; HEIDARI, Z.; EBRAHIMZADEH-BIDESKAN, A. (2019): Neuroprotective effect of crocin on substantia nigra in MPTP-induced Parkinson's disease model of mice. *Anatomical Science International* **94**, 119-127
- HAMPEL, H.; MESULAM, M.-M.; CUELLO, A. C.; KHACHATURIAN, A. S.; VERGALLO, A.; FARLOW, M. R.; SNYDER, P. J.; GIACOBINI, E.; KHACHATURIAN, Z. S. (2019): Revisiting the Cholinergic Hypothesis in Alzheimer's Disease: Emerging Evidence from Translational and Clinical Research. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* **6** (1), 2-15
- HANDS, S.; SAJJAD, M. U.; NEWTON, M. J.; WYTTEBACH, A. (2011): *In Vitro* and *In Vivo* Aggregation of a Fragment of Huntingtin Protein Directly Causes Free Radical Production. *The Journal of Biological Chemistry* **286** (52), 44512-44520
- HANUMANTHAPPA, P.; ASHOK, A.; PRAKASH, I.; PRIYA, C. I.; ZINZALA, J.; MARIGOWDA, V. V.; SOSALEGOWDA, A. H. (2020): *In silico* and *In vivo* Evaluation of Oxidative Stress Inhibitors Against Parkinson's Disease using the *C. elegans* Model. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* **23**, 814-826
- HAQUE, R.; SHAMSUZZAMA; KUMAR, L.; SHARMA, T.; FATIMA, S.; JADIYA, P.; SIDDIQI, M. I.; NAZIR, A. (2020): Human insulin modulates  $\alpha$ -synuclein aggregation via DAF-2/

- DAF-16 signalling pathway by antagonising DAF-2 receptor in *C. elegans* model of Parkinson's disease. *Oncotarget* **11** (6), 634-649
- HE, H.; WANG, S.; TIAN, J.; CHEN, L.; ZHANG, W.; ZHAO, J.; TANG, H.; ZHANG, X.; CHEN, J. (2015): Protective effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside in the MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: Involvement of reactive oxygen species-mediated JNK, P38 and mitochondrial pathways. *European Journal of Pharmacology* **767**, 175-182
- HENDERSON, S. T.; JOHNSON, T. E. (2001): *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* **11**, 1975-1980
- HUANG, W.; WANG, Y.; JIANG, X.; SUN, Y.; ZHAO, Z.; LI, S. (2017): Protective Effect of Flavonoids from *Ziziphus jujuba* cv. *Jinsixiaozao* against Acetaminophen-Induced Liver Injury by Inhibiting Oxidative Stress and Inflammation in Mice. *Molecules* **22** (1781)
- HUANG, C.; LIN, F.; WANG, G.; LU, D.; WU, Q.; LIU, J.; SHI, J.; ZHANG, F. (2018): Tetrahydroxystilbene Glucoside Produces Neuroprotection against 6-OHDA-Induced Dopamine Toxicity. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 7927568
- HULME, S. E.; WHITESIDES, G. M. (2011): Die Chemie und der Wurm. *Angewandte Chemie* **123**, 4870-4906
- HUNTINGTON, G. (1872): On Chorea. *The Medical and Surgical Reporter: A Weekly Journal* **26** (15), 317-321
- HUYEN, V. T. T.; PHAN, D. V.; THANG, P.; HOA, N. K.; OSTENSON, C. G. (2010): Antidiabetic effect of *Gynostemma pentaphyllum* tea in randomly assigned type 2 diabetic patients. *Hormone and Metabolic Research* **42** (5), 353-357
- HUYEN, V. T. T.; PHAN, D. V.; THANG, P.; HOA, N. K.; OSTENSON, C. G. (2012): Antidiabetic Effects of Add-on *Gynostemma pentaphyllum* Extract Therapy with Sulfonylureas in Type 2 Diabetic Patients. *Hindawi, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**, 452313
- IBRAKAW, A. S.; OMORUYI, S. I.; EPKO, O. E.; HUSSEIN, A. A. (2020): Neuroprotective Activities of *Boophone haemanthoides* (Amaryllidaceae) Extract and Its Chemical Constituents. *Molecules* **25**, 5376
- INOUE, E.; SUZUKI, T.; SHIMIZU, Y.; SUDO, K.; KAWASAKI, H.; ISHIDA, N. (2021): Saffron ameliorated motor symptoms, short life span and retinal degeneration in Parkinson's disease fly models. *Gene* **799**, 145811
- JANA, S.; SINHA, M.; CHANDA, D.; ROY, T.; BANERJEE, K.; MUNSHI, S.; PATRO, B. S.; CHAKRABARTI, S. (2011): Mitochondrial dysfunction mediated by quinone oxidation products of dopamine: Implications of dopamine cytotoxicity and pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1812**, 663-673
- JIANG, Z.; WANG, W.; GUO, C. (2017): Tetrahydroxy stilbene glucoside ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced human brain microvascular endothelial cell dysfunction *in vitro* by inhibiting oxidative stress and inflammatory responses. *Molecular Medicine Reports* **16**, 5219-5224
- JOHNSON, C. D.; RUSSELL, R. L. (1983): Multiple Molecular Forms of Acetylcholinesterase in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurochemistry* **41** (1), 30-46
- KAMPKÖTTER, A.; NKWONKAM, C. G.; ZURAWSKI, R. F.; TIMPEL, C.; CHOVOLOU, Y.; WÄTJEN, W.; KAHL, R. (2007): Investigations of protective effects of the flavonoids

- quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology* **234**, 113-123
- KAPLAN, J. M.; HORVITZ, H. R. (1993): A dual mechanosensory and chemosensory neuron in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 2227-2231
- KIANBAKHT, S.; GHAZAVI, A. (2011): Immunomodulatory Effects of Saffron: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *Phytotherapy Research* **25**, 1801-1805
- KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; CHOI, J. S.; CHOI, S. U.; KIM, Y. S.; LEE, K. R.; KIM, Y.-K.; RYU, S. Y. (2008): A New Stilbene Glucoside Gallate from the Roots of *Polygonum multiflorum*. *Archives of Pharmacal Research* **31** (10), 1225-1229
- KIM, J.-S.; HUANG, T. Y.; BOKOCH, G. M. (2009): Reactive Oxygen Species Regulate a Slingshot-Cofilin Activation Pathway. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 2650-2660
- KHAN, M. N.; HAQ, F. U.; RAHMAN, S.; ALI, A.; MUSHARRAF, S. G. (2020): Metabolite distribution and correlation studies of *Ziziphus jujuba* and *Ziziphus nummularia* using LC-ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **178**, 112918
- Klinik für Neurologie und Neurophysiologie, Universitätsklinikum Freiburg (16.12.2021): <https://www.uniklinik-freiburg.de/neurologie/behandlung/bewegungsstoerungen/chorea-huntington.html>
- KNIGHT, A. L.; YAN, X.; HAMAMICHI, S.; AJJURI, R. R.; MAZZULLI, J. R.; ZHANG, M. W.; DAIGLE, J. G.; ZHANG, S.; BOROM, A. R.; ROBERTS, L. R.; LEE, S. K.; DELEON, S. M.; VIOLLET-DJELASSI, C.; KRAINC, D.; O'DONNELL, J. M.; CALDWELL, K. A.; CALDWELL, G. A. (2014): The glycolytic enzyme, GPI-1, is a functionally conserved modifier of dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's models. *Cell Metabolism* **20** (1), 145-157
- KOSTOMOIRI, M.; FRAGKOULI, A.; SAGNOU, M.; SKALTSOUNIS, L. A.; PELECANOU, M.; TSILIBARY, E. C.; TZINIA, A. K. (2013): Oleuropein, an Anti-oxidant Polyphenol Constituent of Olive Promotes  $\alpha$ -Secretase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein (A $\beta$ PP). *Cellular and Molecular Neurobiology* **33**, 147-154
- LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N.; ODDO, S. (2007): Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* **8**, 499-509
- LAKOWSKI, B.; HEKIMI, S. (1998): The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 13091-13096
- LAKSO, M.; VERTIAINEN, S.; MOILANEN, A.-M.; SIRVIÖ, J.; THOMAS, J. H.; NASS, R.; BLAKELY, R. D.; WONG, G. (2003): Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human  $\alpha$ -synuclein. *Journal of Neurochemistry* **86**, 165-172
- LEE, A. L.; UNG, H. M.; SANDS, L. P.; KIKIS, E. A. (2017): A new *Caenorhabditis elegans* model of human huntingtin 513 aggregation and toxicity in body wall muscles. *PLoS ONE* **12** (3): e0173644
- LERI, M.; NATALELLO, A.; BRUZZONE, E.; STEFANI, M.; BUCCIANTINI, M. (2019): Oleuropein aglycone and hydroxytyrosol interfere differently with toxic A $\beta$ <sub>1-42</sub> aggregation. *Food and Chemical Toxicology* **129**, 1-12
- LI, L.; JIAO, L.-P.; LAU, B. H. S. (1993): Protective Effect of Gypenosides Against Oxidative Stress in Phagocytes, Vascular Endothelial Cells and Liver Microsomes. *Cancer Biotherapy* **8** (3), 263-272

- LI, X.; MATSUMOTO, K.; MURAKAMI, Y.; TEZUKA, Y.; WU, Y.; KADOTA, S. (2005): Neuroprotective effects of *Polygonum multiflorum* on nigrostriatal dopaminergic degeneration induced by paraquat and maneb in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **82**, 345-352
- LI, Y.-X.; GONG, X.-H.; LIU, M.-C.; PENG, C.; WANG, Y.-T. (2017): A New Strategy for Quality Evaluation and Identification of Representative Chemical Components in *Polygonum multiflorum* Thunb. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2017**, 6238464
- LI, K.; MA, C.; LI, H.; DEV, S.; HE, JF.; QU, X. (2019): Medical Value and Potential Therapeutic Mechanisms of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino and its derivatives: An Overview. *Current Topics in Medical Chemistry* **19**, 2855-2867
- LIN, K.; HSIN, H.; LIBINA, N.; KENYON, C. (2001): Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nature Genetics* **28**, 139-145
- LIN, C.; ZHANG, X.; XIAO, J.; ZHONG, Q.; KUANG, J.; CAO, Y.; CHEN, Y. (2019): Effects on longevity extension and mechanism of action of carnosic acid in *Caenorhabditis elegans*. *Food and Function* **10**, 1398-1410
- LIN, K.; SZE, S. C.-W.; LIU, B.; ZHANG, Z.; ZHANG, Z.; ZHU, P.; WANG, Y.; DENG, Q.; YUNG, K. K.-L.; ZHANG, S. (2021): 20(S)-protopanaxadiol and oleanolic acid ameliorate cognitive deficits in APP/PS1 transgenic mice by enhancing hippocampal neurogenesis. *Journal of Ginseng Research* **45**, 325-333
- LINK, C. D. (1995): Expression of human  $\beta$ -amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 9368-9372
- LINK, C. D.; TAFT, A.; KAPULKIN, V.; DUKE, K.; KIM, S.; FEI, Q.; WOOD, D. E.; SAHAGAN, B. G. (2003): Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. *Neurobiology of Aging* **24**, 397-413
- LINTS, R.; EMMONS, S. W. (1999): Patterning of dopaminergic neurotransmitter identity among *Caenorhabditis elegans* ray sensory neurons by a TGF $\beta$  family signaling pathway and a *Hox* gene. *Development* **126**, 5819-5831
- LIU, Z.; ZHAO, X.; LIU, B.; LIU, A.-J.; LI, H.; MAO, X.; WU, B.; BI, K.-S.; JIA, Y. (2014): Jujuboside A, a neuroprotective agent from semen *Ziziphi Spinosae* ameliorates behavioraql disorders of the dementia mouse model induced by A $\beta$ <sub>1-42</sub>. *European Journal of Pharmacology* **738**, 206-213
- LIU, Q. F.; LEE, J. H.; KIM, Y.-M.; LEE, S.; HONG, Y. K.; HWANG, S.; OH, Y.; LEE, K.; YUN, H. S.; LEE, I.-S.; JEON, S.; CHIN, Y.-W.; KOO, B.-S.; CHO, K. S. (2015): *In Vivo* Screening of Traditional Medicinal Plants for Neuroprotective Activity against A $\beta$ <sub>42</sub> Cytotoxicity by using *Drosophila* models of Alzheimer's Disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **38**, 1891-1901
- LIU, J.; SU, H.; QU, Q.-M. (2016): Carnosic Acid Prevents Beta-Amyloid-Induced Injury in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells via the Induction of Autophagy. *Neurochemical Research* **41**, 2311-2323
- LIU, J.; LI, Y.; YANG, P.; WAN, J.; CHANG, Q.; WANG, T. T. Y.; LU, W.; ZHANG, Y.; WANG, Q.; YU, L. (2017): Gypenosides Reduced the Risk of Overweight and Insuline Resistance in C57BL/6JMice through Modulating Adipose Thermogenesis and Gut Microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**, 9237-9246

