

Einfluss von sekundären Pflanzenstoffen auf die Amyloid β -Toxizität im
Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*:
Vergleichende Untersuchung zur molekularen Wirkung von unsubstituierten,
methylierten und prenylierten Flavonoiden

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 Karoline Koch
geb. am 02.10.1987 in Leipzig

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Wim Wätjen
2. Prof. Dr. Gerlad Rimbach (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel)

Datum der Verteidigung: 20.11.2017

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wim Wätjen bedanken. Dank ihm konnte ich meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen. Seine kreativen Ideen und sein wissenschaftlicher Rat haben bis zuletzt sehr dazu beigetragen, die Arbeit in die richtigen Bahnen zu leiten.

An zweiter Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerald Rimbach für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Christian Büchter und Frau Dr. Susannah Havermann, von deren fachlichen und labortechnischen Expertisen ich sehr profitieren konnte. Vor allem möchte ich mich für die konstruktiven und offenen Diskussionen innerhalb der Arbeitsgruppe bedanken, die für die Entstehung und Auswertung der Daten eine große Hilfe waren.

Ich möchte mich auch bei den Bachelor- und Masterstudenten für die technische Assistenz während meiner Doktorandenzeit bedanken. Besonders erwähnen möchte ich hierbei Herrn Gabriel Schulz und Frau Nora Weldle.

An letzter Stelle möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir immer eine große Unterstützung war.

Inhalt

Inhalt.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Morbus Alzheimer.....	1
1.1.1 Die Amyloid-Hypothese	1
1.1.2 Morbus Alzheimer und oxidativer Stress.....	3
1.1.3 <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellsystem für Morbus Alzheimer	5
1.1.4 Insulin/Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1 Signalweg und Morbus Alzheimer	8
1.2 Ernährung zur Prävention von Morbus Alzheimer	11
1.2.1 Polyphenole.....	12
1.2.2 Flavonoide	13
1.2.2.1 Flavonole	14
1.2.2.2 Flavanone	17
1.2.2.3 Methylierte Flavonoide	18
1.2.2.4 Prenylierte Flavonoide.....	20
1.3 Zielsetzung	21
2 Material.....	22
2.1 Chemikalien.....	22
2.2 Naturstoffe.....	23
2.3 Lösungen und Puffer	25
2.4 Medien	26
2.5 Verbrauchsmaterialien	27
2.6 <i>C. elegans</i> -Stämme.....	28
2.7 Bakterienstämme.....	29
2.8 Geräte.....	29
2.9 Software	30
3 Methoden.....	31
3.1 <i>in vitro</i> -Methoden.....	31
3.1.1 Bestimmung der radikalfangenden Kapazität (TEAC-Assay)	31

	Inhalt
3.2	<i>in vivo</i> -Methoden 31
3.2.1	Kultivierung von <i>C. elegans</i> 31
3.2.2	Kultivierung von Bakterienstämmen..... 32
3.2.2.1	OP50 und OP50-1 <i>E. coli</i> 32
3.2.2.2	HT115 <i>E. coli</i> 33
3.2.3	Synchronisation von <i>C. elegans</i> 34
3.2.3.1	Bleichesynchronisation..... 34
3.2.3.2	Synchronisation per Eiablage..... 34
3.2.4	Naturstoffinkubation von <i>C. elegans</i> 34
3.2.5	Untersuchung der A β ₁₋₄₂ -induzierten Paralyse in <i>C. elegans</i> (A β ₁₋₄₂ -Toxizitätsassay) . 36
3.2.6	Bestimmung der Aggregation von Amyloid beta-Plaques in <i>C. elegans</i> (ThS-Assay) . 36
3.2.7	Bestimmung der ROS-Akkumulation in wildtypischen <i>C. elegans</i> unter thermalem Stress (Wildtyp-DCF-Assay) 37
3.2.8	Bestimmung der ROS-Akkumulation in transgenen <i>C. elegans</i> -Modell für Morbus Alzheimer unter thermalem Stress (A β -DCF-Assay) 38
3.2.9	Bestimmung der thermalen Stressresistenz in <i>C. elegans</i> (SYTOX-Assay)..... 38
3.2.10	Untersuchung der Lokalisation von GFP-gekoppelten Transkriptionsfaktoren (Fluoreszenzmikroskopie) 39
3.2.10.1	Untersuchung der DAF-16::GFP-Lokalisation in <i>C. elegans</i> 39
3.2.10.2	Untersuchung der SKN-1::GFP-Lokalisation in <i>C. elegans</i> 40
3.2.11	Untersuchung der HSP16.2- und MYOSIN-3-Proteinexpression in <i>C. elegans</i> 40
3.2.12	Größenmessung von <i>C. elegans</i> 41
3.2.13	Lebensspannanalyse von <i>C. elegans</i> 41
3.3	Statistik 42
4	Ergebnisse..... 43
4.1	Pflanzenextrakte..... 43
4.1.1	Modulation der A β ₁₋₄₂ -Toxizität im transgenen <i>C. elegans</i> -Modell für Morbus Alzheimer..... 43
4.2	Flavonoide 44
4.2.1	Modulation der A β ₁₋₄₂ -Toxizität im transgenen <i>C. elegans</i> -Modell für Morbus Alzheimer..... 44
4.2.2	Modulation der Aggregation von A β -Plaques im transgenen <i>C. elegans</i> -Modell für Morbus Alzheimer..... 46
4.2.3	Bestimmung der radikalfangenden Kapazität <i>in vitro</i> (TEAC-Assay)..... 48