- LIU, D.; JIN, X.; YU, G.; WANG, M.; LIU, L.; ZHANG, W.; WU, J.; WANG, F.; YANG, J.; LUO, Q.; CAI, L.; YANG, X.; KE, X.; QU, Y.; XU, Z.; JIA, L.; CHEN, W.-L. (2021): Oleanolic acid blocks the purine salvage pathway for cancer therapy by inactivating SOD1 and stimulating lysosomal proteolysis. *Molecular Therapy: Oncolytics* **23**, 107-123
- LU, Y.; BAU, T.; MO, J.; NI, J.; CHEN, W. (2021): Research advances in bioactive components and health benefits of jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine and Biotechnology)* **22 (6)**, 431-449
- LUO, S.; JIANG, X.; JIA, L.; TAN, C.; LI, M.; YANG, Q.; DU, Y.; DING, C. (2019): In Vivo and In Vitro Antioxidant Activities of Methanol Extracts from Olive Leaves on *Caenorhabditis elegans*. *Molecules* **24 (704)**
- LV, L.; CHENG, Y.; ZHENG, T.; LI, X.; ZHAI, R. (2014): Purification, antioxidant activity and antiglycation of polysaccharides from *Polygonum multiflorum* Thunb. *Carbohydrate Polymers* **99**, 765-773
- MABANDLA, M. S.; NYOKA, M.; DANIELS, W. M. U. (2015): Early use of oleanolic acid provides protection against 6-hydroxidopamine induced dopamine neurodegeneration. *Brain Research* **1622**, 64-71
- MACDONALD, M. E.; AMBROSE, C. M.; DUYANO, M. P.; MYERS, R. H.; LIN, C.; LAKSHMI, S. et al. (1993): A Novel Gene Containing a Trinucleotide Repeat That Is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes. *Cell* **72**, 971-983
- MAMALO, R. V.; Silvestre, M. A.; BARBOSA, A. L. A.; MEDINA, P. M. (2017): Coconut (*Cocos nucifera*) Ethanolic Leaf Extract Reduces Amyloid- $\beta$  (1-42) Aggregation and Paralysis Prevalence in Transgenic *Caenorhabditis elegans* Independently of Free Radical Scavenging and Acetylcholinesterase Inhibition. *Biomedicines* **5 (17)**
- MANALO, R. V. M.; MEDINA, P. M. B. (2018): Caffeine Protects Dopaminergic Neurons From Dopamine-Induced Neurodegeneration via Synergistic Adenosine-Dopamine D<sup>+</sup>-Like Receptor Interactions in Transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Neuroscience* **12 (137)**
- MARTÍN, M. A.; RAMOS, S.; GRANADO-SERRANO, A. B.; RODRÍGUEZ-RAMIRO, I.; TRUJILLO, M.; BRAVO, L.; GOYA, L. (2010): Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxicant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Molecular Nutrition and Food Research* **54**, 956-966
- MARTÍN-VERTEDOR, D.; GARRIDO, M.; PARIENTE, J. A.; ESPINO, J.; DELGADO-ADÁMEZ, J. (2016): Bioavailability of Bioactive Molecules from Olive Leaf Extrats and its Functional Value. *Phytotherapy Research* **30**, 1172-1179
- MASOUDI, N.; IBANEZ-CRUCYRA, P.; OFFENBURGER, S.-L.; HOLMES, A.; GARTNER, A. (2014): Tetraspanin (TSP-17) Protects Dopaminergic Neurons against 6-OHDA-Induced Neurodegeneration in *C. elegans*. *PLoS Genetics* **10 (12)**, e1004767
- MAZIDI, M.; SHEMSHIAN, M.; MOUSAVI, S. H.; NOROUZY, A.; KERMANI, T.; MOGHIMAN, T.; SADEGHI, A.; MOKHBER, N.; GHAJOUR-MOBARHAN, M.; FERNS, G. A. A. (2016): A double-blind, randomized and placebo-controlled trial of Saffron (*Crocus sativus* L.) in the treatment of anxiety and depression. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* **13 (2)**, 195-199
- MCKAY, J. P.; RAIZEN, D. M.; GOTTSCHALK, A.; SCHAFER, W. R.; AVERY, L. (2004): *eat-2* and *eat-18* Are Required for Nicotinic Neurotransmission in the *Caenorhabditis elegans* Pharynx. *Genetics* **166**, 161-169

- MCMULLAN, R.; HILEY, E.; MORRISON, P.; NURRISH, S. J. (2005): Rho is a presynaptic activator of neurotransmitter release at pre-existing synapses in *C. elegans*. *Genes and Development* **20**, 65-76
- MENG, X.; WANG, M.; SUN, G.; YE, J.; ZHOU, Y.; DONG, X.; WANG, T.; LU, S.; SUN, X. (2014): Attenuation of A $\beta$ <sub>25-35</sub>-induced parallel autophagic and apoptotic cell death by gypenoside XVII through the estrogen receptor-dependent activation of Nrf2/ARE pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology* **279**, 63-75
- MENG, X.; LUO, Y.; LIANG, T.; WANG, M.; ZHAO, J.; SUN, G.; SUN, X. (2016): Gypenoside XVII Enhances Lysosome Biogenesis and Autophagy Flux and Accelerates Autophagic Clearance of Amyloid- $\beta$  through TFEB Activation. *Journal of Alzheimer's Disease* **52** (3), 1135-1150
- MIRZA, F. J.; AMBER, S.; SUMERA, HASSAN, D.; AHMED, T.; ZAHID, S. (2021): Rosmarinic acid and ursolic acid alleviate deficits in cognition, synaptic regulation and adult hippocampal neurogenesis in an A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induced mouse model of Alzheimer's disease. *Phytomedicine* **83**, 153490
- MOHANKUMAR, A.; SHANMUGAM, G.; KALAISELVI, D.; LEVENSON, C.; NIVITHA, S.; THIRUPPATHI, G.; SUNDARARAJ, P. (2018): East Indian sandalwood (*Santalum album* L.) oil confers neuroprotection and geroprotection in *Caenorhabditis elegans* via activating SKN-1/Nrf2 signaling pathway. *RSC Advances* **8** (59), 33753-33774
- MORLEY, J. F.; BRINGULL, H. R. WEYERS, J. J.; MORIMOTO, R. I. (2002): The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (16), 10417-10422
- MOSHIRI, M.; VAHABZADEH, M.; HOSSEINZADEH, H. (2014): Clinical Applications of Saffron (*Crocus sativus*) and its Constituents: A Review. *Drug Research* **65**, 287-295
- MOTAWEA, M. H.; ELMAKSOUD, H. A. A.; ELHARRIF, M. G.; DESOKY, A. A. E.; IBRAHIMI, A. (2020): Evaluation of Anti-inflammatory and Antioxidant Profile of Oleuropein in Experimentally Induced Ulcerative Colitis. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* **9** (3), 224-233
- MSIBI, Z. N. P.; MABANDLA, M. V. (2019): Oleanolic Acid Mitigates 6-Hydroxydopamine Neurotoxicity by Attenuating Intracellular ROS in PC12 Cells and Striatal Microglial Activation in Rat Brains. *Frontiers in Physiology* **10**, 1059
- MURPHY, C. T.; MCCARROLL, S. A.; BARGMANN, C. I.; FRASER, A.; KAMATH, R. S.; AHRINGER, J.; LI, H.; KENYON, C. (2003): Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424**, 277-284
- MYKHEILENKO, O.; PETRIKAITE, V.; KORINEK, M.; EL-SHAZLY, M.; CHEN, B.-H.; YEN, C.-H.; HSIEH, C.-F.; BEZRUK, I.; DABRISIUTE, A.; IVANAUSKAS, L.; GEORGIYANTS, V.; HWANG, T.-S. (2021): Bio-guided bioactive profiling and HPLC-DAD fingerprinting of Ukrainian saffron (*Crocus sativus* stigmas): moving from correlation toward causation. *BMC Complementary Medicine and Therapies* **21** (203)
- NAIA, L.; ROSENSTOCK, T. R.; OLIVEIRA, A. M.; OLIVEIRA-SOUSA, S. I.; CALDEIRA, G. L.; CARMO, C.; LACO, M. N.; HAYDEN, M. R.; OLIVEIRA, C. R.; REGO, A. C. (2017): Comparative Mitochondrial-Based Protective Effects of Resveratrol and Nicotinamide in Huntington's Disease Models. *Molecular Neurobiology* **54**, 5385-5399
- NARDIELLO, P.; PANTANO, D.; LAPUCCI, A.; STEFANI, M.; CASAMENTI, F. (2018): Diet Supplementation with Hydroxytyrosol Ameliorates Brain Pathology and Restores

- Cognitive Functions in a Mouse Model of Amyloid- $\beta$  Deposition. *Journal of Alzheimer's Disease* **63** (3), 1161-1172
- NASS, R.; HALL, D. H.; MILLER III, D. M.; BLAKELY, R. D. (2002): Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (5), 3264-3269
- NDLOVU, B. C.; DANIELS, W. M. U.; MABANDLA, M. V. (2016): Amelioration of L-Dopa-Associated Dyskinesias with Triterpenoic Acid in a Parkinsonian Rat Model. *Neurotoxicity Research* **29**, 126-134
- NEGGA, R.; STUART, J. A.; MACHEN, M. L.; SALVA, J.; LIZEK, A. J.; RICHARDSON, S. J.; OSBORNE, A. S.; MIRALLAS, O.; MCVEY, K. A.; FITSANAKIS, V. A. (2012): Exposure to Glyphosate- and/or Mn/Zn-Ethylene-bis-Dithiocarbamate-Containing Pesticides Leads to Degeneration of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid and Dopamine Neurons in *Caenorhabditid elegans*. *Neurotoxicity Research* **21** (3), 281-290
- OGG, S.; PARADIS, S.; GOTTLIEB, S.; PATTERSON, G. I.; LEE, L.; TISSENBAUM, H. A.; RUVKUN, G. (1997): The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* **389**, 994-999
- OLI, V.; GUPTA, R.; KUMAR, P. (2021): FOXO and related transcription factors binding elements in the regulation of neurodegenerative disorders. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **116**, 102012
- OLIVEIRA, R. P.; ABATE, J. P.; DILKS, K.; LANDIS, J.; ASHRAF, J.; MURPHY, C. T.; BLACKWELL, T. K. (2009): Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell* **8** (5), 534-541
- OMAR, S. H.; KERR, P. G.; SCOTT, C. J.; HAMLIN, A. S.; OBIED, H. K. (2017): Olive (*Olea europaea* L.) Biophenols: A Nutraceutical against Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells. *Molecules* **22**, 1858
- OMAR, S. H.; SCOTT, C. J.; HAMLIN, A. S.; OBIED, H. K. (2018): Biophenols: Enzymes ( $\beta$ -Secretase, Cholinesterases, histone deacetylase and tyrosinase) inhibitors from olive (*Olea europaea* L.). *Fitoterapia* **128**, 118-129
- OMAR, S. H.; SCOTT, C. J.; HAMLIN, A. S.; OBIED, H. K. (2019): Olive Biophenols Reduces Alzheimer's Pathology in SH-SY5Y Cells and APPswe Mice. *International Journal of Molecular sciences* **20**, 125
- OPPERMANN, C. H.; CHANG, S. (1990): Plant-parasitic Nematode Acetylcholinesterase Inhibition by Carbamate and Organophosphate Nematicides. *Journal of Nematology* **22** (4), 481-488
- ORDOUDI, S. A.; BEFANI, C. D.; NENADIS, N.; KOLIAKOS, G. G.; TSIMIDOU, M. Z. (2009): Further Examination of Antiradical Properties of *Crocus sativus* Stigmas Extract Rich in Crocins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 3080-3086
- OTT, A.; BRETELER, M. M. B.; VAN HARSCAMP, F.; CLAUS, J. J.; VAN DER CAMMEN, T. J. M.; GROBBEE, D. E.; HOFMAN, A. (1995): Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam Study. *British Medical Journal* **310**, 970-973
- OZAROWSKI, M.; MIKOLAJCZAK, P. L.; BOGACZ, A.; GRYSZCZYNSKA, A.; KUJAWSKA, M.; JODYNIS-LIEBERT, J.; PIASECKA, A.; NAPIECZYNSKA, H.; SCULC, M.; KUJAWSKI, R.; BARTKOWIAK-WIECZOREK, J.; COCHOCKA, J.; BOBKIEWICZ-KOZLOWSKA, T.; CZERNY, B.; MROZIKIEWICZ, P. M. (2013): *Rosmarinus officinalis* L. Leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia* **91**, 261-271

- PACELLI, C.; GIGUÈRE, N.; BOURQUE, M.-J.; LÉVESQUE, M.; SLACK, R. S.; TRUDEAU, L.-É. (2015): Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Current Biology* **25**, 2349-2360
- PAEK, J.; LO, J. Y.; NARASIMHAN, S. D.; NGUYEN, T. N.; GLOVER-CUTTER, K.; ROBIDA-STUBBS, S.; SUZUKI, T.; YAMAMOTO, M.; BLACKWELL, T. K.; CURRAN, S. P. (2012): Mitochondrial SKN-1/Nrf Mediates a Conserved Starvation Response. *Cell Metabolism* **16** (4), 526-537
- PAN, P.-K.; QIAO, L.-Y.; WEN, X.-N. (2016): Safranal prevents rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in an in vitro model of Parkinson's disease through regulating Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Cellular and Molecular Biology* **62** (14), 11-17
- PAPANDREOU, M. A.; KANAKIS, C. D.; POLISSIOU, M. G.; EFTHIMIOPOULOS, S.; CORDOPATIS, P.; MARGARITY, M.; LAMARI, F. N. (2006): Inhibitory Activity on Amyloid- $\beta$  Aggregation and Antioxidant Properties of *Crocus sativus* Stigmas Extract and Its Crocin Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8762-8768
- PARK, S.-K.; TEDESCO, P. M.; JOHNSON, T. E. (2009): Oxidative Stress and Longevity in *C. elegans* as Mediated by SKN-1. *Aging Cell* **8** (3), 258-269
- PARK, S. Y.; JIN M. L.; KANG, N. J.; PARK, G.; CHOI, Y. (2017): Anti-inflammatory effects of novel *polygonum multiflorum* compound via inhibiting NF- $\kappa$ B/MAPK and upregulating the Nrf2 pathways in LPS-stimulated microglia. *Neuroscience Letters* **651**, 43-51
- PARKER, J.A.; CONNOLLY, J. B.; WELLINGTON, C.; HAYDEN, M.; DAUSSET, J.; NERI, C. (2001): Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **98** (23), 13318-13323
- PARKER, J. A.; ARANGO, M.; ABDERRAHMANE, S.; LAMBERT, E.; TOURETTE, C.; CATOIRE, H.; NÉRI, C. (2005): Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nature Genetics* **37** (4), 349-350
- PASBAN-ALIBADI, H.; ESMAEILI-MAHANI, S.; SHEIBANI, V.; ABBASNEJAD, M.; MEHDIZADEH, A.; YAGHOUBI, M. M. (2013): Inhibition of 6-Hydroxydopamine-Induced PC12 Cell Apoptosis by Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract Is Performed by Its Main Component Oleuropein. *Rejuvenation Research* **16** (2)
- PENG, Y.; HOU, C.; YANG, Z.; LI, C.; JIA, L.; LIU, J.; TANG, Y.; SHI, L.; LI, Y.; LONG, J.; LIU, J. (2016): Hydroxytyrosol mildly improve cognitive function independent of APP processing in APP/PS1 mice. *Molecular Nutrition and Food Research* **60**, 2331-2342
- PEREZ-BARRON, G. A.; MONTES, S.; RUBIO-OSORNIO, M.; AVILA-ACEVEDO, J. G.; GARCIA-JIMENEZ, S.; RIOS, L. C.; MONROY-NOYOLA, A. (2020): Hydroxytyrosol inhibits MAO isoforms and prevents neurotoxicity inducible by MPP<sup>+</sup> in vivo. *Frontiers in Bioscience* **12**, 25-37
- PÉREZ-BARRÓN, G.; MONTES, S.; AGUIRRE-VIDAL, Y.; SANTIAGO, M.; GALLARDO, E.; ESPARTERO, J. L.; RÍOS, C.; MONROY-NOYOLA, A. (2021): Antioxidant Effect of Hydroxytyrosol, Hydroxytyrosol Acetate and Nitrohydroxytyrosol in a Rat MPP<sup>+</sup> Model of Parkinson's Disease. *Neurochemical Research* **46**, 2923-2935
- PHAN, J.-A.; STOCKHOLM, K.; ZAREBA-PASLAWSKA, J.; JAKOBSEN, S.; VANG, K.; GJEDDE, A.; LANDAU, A. M.; ROMERO-RAMOS, M. (2017): Early synaptic dysfunction induced by  $\alpha$ -synuclein in a rat model of Parkinson's disease. *Scientific Reports* **7** (6363), 1-17

- POEWE, W.; SEPPI, K.; TANNER, C. M.; HALLIDAY, G. M.; BRUNDIN, P.; VOLKMANN, J.; SCHRAG, A.-E.; LANG, A. E. (2017): Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers* **3**, 17013
- QIANG, L.; SUN, X.; AUSTIN, T. O.; MURALIDHARAN, H.; JEAN, D. C.; LIU, M.; YU, W.; BAAS, P. W. (2018): Tau Does Not Stabilize Axonal Microtubules but Rather Enables Them to Have Long Labile Domains. *Current Biology* **28**, 2181-2189
- RAHBARDAR, M. G.; AMIN, B.; MEHRI, S.; MIRNAJAFI-ZADEH, S. J.; HOSSEINZADEH, H. (2017): Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. And rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **86**, 441-449
- RAJAEI, A.; SALARBASHI, D.; ASRARI, N.; BAZZAZ, B. S. F.; ABOUTORABAZADE, S. M.; SHADDEL, R. (2020): Antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities of extracts of the seed and pulp of Jujube (*Ziziphus jujuba*) grown in Iran. *Food Science and Nutrition* **9**, 682-691
- RAMACHANDRAN, A. K.; DAS, S.; JOSEPH, A.; GAUTHAM, S. G.; ALEX, A. T.; MUDGAL, J. (2021): Neurodegenerative Pathways in Alzheimer's Disease: A Review. *Current Neuropharmacology* **19**, 679-692
- RAO, S. V.; MURALIDHARA, YENISETTI, S. C.; RAJINI, P. S. (2016): Evidence of neuroprotective effects of saffron and crocin in a Drosophila model of parkinsonism. *NeuroToxicology* **52**, 230-242
- RAO, S. V.; HEMALATHA, P.; YETISH, S.; MURALIDHARA, M.; RAJINI, P. S. (2019): Prophylactic neuroprotective propensity of Crocin, a carotenoid against rotenone induced neurotoxicity in mice: behavioral and biochemical evidence. *Metabolic Brain Disease* **34**, 1341-1353
- RISHER, J.F.; MINK, F. L.; STARA, J. F. (1987): The Toxicologic Effects of the Carbamate Insecticide Aldicarb in Mammals: A Review. *Environmental Health Perspectives* **72**, 267-281
- RODDA, J.; CARTER, J. (2012): Cholinesterase inhibitors and memantine for symptomatic treatment of dementia. *British Medical Journal* **344**, e2986
- RONG, H.; LIANG, Y.; NIU, Y. (2018): Rosmarinic acid attenuates  $\beta$ -amyloid-induced oxidative stress via Akt/GSK-3 $\beta$ /Fyn-mediated Nrf2 activation in PC12 cells. *Free Radical Biology and Medicine* **120**, 114-123
- ROSSI, M.; CARUSO, F.; KWOK, L.; LEE, G.; CARUSO, A.; GIONFRA, F.; CANDELOTTI, E.; BELLI, S. B.; MOLASKY, N.; RALEY-SUSMAN, K. M.; LEONE, S.; FILIPSKY, S.; TOFANI, D.; PEDERSEN, J.; INCERPI, S. (2017): Protection by extra virgin olive oil against oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. Chemical and biological studies on the health benefits due to a major component of the Mediterranean diet. *PLoS One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.018934>
- ROTH, B. L.; POOT, M.; YUE, S. T.; MILLARD, P. J. (1997): Bacterial Viability and Antibiotic Susceptibility Testing with SYTOX Green Nucleic Acid Stain. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (6), 2421-2431
- SAIER, C.; BÜCHTER, C.; KOCH, K.; WÄTJEN, W. (2018): *Polygonum multiflorum* Extract Exerts Antioxidative Effects and Increases Life Span and Stress Resistance in the Model Organism *Caenorhabditis elegans* via DAF-16 and SIR-2.1. *Plants* **7** (60), doi:10.3390/plants7030060

- SAIER, C.; STORBECK, S.; BAIER, S.; DIETZ, H.; WÄTJEN, W. (2020): Rosemary extract modulates stress resistance and accumulation of reactive oxygen species in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *PharmaNutrition* **14**, 100233
- SALAMA, R. M.; ABDEL-LATIF, G. A.; ABBAS, S. S.; EL MAGDOUB, H. M.; SCHAALAN, M. F. (2020): Neuroprotective effect of crocin against rotenone-induced Parkinson's disease in rats: Interplay between PI3K/Akt/m/TOR signaling pathway and enhanced expression of miRNA-7 and miRNA-221. *Neuropharmacology* **164**, 107900
- SANDHIR, R.; MEHROTRA, A. (2013): Quercetin supplementation is effective in improving mitochondrial dysfunctions induced by 3-nitropropionic acid: Implications in Huntington's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1832**, 421-430
- SANTOS, M.M.; PICCIRILLO, C.; CASTRO, P. M. L.; KALOGERAKIS, N.; PINTADO, M. E. (2012): Bioconversion of oleuropein to hydroxytyrosol by lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**, 2435-2440
- SARBISHEGI, M.; GORGICH, E. A. C.; KHAJAVI, O.; KOMEILI, G.; SALIMI, S. (2018): The neuroprotective effects of hydro-alcoholic extract of olive (*Olea europaea* L.) leaf on rotenone-induced Parkinson's disease in rats. *Metabolic Brain Disease* **33**, 79-88
- SAWIN, E.; RANGANATHAN, R.; HORVITZ, H. R. (2000): *C. elegans* Locomotory Rate Is Modulated by the Environment through a Dopaminergic Pathway and by Experience through a Serotonergic Pathway. *Nature* **26**, 619-631
- SCHAFER, W. R.; KENYON, C. J. (1995): A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **375**, 73-78
- SENOL, F. S.; ANKLI, A.; REICH, E.; ORHAN, E. I. (2016): HPTLC Fingerprinting and Cholinesterase Inhibitory and Metal-Chelating Capacity of Various *Citrus* Cultivars and *Olea europaea*. *Food Technology and Biotechnology* **54** (3), 275-281
- SEO, E. J.; LEE, S. Y.; KANG, S. S.; JUNG, Y.-S. (2013): *Ziziphus jujuba* and its Active Component Jujuboside B Inhibit Platelet Aggregation. *Phytotherapy Research* **27**, 829-834
- SHI, L.; PI, Y.; LUO, C.; ZHANG, C.; TAN, D.; MENG, X. (2015): In vitro inhibitory activities of six gypenosides on human liver cancer cell line HepG2 and possible role of HIF-1 $\alpha$  pathway in them. *Chemico-Biological Interactions* **238**, 48-54
- SIES, H. (1985): Oxidative Stress: Introductory Remarks. *Oxidative Stress, Academic Press, London*, 1-8
- SMITH, M. A.; PERRY, G.; RICHEY, P. L.; SAYRE, L. M.; ANDERSON, V. E.; BAEL, M. F.; KOWALL, N. (1996): Oxidative Damage in Alzheimer's. *Nature* **382**, 120-121
- SOROLLA, M. A.; REVERTER-BRANCHAT, G.; TAMARIT, J.; FERRER, I.; ROS, J.; CABISCOL, E. (2008): Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radical Biology and Medicine* **45**, 667-678
- SPILLANTINI, M. G.; SCHMIDT, M. L.; LEE, V. M.; TROJANOWSKI, J. Q.; JAKES, R.; GOEDERT, M. (1997):  $\alpha$ -Synuclein in Lewi bodies. *Nature* **288**, 839-840
- STACK, C.; HO, D.; WILLE, E.; CALINGASAN, N. Y.; WILLIAMS, C.; LIBY, K.; SPORN, M.; DUMONT, M.; BEAL, M. F. (2010): Triterpenoids CDDO-ethyl amide and CDDO-trifluoroethyl amide improve the behavioral phenotype and brain pathology in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Free Radical Biology and Medicine* **49** (2), 147-158
- ST-LAURENT-THIBOULT, C.; ARSENEAULT, M.; LONGPRE, F.; RAMASSAMY, C. (2011): Tyrosol and Hydroxytyrosol Two Main Components of Olive Oil, Protect N2a Cells

- Against Amyloid- $\beta$ -Induced Toxicity. Involvement of the NF- $\kappa$ B Signaling. *Current Alzheimer Research* **8** (5), 543-551
- SULSTON, J.; DEW, M.; BRENNER, S. (1975): Dopaminergic Neurons in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Comparative Neurology* **163**, 215-226
- SULSTON, J.; DU, Z.; THOMAS, K.; WILSON, R.; HILLIER, L.; STADEN, R.; HALLORAN, N.; GREEN, P.; THIERRY-MIEG, J.; QIU, L.; DEAR, S.; COULSON, A.; CRAXTON, M.; DURBIN, R.; BERKS, M.; METZSTEIN, M.; HAWKINS, T.; AINSCOUGH, R.; WATERSTON, R. (1992): The *C. elegans* genome sequencing project: a beginning. *Nature* **356**, 37-41
- SUN, M.-L.; CHEN, X.-Y.; CAO, J.-J.; CUI, X.-H.; WANG, H.-B. (2021): *Polygonum multiflorum* Thunb extract extended the lifespan and healthspan of *Caenorhabditis elegans* via DAF-16/SIR-2.1/SKN-1. *Food and Function* **12**, 8774-8786
- SUNGAYA, S. N.; SUMATHI, T. (2017): Effect of Rutin against a mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid induced biochemical, behavioral and histological alterations – a pilot study on Huntington's disease model in rats. *Metabolic Brain Disease* **32**, 471-481
- SUO, S.; SASAGAWA, N.; ISHIURA, S. (2002): Identification of a dopamine receptor from *Caenorhabditis elegans*. *Neuroscience Letters* **319**, 13-16
- SUO, S.; SASAGAWA, N.; ISHIURA, S. (2003): Cloning and characterization of a *Caenorhabditis elegans* D2-like dopamine receptor. *Journal of Neurochemistry* **86**, 869-878
- SUSALIT, E.; AGUS, N.; EFFENDI, I.; TJANDRAWINATA, R. R.; NOFIARNY, D.; PERRINJAQUET-MOCSETTI, T.; VERBURGGEN, M. (2011): Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine* **18**, 251-258
- SWANSON, M. M.; RIDDLE, D. L. (1981): Critical Periods in the Development of the *Caenorhabditis elegans* Dauer Larva. *Developmental Biology* **84**, 27-40
- SZWAJGIER, D.; BARANOWSKA-WÓJCIK, E. (2019): Terpenes and Phenylpropanoids as Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibitors: A Comparative Study. *Current Alzheimer Research* **16** (10), 963-973
- TANIGUCHI, K.; YAMAMOTO, F.; ARAI, T.; YANG, J.; SAKAI, Y.; ITOH, M.; MAMADA, N.; SEKIGUCHI, M.; YAMADA, D.; SAITOH, A.; KAMETANI, F.; TAMAOKA, A.; ARKAI, Y. M.; WADA, K.; MIZUSAWA, H.; ARKAI, W. (2019): Tyrosol Reduces Amyloid- $\beta$  Oligomer Neurotoxicity and Alleviates Synaptic, Oxidative, and Cognitive Disturbances in Alzheimer's Disease Model Mice. *Journal of Alzheimer's Disease* **70** (3), 937-952
- TAO, L.; LI, X.; ZHANG, L.; TIAN, J.; LI, X.; SUN, X.; LI, X.; JIANG, L.; ZHANG, X.; CHEN, J. (2011): Protective Effect of Tetrahydroxystilbene Glucoside on 6-OHDA-Induced Apoptosis in PC12 Cells through the ROS-NO Pathway. *PLoS One* **6** (10), e26055
- TAS, D.; STICKLEY, L.; MIOZZO, F.; KOCH, R.; LONCLE, N.; SABADO, V.; GNÄGI, B.; NAGOSHI, E. (2018): Parallel roles of transcription factors dFOXO and FER2 in the development and maintenance of dopaminergic neurons. *PLoS Genetics* **14** (3), e1007271
- TASSET, I.; PONTES, A. J.; HINOJOSA, A. J.; DE LA TORRE, R.; TÚNEZ, I. (2011): Olive Oil reduces oxidative damage in a 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease-like rat model. *Nutritional Neuroscience* **14** (3), 106-111

- THAPA, S.; LV, M.; XU, H. (2017): Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. *Mini-Reviews in Medical Chemistry* **17**, 1665-1676
- TONG, X.-P.; MA, Y.-X.; QUAN, D.-N.; ZHANG, L.; YAN, M.; FAN, X.-R. (2017): Rosemary Extracts Upregulate Nrf2, Sestrin2, and MRP2 Protein Level in Human Hepatoma HepG2 Cells. *Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2017**, 7359806
- TOURETTE, C.; FARINA, F.; VAZQUEZ-MANRIQUE, R. P.; ORFILA, A.-M.; VOISIN, J.; HERNANDEZ, S. et al. (2014): The Wnt Receptor Ryk Reduces Neuronal and Cell Survival Capacity by Repressing FOXO Activity During the Early Phases of Mutant Huntingtin Pathogenicity. *PLOS Biology* **12** (6), e10011895
- TSAI, S.-J.; YIN, M.-C. (2008): Antioxidative and Anti-Inflammatory Protection of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in PC12 Cells. *Journal of Food Science* **73** (7), 174-178
- TULLET, J. M. A.; GREEN, J. W.; AU, C.; BENEDETTO, A.; THOMPSON, M. A.; CLARK, E.; GILLIAT, A. F.; YOUNG, A.; SCHMEISSER, K.; GEMS, D. (2017): The SKN-1/Nrf2 transcription factor can protect against oxidative stress and increase lifespan in *C. elegans* by distinct mechanisms. *Aging Cell*, 1-4
- UM, M.-Y.; CHOI, W.-H.; AAN, J.-Y.; KIM, S.-R.; HA, T.-Y. (2006): Protective effect of *Polygonum multiflorum* Thunb on amyloid- $\beta$ -peptide 25-35 induced cognitive deficits in mice. *Journal of Ethnopharmacology* **104**, 144-148
- VARESLIJA, D.; TIPTON, K. F.; DAVEY, G. P.; MCDONALD, A. G. (2020): 6-Hydroxydopamine: a far from simple neurotoxin. *Journal of Neural Transmission* **127**, 213-230
- VAUZOUR, D.; CORONA, G.; SPENCER, J. P. E. (2010): Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **501**, 106-111
- WANG, P.; NIU, L.; GOU, X.-D.; GAO, L.; LI, W.-X.; JIA, D.; WANG, X.-L.; MA, L.-T.; GAO, G.-D. (2010): Gypenosides protects dopaminergic neurons in primary culture against MPP<sup>+</sup>-induced oxidative injury. *Brain Research Bulletin* **83**, 266-271
- WANG, L.; SANG, M.; LIU, E.; BANAHENE, P. O.; ZHANG, Y.; WANG, T.; HAN, L.; GAO, X. (2017a): Rapid profiling and pharmacokinetic studies of major compounds in crude extract from *Polygonum multiflorum* by UHPLC-Q-TOF-MS and UPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **140**, 45-61
- WANG, W. C.; XIA, Y. M.; YANG, B.; SU, X. N.; CHEN, J. K.; LI, W.; JIANG, T. (2017b): Protective Effects of Tyrosol against LPS-Induced Acute Lung Injury via Inhibiting NF- $\kappa$ B and AP-1 Activation and Activating the HO-1/Nrf2 Pathways. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **40**, 538-593
- WANG, H.-L.; SUN, Z.-O.; REHMAN, R.-U.; WANG, H.; WANG, Y.-F.; WANG, H. (2017c): Rosemary Extract-Mediated Lifespan Extension and Attenuated Oxidative Damage in *Drosophila melanogaster* Fed on High-Fat Diet. *Journal of Food Science* **82** (4), 1006-1011
- WANG, K.; SUN, W.; ZHANG, L.; GUO, W.; XU, J.; LIU, S.; ZHOU, Z.; ZHANG, Y. (2018): Oleanolic Acid Ameliorates A $\beta$ 25-35 Injection-induced Memory Deficit in Alzheimer's Disease Model Rats by Maintaining Synaptic Plasticity. *CNS and Neurological Disorders – Drug Targets* **17**, 389-399
- WANG, C.; CAI, X.; HU, W.; LI, Z.; KONG, F.; CHEN, X.; WANG, D. (2019): Investigation of the neuroprotective effects of crocin via antioxidant activities in HT22 cells and in

- mice with Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Medicine* **43**, 956-966
- WANG, Z.; WANG, Z.; HUANG, W.; SUO, J.; CHEN, X.; DING, K.; SUN, Q.; ZHANG, H. (2020): Antioxidant and anti-inflammatory activities of an anti-diabetic polysaccharide extracted from *Gynostemma pentaphyllum* herb. *International Journal of Biological Macromolecules* **145**, 484-491
- WANI, A.; AL RIHANI, S. B.; SHARMA, A.; WEADICK, B.; GOVINDARAJAN, R.; KHAN, S. U.; SHARMA, P. R.; DOGRA, A.; NANDI, U.; REDDY, C. N.; BHARATE, S. S.; SINGH, G.; BHARATE, S. B.; VISHVAKARMA, R. A.; KADDOUMI, A.; KUMAR, A. (2021): Crocetin promotes clearance of amyloid- $\beta$  by inducing autophagy via the STK<sub>11</sub>/LKB<sub>1</sub>-mediated AMPK pathway. *Autophagy* **17** (11), 3813-3832
- WELLINGTON, C. L.; ELLERBY, L. M.; HACKAM, A. S.; MARGOLIS, R. L.; TRIFIRO, M. A.; SINGARAJA, R. et al. (1998): Caspase Cleavage of Gene Products Associated with Triplet Expansion Disorders Generates Truncated Fragments Containing the Polyglutamine Tract. *The Journal of Biological Chemistry* **273** (15), 9158-9167
- WELLINGTON, C. L.; SINGARAJA, R.; ELLERBY, L.; SAVILL, J.; ROY, S.; LEAVITT, B. et al. (2000): Inhibiting Caspase Cleavage of Huntingtin Reduces Toxicity and Aggregate Formation in Neuronal and Nonneuronal Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **275** (26), 19831-19838
- Wormatlas: <https://www.wormatlas.org/neurons/Individual%20Neurons/ASHframeset.html>
- WU, C.-R.; TSAI, C.-W.; CHAND, S.-W.; LIN, C.-Y.; HUANG, L.-C.; TSAI, C.-W. (2015): Carnosic acid protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in *in vivo* and *in vitro* model of Parkinson's disease: Involvement of antioxidative enzymes induction. *Chemico-Biological Interactions* **225**, 40-46
- WYTTENBACH, A.; SAUVAGEOT, O.; CARMICHAEL, J.; DIAZ-LATOUD, C.; ARRIGO, A.-P.; RUBISZTEIN, D. C. (2002): Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Human Molecular Genetics* **11** (9), 1137-1151
- XIA, S.-R.; WEN, X.-Y.; FAN, X.-L.; CHEN, X.-R.; WEI, Z.-W.; LI, Q.-H.; SUN, L. (2020): *Wnt2* overexpression protects against PIMK1 mutant-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Molecular Medicine Reports* **21**, 2633-2641
- XIE, Z.; LIU, W.; HUANG, H.; SLAVIN, M.; ZHAO, Y.; WHENT, M.; BLACKFORD, J.; LUTTERODT, H.; ZHOU, H.; CHEN, P.; WANG, T. T. Y.; WANG, S.; YU, L. (2010): Chemical Composition of Five Commercial *Gynostemma pentaphyllum* Samples and Their Radical Scavenging, Antiproliferative, and Anti-inflammatory Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 11243-11249
- XIE, M.; ZHANG, G.; YIN, W.; HEI, X.-X.; LIU, T. (2018): Cognitive enhancing and antioxidant effects of tetrahydroxystilbene glucoside in A $\beta$ 1-42-induced neurodegeneration in mice. *Journal of Integrated Neuroscience* **17** (2), 203-209
- XU, M.-Y.; LEE, S. Y.; KANG, S. S.; KIM, Y. S. (2014): Antitumor Activity of Jujuboside B and the Underlying Mechanism via Induction of Apoptosis and Autophagy. *Journal of Natural Products* **77**, 370-376
- YAN, H.; WANG, X.; WANG, Y.; WANG, P.; XIAO, Y. (2014): Antiproliferation and antimigration induced by gypenosides in human colon cancer SW620 and esophageal cancer Eca-109 cells. *Human and Experimental Toxicology* **33** (5), 522-533

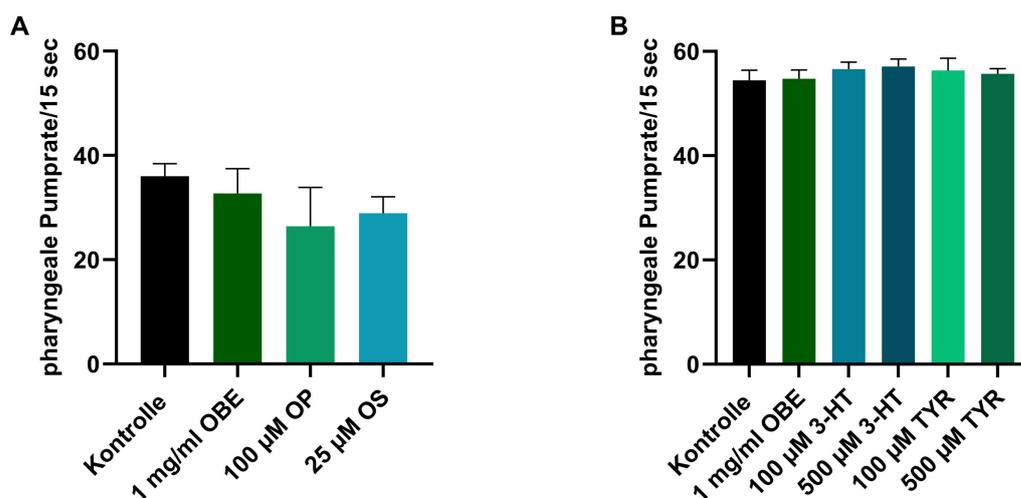
- YAN, J.; YANG, Z.; ZHAO, N.; LI, Z.; CAO, X. (2019): Gastrodin protects dopaminergic neurons via insulin-like pathway in a Parkinson's disease model. *BMC Neuroscience* **20** (31)
- YANG, L.; CALINGASAN, N. Y.; THOMAS, B.; CHATURVEDI, R. K.; KIAEI, M.; WILLE, E. J.; LIBY, K. T.; WILLIAMS, C.; ROYCE, D.; RISINGSONG, R.; MUSIEK, E. S.; MORROW, J. D.; SPORN, M.; BEAL, M. F. (2009): Neuroprotective Effects of the Triterpenoid , CDDO Methyl Amide, a Potent Inducer of Nrf2-Mediated Transcription. *PLoS ONE* **4** (6), e5757
- YANG, W.; HEKIMI, S. (2010): A Mitochondrial Superoxide Signal Triggers Increased Longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biology* **8** (12), e1000556
- YESIL-CELIKTAS, O.; SEVIMLI, C.; BEDIR, E.; VARDAR-SUKAN, F. (2010): Inhibitory Effects of Rosemary Extracts, Carnosic Acid and Rosmarinic Acid on the Growth of Various Human Cancer Cell Lines. *Plant Foods for Human Nutrition* **65**, 158-163
- YIN, M.-C.; CHAN, K.-C. (2007): Nonenzymatic Antioxidative and Antiglycative Effects of Oleanolic Acid and Ursolic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 7177-7181
- YU, G.; DENG, A.; TANG, W.; MA, J.; YUAN, C.; MA, J. (2016): Hydroxytyrosol induces phase II detoxifying enzyme expression and effectively protects dopaminergic cells against dopamine- and 6-hydroxydopamine induced cytotoxicity. *Neurochemistry International* **96**, 113-120
- ZARE-ZARDINI, H.; TOLUEINIA, B.; HASHEMI, A.; EBRAHIMI, L.; FESAHAAT, F. (2013): Antioxidant and Cholinesterase Inhibitory Activity of a New Peptide from *Ziziphus jujuba* Fruits. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias* **27** (7), 702-709
- ZHANG, L.; YU, S.; ZHANG, R.; XING, Y.; LI, Y.; LI, L. (2013): Tetrahydroxystilbene glucoside antagonizes age-related  $\alpha$ -synuclein overexpression in the hippocampus of APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Restorative Neurology and Neuroscience* **31**, 41-52
- ZHANG, J.; LU, L.; ZHOU, L. (2015): Oleanolic acid activates *daf-16* to increase lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **468**, 843-849
- ZHANG, L.; XIA, R.; JIA, J.; WANG, L.; LI, K.; LI, Y.; ZHANG, J. (2018a): Oleanolic acid protects against cognitive decline and neuroinflammation-mediated neurotoxicity by blocking secretory phospholipase A2 IIA-activated calcium signals. *Molecular Immunology* **99**, 95-103
- ZHANG, M.; QIAN, C.; ZHENG, Z.-G.; QIAN, F.; WANG, Y.; THU, P. M.; ZHANG, X.; ZHOU, Y.; TU, L.; LIU, Q.; LI, H.-J.; YANG, H.; LI, P.; XU, X. (2018b): Jujuboside A promotes A $\beta$  clearance and ameliorates cognitive deficiency in Alzheimer's disease through activating Axl/HSP90/PPAR $\gamma$  pathway. *Theranostics* **8** (15), 4262-4278
- ZHANG, J.; WANG, Y.; DONG, X.; LIU, J. (2018c): Crocetin attenuates inflammation and amyloid- $\beta$  accumulation in APPsw transgenic mice. *Immunity and Ageing* **15** (24), doi: 10.1186/s12979-018-0132-9
- ZHANG, W.; BAI, S.; YANG, J.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; NIE, J.; MENG, D.; SHI, R.; YAO, Z.; WANG, M.; WANG, H.; LI, C. (2020): FoxO1 overexpression reduces A $\beta$  production and tau phosphorylation in vitro. *Neuroscience Letters* **738**, 135322
- ZHAO, Z.; XIE, J.; LIU, B.; GE, X.; SONG, C.; REN, M.; ZHOU, Q.; MIAO, L.; ZHANG, H.; SHAN, F.; YANG, Z. (2017a): The effects of emodin on cell viability, respiratory burst

- and gene expression of Nrf2-Keap1 signaling molecules in the peripheral blood leukocytes of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish and Shellfish Immunology* **62**, 75-85
- ZHAO, X.; LU, L.; QI, Y.; LI, M.; ZHOU, L. (2017b): Emodin extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* through insulin/IGF-1 signaling pathway depending on DAF-16 and SIR-2.1. *Biochemistry and Molecular Biology* **23**, 1-9
- ZHAO, Y.; HAN, Y.; WANG, Z.; CHEN, T.; QIAN, H.; HE, J.; LI, J.; HAN, B.; WANG, T. (2020): Rosmarinic acid protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurotoxicity in zebrafish embryos. *Toxicology in Vitro* **65**, 104823
- ZHONG, Y.; LUO, R.; LIU, Q.; ZHU, J.; LEI, M.; LIANG, X.; WANG, X.; PENG, X. (2022): Jujuboside A ameliorates high fat diet and streptozotocin induced diabetic nephropathy via suppressing oxidative stress, apoptosis, and enhancing autophagy. *Food and Chemical Toxicology* **159**, 112697
- ZHU, W.; XUE, X.; ZHANG, Z. (2017): Structural, physicochemical, antioxidant and antitumor property of an acidic polysaccharide from *Polygonum multiflorum*. *International Journal of Biological Macromolecules* **96**, 494-500
- ZWANE, R. E.; PARKER, A.; KUDANGA, T.; DAVIDS, L. M.; BURTON, S. G. (2012): Novel, Biocatalytically Produced Hydroxytyrosol Dimer Protects against Ultraviolet-Induced Cell Death in Human Immortalized Keratinocytes. *Agricultural and Food Chemistry* **60**, 11509-11517

## 9 Anhang

### 9.1 Pharynxpumpfrequenz

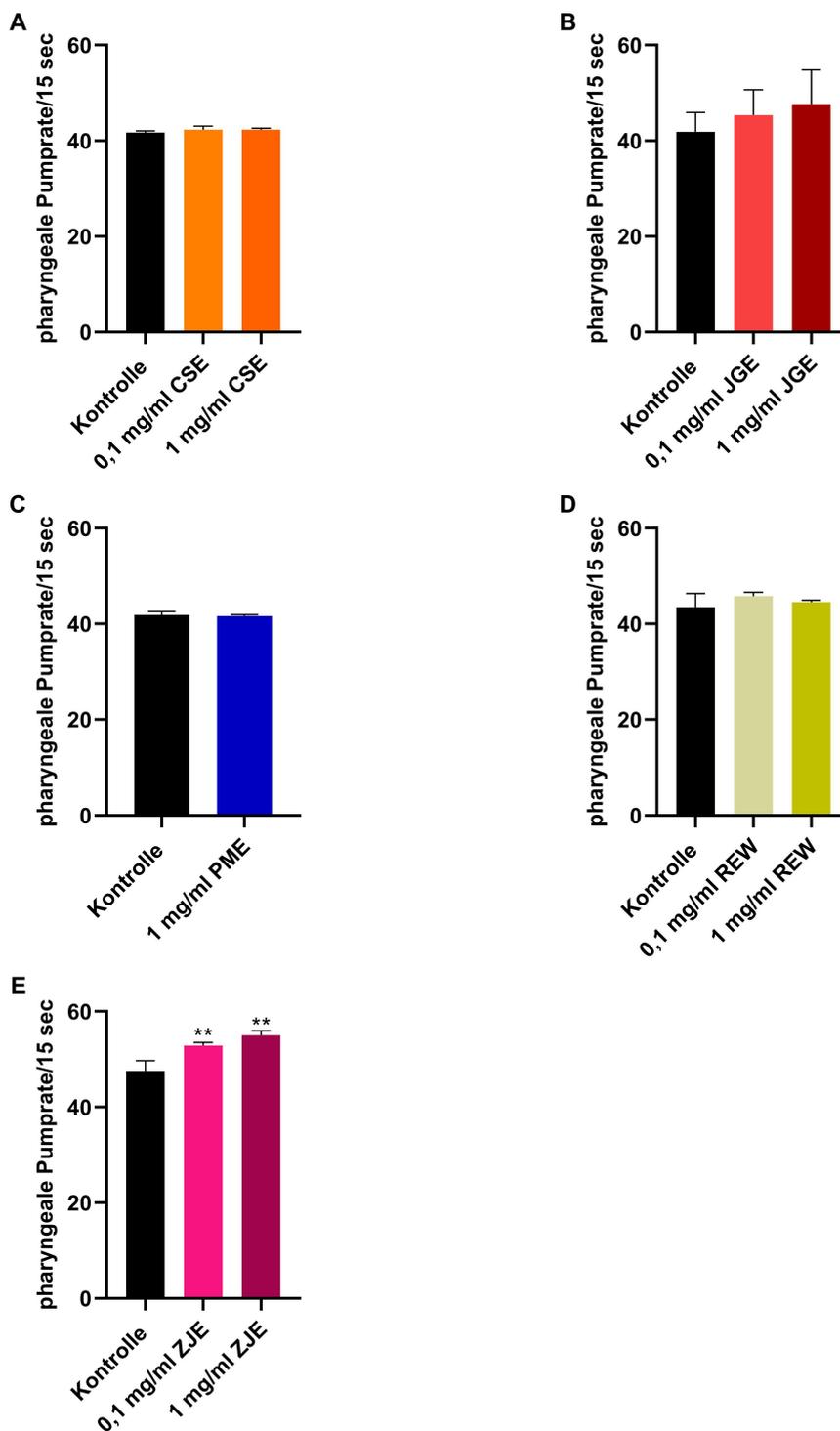
Um herauszufinden, ob die Nematoden durch die Substanzen weniger Nahrung aufnehmen und somit einer kalorischen Restriktion unterliegen wird das Pumpen des Pharynx untersucht.



**Abbildung 38: Pharynxpumpfrequenz (OBE und Inhaltsstoffe).**

Wildtypische L4-Larven wurden für 96 h bei 20°C mit 1 mg/ml OBE, 100 µM OP, 25 µM OS, 100 µM 3-HT oder TYR, 500 µM 3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Dann wurden alle Nematoden in 25 µl Medium auf eine Agarplatte gesetzt. Das Pharynxpumpen wurde in 15 s im Triplikate ausgezählt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SD, n = 3 (je 10 Individuen pro Gruppe). Die Daten zu OBE, OP und OS (A) entstanden im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Nora Meinhardt, die Daten zu OBE, 3-HT und TYR (B) im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Alicia Chisari.

Es zeigt sich, dass weder OBE, noch seine Inhaltsstoffe einen signifikanten Einfluss auf die Pumpfrequenz der Nematoden haben (Abbildung 38). Auch CSE, JGE, PME und REW beeinflussen die Pumpfrequenz des Pharynx der Nematoden nicht signifikant (Abbildung 39A bis D). Eine Inkubation der Nematoden mit ZJE erhöht die pharyngeale Pumprate signifikant und konzentrationsabhängig (Abbildung 39E).

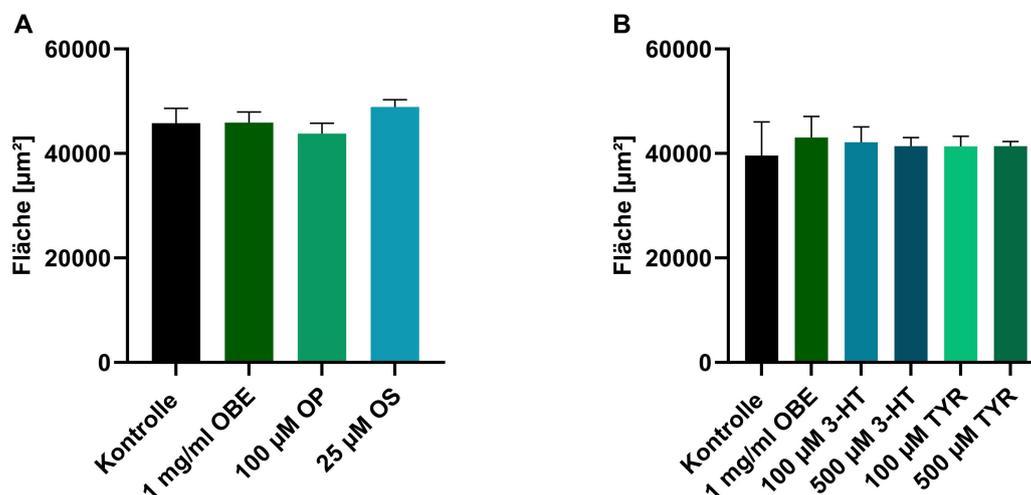


**Abbildung 39: Pharynxpumpfrequenz (verschiedene Extrakte).**

Wildtypische L4-Larven wurden für 96 h bei 20°C mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Dann wurden alle Nematoden in 25 µl Medium auf eine Agarplatte gesetzt. Das Pharynxpumpen wurde in 15 s im Triplikate ausgezählt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SD, n = 3 (je 10 Individuen pro Gruppe), einfaktorielles Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest; \*\* p < 0,01. Die Daten zu CSE, JGE, REW und ZJE entstanden im Rahmen der Abschlussarbeiten von Frau Jennifer Matzner (A), Frau Jennifer Wermann (B), Frau Stephanie Storbeck (D) und Frau Clara Brauer (E).

## 9.2 Größenmessung

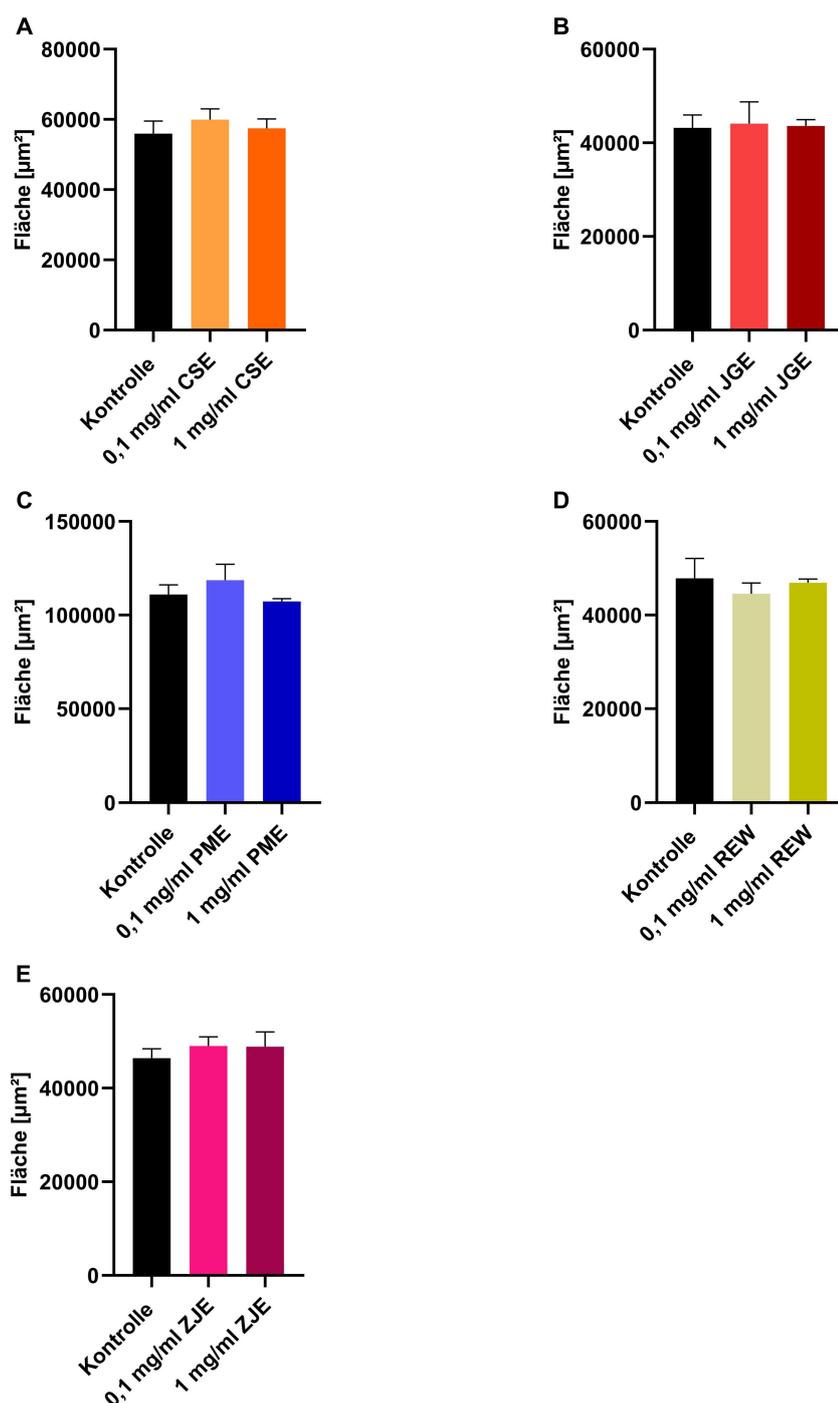
Auch die Untersuchung der Größe der Nematoden dient der Aufklärung adverser Effekte der Extrakte und der Inhaltsstoffe des OBE auf die Nematoden.



**Abbildung 40: Größenmessung (OBE und Inhaltsstoffe).**

Wildtypische L4-Larven wurden für 24 h bei 20°C mit 1 mg/ml OBE, 100  $\mu\text{M}$  OP, 25  $\mu\text{M}$  OS, 100  $\mu\text{M}$  3-HT oder TYR, 500  $\mu\text{M}$  3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Dann wurden Fotos von den Nematoden gemacht und deren Größe durch Umranden gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3$  (je 20 Individuen pro Gruppe), einfaktorielles Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest. Die Daten zu OBE, OP und OS (A) entstanden im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Nora Meinhardt, die Daten zu OBE, 3-HT und TYR (B) im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Alicia Chisari.

Der OBE und seine Inhaltsstoffe zeigen keine Beeinflussung der Größe der Nematoden (Abbildung 40) und auch eine Behandlung der Tiere mit den anderen untersuchten Extrakten zeigt keine Auswirkungen auf die Größe (Abbildung 41).



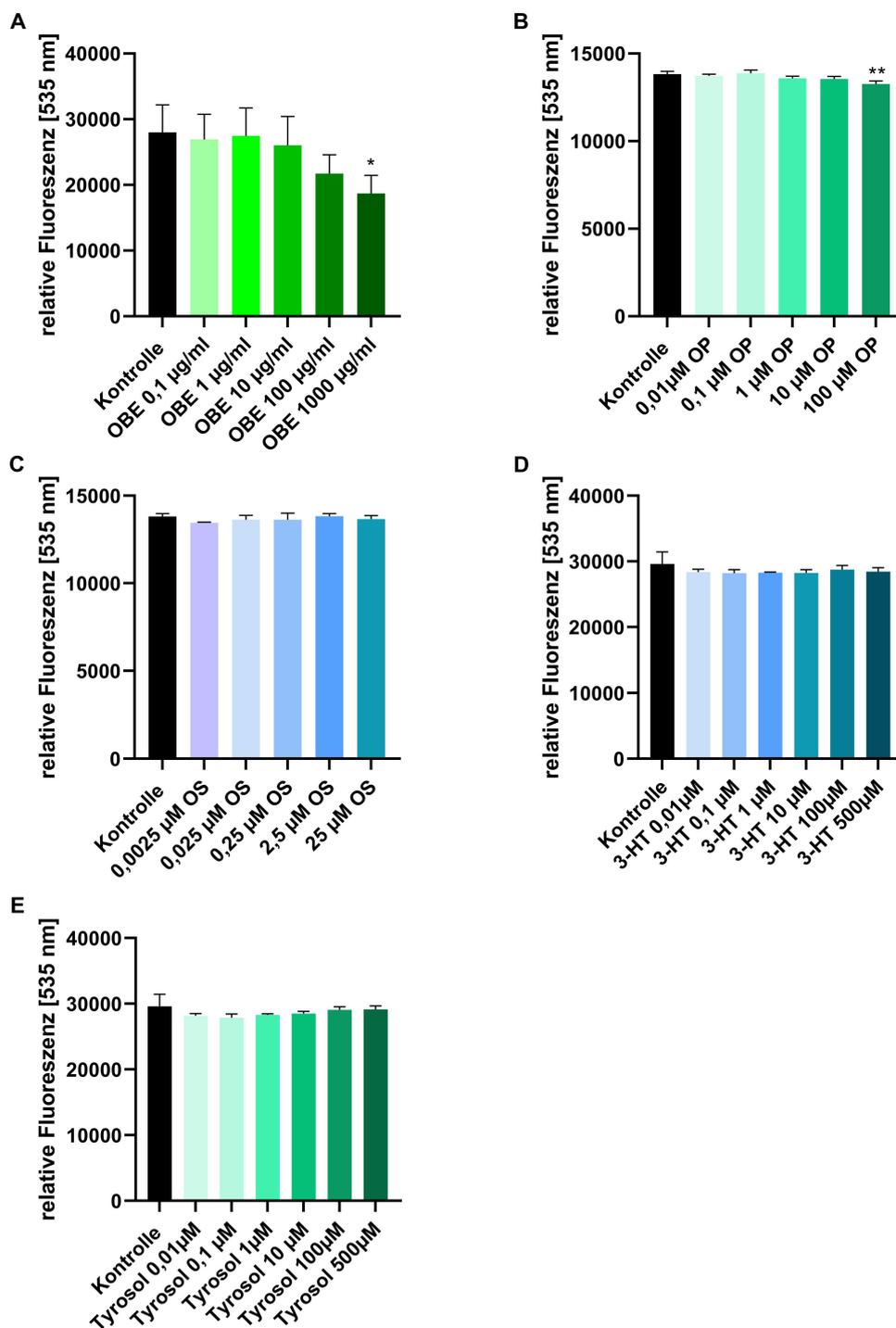
**Abbildung 41: Größenmessung (verschiedene Extrakte).**

Wildtypische L4-Larven wurden für 24 h (JGE) oder 48 h (CSE, REW, ZJE) bei 20°C mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt und anschließend fotografiert. Bei PME wurden die Nematoden für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen PME oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt und anschließend für 24 h in substanzfreiem Medium inkubiert. Dann wurden Fotos von den Nematoden gemacht. Die Größe der Tiere wird durch Umranden gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3$  (je 20 Individuen pro Gruppe), einfaktorische Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest. Die Daten zu CSE, JGE, REW und ZJE entstanden im Rahmen der Abschlussarbeiten von Frau Jennifer Matzner (A), Frau Jennifer Wermann (B), Frau Stephanie Storbeck (D) und Frau Clara Brauer (E).

### 9.3 Quenching

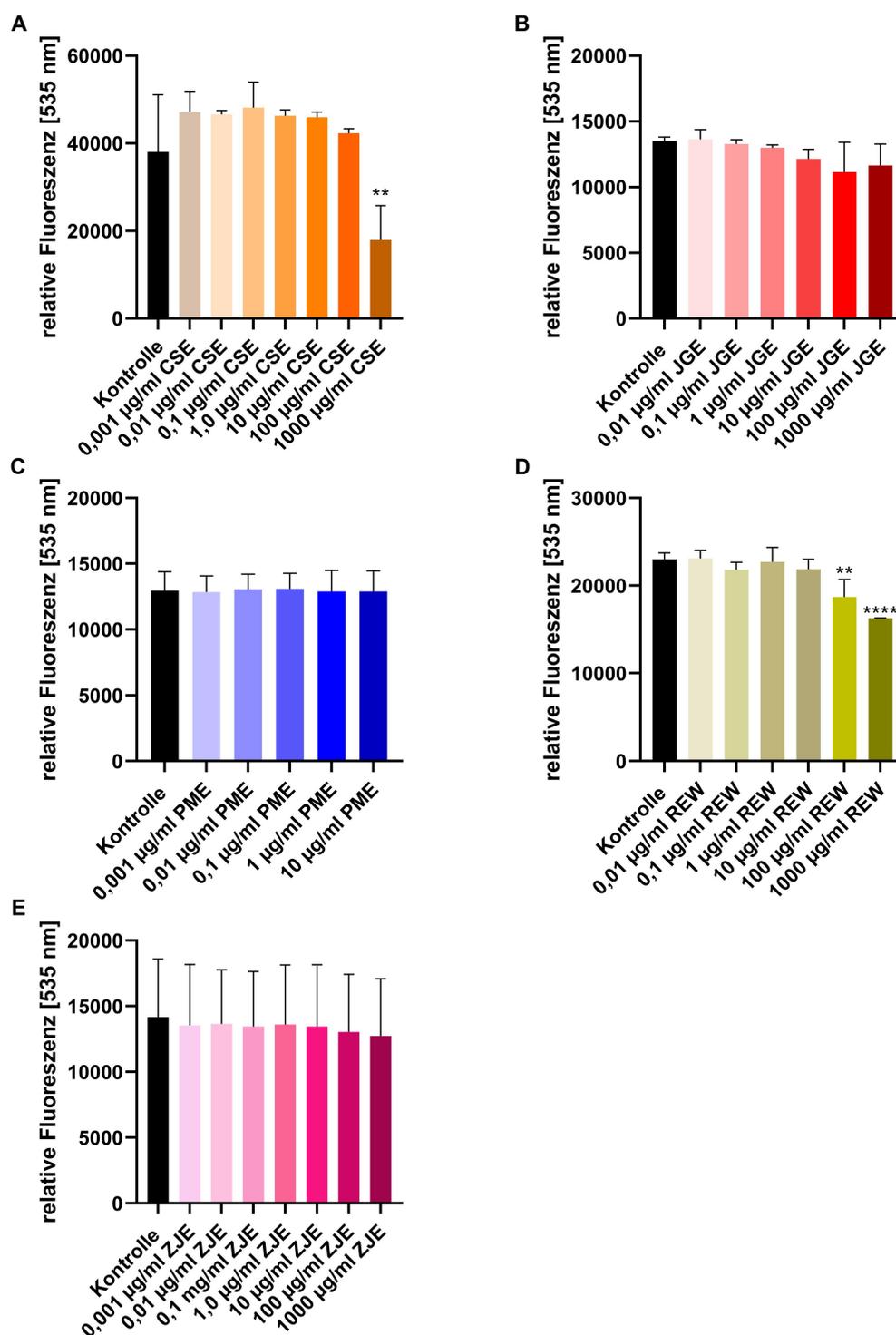
Ein möglicher quencher Effekt der Extrakte und Substanzen kann das Ergebnis der DCF-Fluoreszenzmessung beeinflussen. In hohen Konzentrationen zeigt OBE signifikante fluoreszenzlöschende Wirkungen (Abbildung 42A). Auch OP zeigt geringe quenchernde Eigenschaften, was jedoch durch die geringen Standardabweichungen zu Stande zu kommen scheint (Abbildung 42B). Die anderen Inhaltsstoffe des OBE haben keine fluoreszenzlöschende Eigenschaften (Abbildung 42C bis E).

Bei der Betrachtung der zusätzlich untersuchten Extrakten zeigen JGE, PME und ZJE ebenfalls keine quenchernde Eigenschaften (Abbildung 43B, C und E). CSE und REW hingegen zeigen in hohen Konzentrationen fluoreszenzlöschende Effekte (Abbildung 43A und D).



**Abbildung 42: Quenching (OBE und Inhaltsstoffe).**

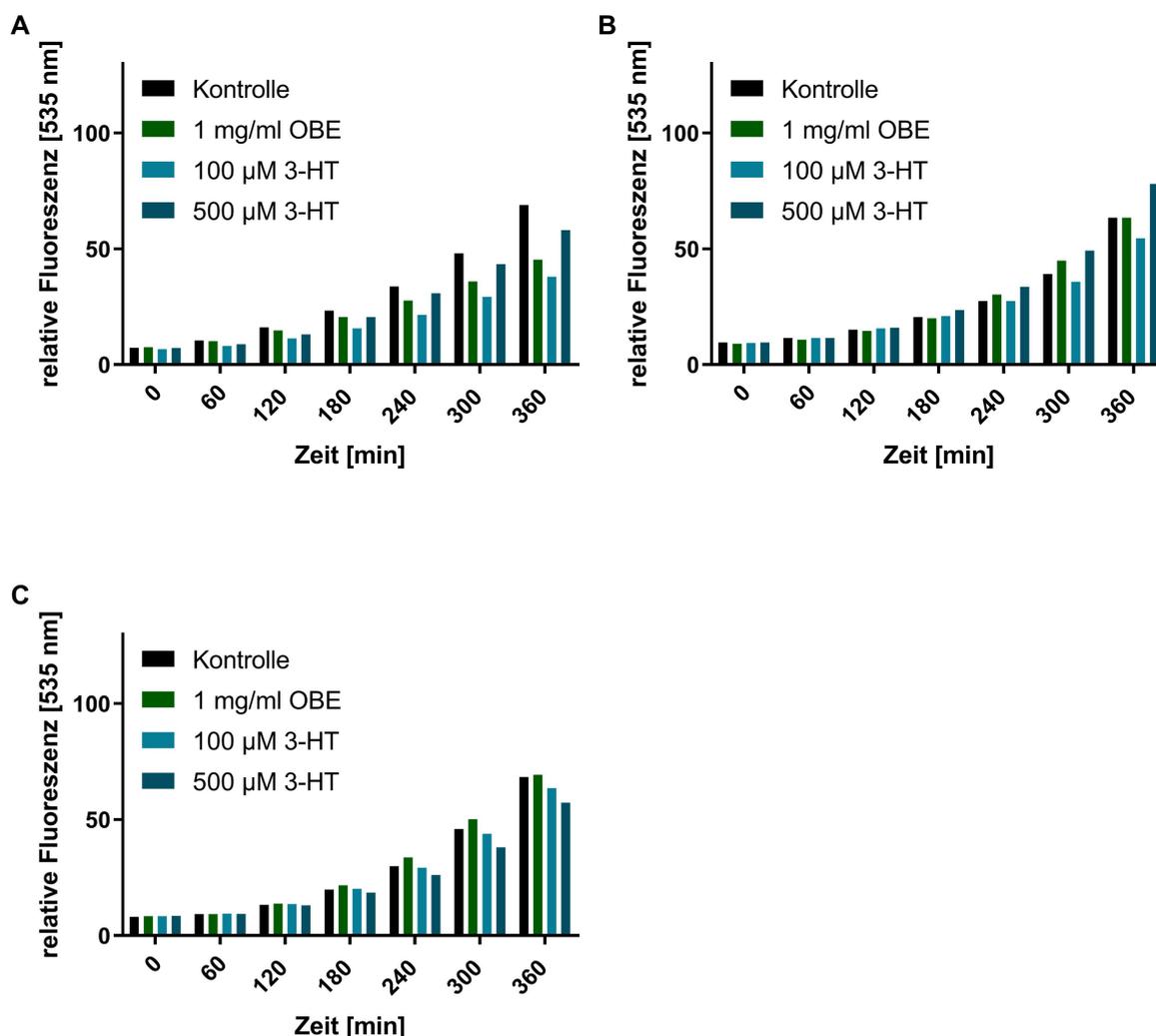
Autofluoreszentes oxidiertes DCF wurde mit M9 verdünnt. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen von OBE, seinen Inhaltsstoffen oder DMSO als Kontrolle hinzugegeben und bei 535 nm einer Fluoreszenzmessung unterzogen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3$  (Messung in Triplikaten), einfaktorielle Anova mit Dunnett's multiplum Vergleichstest; \*  $p < 0,05$ . Die Daten zu OBE (A), 3-HT (D) und TYR (E) entstanden im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Alicia Chisari.



**Abbildung 43: Quenching (verschiedene Extrakte).**

Autofluoreszentes oxidiertes DCF wurde mit M9 verdünnt. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen der Extrakte oder DMSO als Kontrolle hinzugegeben und bei 535 nm einer Fluoreszenzmessung unterzogen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3$  (Messung in Triplikaten), einfaktorische Anova mit Dunnett's multiplem Vergleichstest; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Die Daten zu CSE, JGE, REW und ZJE entstanden im Rahmen der Abschlussarbeiten von Frau Jennifer Matzner (A), Frau Jennifer Wermann (B), Frau Stephanie Storbeck (D) und Frau Clara Brauer (E).

## 9.4 Einzelexperimente DCF-Assay im Wildtyp mit 3-HT



**Abbildung 44: Thermal induzierter Anstieg der ROS-Level im Wildtyp (DCF-Assay; OBE und Inhaltsstoffe; Einzelexperimente).**

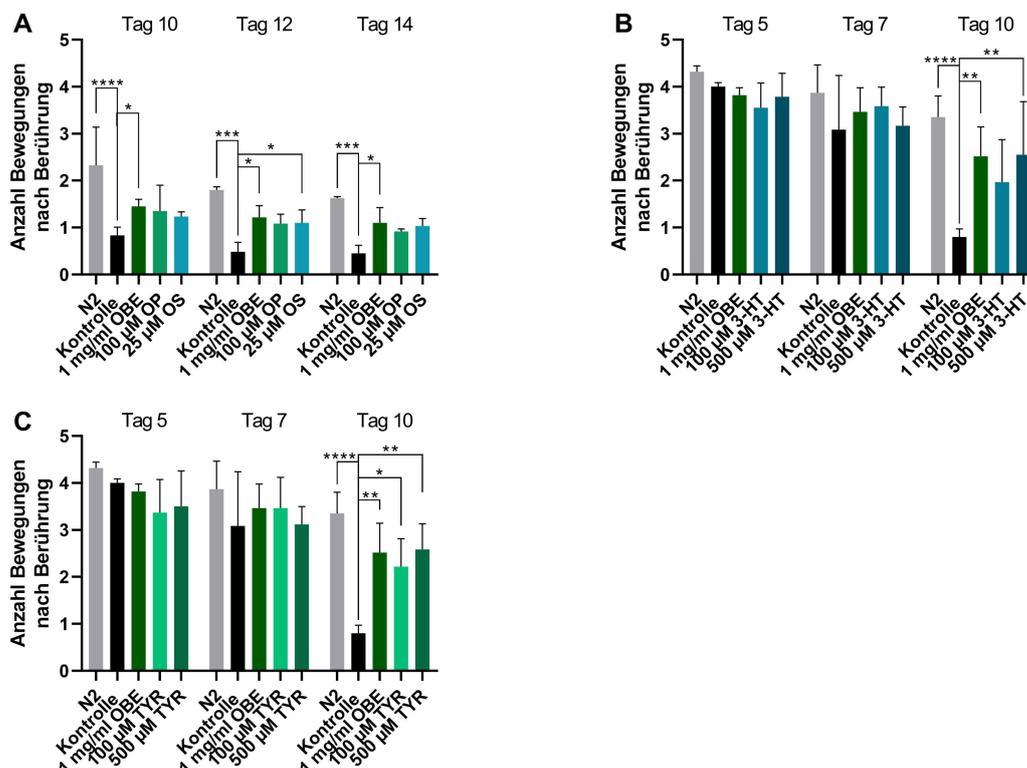
Wildtypische L4-Larven (N2) werden bei 20°C für 24 h mit 1 mg/ml OBE, 100 µM 3-HT, 500 µM 3-HT oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Nach einem einstündigen Waschschrift in PBST werden sie in Wells mit H<sub>2</sub>DCF-DA (50 µM) transferiert. Der thermal induzierte Anstieg der DCF-Fluoreszenz wird bei einer Exzitation von 485 nm, einer Emission von 535 nm und 37°C gemessen. Die angegebenen Werte normalisiert auf die Kontrolle bei 420 min, n = 1 (je 16 Individuen pro Gruppe). Alle drei Wiederholungen des Experiments sind dargestellt. Diese Daten entstanden im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Alicia Chisari.

## 9.5 Einfluss von neuroprotektiven Effekten hinsichtlich der Reaktion der Nematoden auf mechanische Nozizeptoren

In Abbildung 45 ist die Reaktionsfähigkeit der mit OBE oder seinen Inhaltsstoffen behandelten Nematoden des Stammes HA659 zu verschiedenen Messzeitpunkten

dargestellt. Nach 5 und 7 Tagen zeigen die Nematoden noch keine Verringerung ihrer Reaktionsfähigkeit, die ASH-Neuronen scheinen noch intakt zu sein (Abbildung 45B und C).

An den Tagen 12 und 14 hingegen zeigt sich ein sehr ähnliches Bild wie auch an Tag 10 zu sehen ist (Abbildung 45A).



**Abbildung 45: Untersuchung der durch Fragmente des humanen Huntingtins hervorgerufene Reduzierung der nozizeptorischen Wahrnehmung im Stamm HA659 (OBE und Inhaltsstoffe; Tag 10, 12 und 14).**

Transgene Nematoden des Stammes HA659 werden bei 20°C ab dem Eistadium mit 1 mg/ml OBE, 100 µM OP, 25 µM OS, 100 µM 3-HT oder TYR, 500 µM 3-HT oder TYR oder mit DMSO (0,4%) als Kontrolle behandelt. Die Medien werden alle 2-3 Tage gewechselt und ab dem L4-Stadium werden die Nematoden zusätzlich mit FUDR behandelt. An den Tagen 10, 12 und 14 (A) bzw. 5, 7 und 10 (B und C) nach Beginn der Inkubation werden die Nematoden an ihrer Schnauze berührt und die Rückwärtsbewegungen gezählt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SD, zweifaktorielle Anova mit Dunnett's multiplum Vergleichstest,  $n = 3$  (je 10 Individuen pro Gruppe), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Die Daten zu OBE, 3-HT und TYR (B und C) entstanden im Rahmen der Abschlussarbeit von Frau Alicia Chisari.

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mir bei der Entstehung dieser Arbeit zur Seite standen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Wim Wätjen für die Vergabe dieses spannenden Themas, den wissenschaftlichen Rat, für das stets offene Ohr bei allen Problemen und für den freundlichen Umgang miteinander.

Ein besonderes Dankeschön gilt Sabrina Baier und Maximilian Groß für die konstruktiven Diskussionen, den fachlichen Austausch und die gute Zusammenarbeit. Vielen Dank an Dr. Christian Büchter für die fachlichen Denkanstöße.

Mein Dank gilt auch den Bachelor- und Masterstudierenden für die labortechnische Unterstützung während meiner Doktorandenzeit. Besonders möchte ich an dieser Stelle Clara Brauer, Alicia Chisari, Feline Frahm, Jennifer Matzner, Nora Meinhardt, Stephanie Storbeck, Lucia Taube und Jennifer Wermann danken. Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe für die tolle Arbeitsatmosphäre und die stets gute Laune im Labor.

Meiner Familie danke ich für den Rückhalt und die Unterstützung, die ich zu jeder Zeit erhalten habe.

Vielen Dank.

## 11 Eidesstattliche Erklärung / Declaration under Oath

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

I declare under penalty of perjury that this thesis is my own work entirely and has been written without any help from other people. I used only the sources mentioned and included all the citations correctly both in word or content.

01.02.2022

Datum / Date

Unterschrift des Antragstellers / Signature of the applicant

## 12 Publikationsliste

### Publikationen:

SAIER, C.; BÜCHTER, C.; KOCH, K.; WÄTJEN, W. (2018): *Polygonum multiflorum* Extract Exerts Antioxidative Effects and Increases Life Span and Stress Resistance in the Model Organism *Caenorhabditis elegans* via DAF-16 and SIR-2.1. *Plants* **7** (60), doi:10.3390/plants7030060

SAIER, C.; GOMMLICH, I.; HIEMANN, V.; BAIER, S.; KOCH, K.; HORN, G.; KOWALEWSKY, T.; BARTELT, J.; SEEMANN, M.; WÄTJEN, W. (2018): *Agrimonia procera* Wallr. Extract Increases Stress Resistance and Prolongs Life Span in *Caenorhabditis elegans* via Transcription Factor DAF-16 (FoxO Orthologue). *Antioxidants* **7** (129), doi:10.3390/antiox7120192

SAIER, C.; STORBECK, S.; BAIER, S.; DIETZ, H.; WÄTJEN, W. (2020): Rosemary extract modulates stress resistance and accumulation of reactive oxygen species in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *PharmaNutrition* **14**, 100233

BÜCHTER, C.; KOCH, K.; FREYER, M.; BAIER, S.; SAIER, C.; HONNEN, S.; WÄTJEN, W. (2020): The mycotoxin beauvericin impairs development, fertility and life span in the nematode *Caenorhabditis elegans* accompanied by increased germ cell apoptosis and lipofuscin accumulation. *Toxicology Letters* **334**, 102-109

### Buchkapitel:

KOCH, K.; BAIER, S.; SAIER, C.; WÄTJEN, W. (2019): *Caenorhabditis elegans*, a suitable model organism to investigate molecular mechanisms related to amyloid beta peptide. Daiana Silva de Avila (Hrsg.), *Caenorhabditis elegans – An Overview and Emerging Roles in Studying Disease* (S.161-213). Nova Science Publishers Inc.

### Vorträge:

Antioxidative und lebensverlängernde Effekte von *Agrimonia procera* im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*; Arbeitstagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (Regionalverband Süd-Ost) in Dresden (2019)

*Caenorhabditis elegans* als einfaches Modell für die Untersuchung protektiver Effekte pflanzlicher Extrakte auf neurodegenerative Krankheiten; Digitaler Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V. in Jena (2021)

**Posterpräsentationen:**

*Polygonum multiflorum* extract exerts antioxidant effects and increases stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*; 54. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V. in Kiel (2017)

*Polygonum multiflorum* extract exerts antioxidant effects and prolongs the life span of *Caenorhabditis elegans* via modulation of distinct cellular pathways; 55. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V. in Hohenheim (2018)

01.02.2022

Datum / Date

Unterschrift des Antragstellers / Signature of the applicant

## 13 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Christina Saier  
Geburtsdatum: 30.05.1992  
Geburtsort: Konstanz  
Geschlecht: weiblich  
Wohnsitz: Hafenstraße 42  
06108 Halle (Saale)  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Bildungsweg:

09/1998 - 08/2002 Grundschule Dettingen-Wallhausen  
09/2002 - 08/2011 Alexander-von-Humboldt-Gymnasium, Konstanz  
09/2011 - 08/2014 Studium der Ernährungswissenschaften (B. Sc.)  
Universität Hohenheim, Stuttgart  
09/2014 - 09/2017 Studium der Ernährungswissenschaften (M. Sc.)  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)  
01/2016 - 06/2016 Studium: Ciencia y Tecnología de los Alimentos  
(Auslandssemester) Universitat Politècnica de València,  
València, Spanien  
seit 01/2018 Promotion unter der Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Wim  
Wätjen  
AG Biofunktionalität sekundärer Pflanzenstoffe  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)

01.02.2022

Datum / Date

Unterschrift des Antragstellers / Signature of the applicant