4.2.4	Modulation der ROS-Akkumulation im transgenen <i>C. elegans</i> -Modell für Morbus Alzheimer unter thermalem Stress	50
4.2.5	Modulation der ROS-Akkumulation im Wildtypen unter thermalem Stress.....	52
4.2.6	Modulation der thermalen Stressresistenz im Wildtypen	54
4.2.7	Modulation der zellulären Lokalisation von GFP-gekoppelten Transkriptionsfaktoren .	56
4.2.7.1	Modulation der zellulären DAF-16-Lokalisation (Kurzzeitinkubation)	56
4.2.7.2	Modulation der zellulären DAF-16- und SKN-1-Lokalisation (Langzeitinkubation) ...	57
4.2.8	Modulation der HSP-16.2-Expression	59
4.3	Methylierte Flavonoide	62
4.3.1	Modulation der A β ₁₋₄₂ -Toxizität im transgenen <i>C. elegans</i> -Modell für Morbus Alzheimer.....	62
4.3.2	Modulation der Aggregation von A β -Plaques im transgenen <i>C. elegans</i> -Modell für Morbus Alzheimer.....	63
4.3.3	Bestimmung der radikalfangenden Kapazität <i>in vitro</i> (TEAC-Assay).....	64
4.3.4	Modulation der ROS-Akkumulation im transgenen <i>C. elegans</i> -Modell für Morbus Alzheimer unter thermalem Stress	65
4.3.5	Modulation der ROS-Akkumulation im Wildtypen unter thermalem Stress.....	66
4.3.6	Modulation der thermalen Stressresistenz im Wildtypen	67
4.3.7	Modulation der zellulären Lokalisation von GFP-gekoppelten Transkriptionsfaktoren .	68
4.3.7.1	Modulation der zellulären DAF-16-Lokalisation (Kurzzeitinkubation)	68
4.3.7.2	Modulation der zellulären DAF-16- und SKN-1-Lokalisation (Langzeitinkubation) ...	69
4.3.8	Modulation der HSP-16.2::GFP-Proteinexpression	70
4.4	Prenylierte Flavonoide.....	72
4.4.1	Modulation der A β ₁₋₄₂ -Toxizität im transgenen <i>C. elegans</i> -Modell für Morbus Alzheimer.....	72
4.4.2	Modulation der Aggregation von A β -Plaques im transgenen <i>C. elegans</i> -Modell für Morbus Alzheimer.....	73
4.4.3	Bestimmung der radikalfangenden Kapazität <i>in vitro</i> (TEAC-Assay).....	74
4.4.4	Modulation der ROS-Akkumulation im transgenen <i>C. elegans</i> -Modell für Morbus Alzheimer unter thermalem Stress	75
4.4.5	Modulation der ROS-Akkumulation im Wildtypen unter thermalem Stress.....	76
4.4.6	Modulation der thermale Stressresistenz im Wildtypen	77
4.4.7	Modulation der zellulären Lokalisation von GFP-gekoppelten Transkriptionsfaktoren .	78
4.4.7.1	Modulation der zellulären DAF-16-Lokalisation (Kurzzeitinkubation)	78

4.4.7.2	Modulation der zellulären DAF-16- und SKN-1-Lokalisation (Langzeitinkubation) ...	79
4.4.8	Modulation der HSP-16.2::GFP-Expression.....	80
4.5	Modulation der A β -Toxizität durch Flavonoide in transgenen <i>C. elegans</i> unter <i>daf-16</i> RNAi-Bedingungen	81
4.5.1	Modulation der A β ₁₋₄₂ -Toxizität durch Quercetin und Q-3-M unter <i>daf-16</i> RNAi-Bedingungen	81
4.5.2	Modulation der A β ₁₋₄₂ -Toxizität durch prenylierte Flavonoide unter <i>daf-16</i> RNAi-Bedingungen	83
4.6	Ergebnisübersicht.....	85
5	Diskussion	86
5.1	Modulation der A β ₁₋₄₂ -Toxizität und A β -Aggregation durch Flavonoide in <i>C. elegans</i>	86
5.2	antioxidative Eigenschaften von Flavonoiden <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	91
5.3	Einfluss von Flavonoiden auf die Stressresistenz in <i>C. elegans</i>	97
5.4	Modulation des ILS durch Flavonoide in <i>C. elegans</i>	98
5.4.1	Einfluss von Flavonoiden auf die nukleäre Translokation von GFP-gekoppelten Transkriptionsfaktoren.....	99
5.4.2	Modulation der A β ₁₋₄₂ -Toxizität durch Flavonoide in <i>C. elegans</i> unter <i>daf-16</i> RNAi-Bedingungen	102
5.5	Schlussfolgerung	104
6	Zusammenfassung	106
7	Literaturverzeichnis	XVI
8	Anhang	XLIII
8.1	Ergänzende Ergebnisse	XLIII
8.1.1	Vorversuche:	XLIII
8.1.1.1	Austestung des Paralyseverhaltens und Konzentrationsfindung	XLIII
8.1.1.2	<i>Daf-16</i> RNAi-knock down	XLIV
8.1.1.3	CL4176 DCF	XLV
8.1.1.4	Positivkontrolle für die SKN-1::GFP Translokation in den Zellkern.....	XLV
8.1.1.5	Etablierung der HSP-16.2::GFP-Messung im Plattenlesegerät	XLVI
8.1.1.6	Etablierung der MYOSIN-4::GFP-Messung im Plattenlesegerät	XLVII
8.1.2	Einfluss von Flavanonen auf die A β ₁₋₄₂ -Toxizität	XLVIII
8.1.3	Modulation der zellulären DAF-16-Lokalisation in <i>C. elegans</i> durch Pflanzenextrakte.....	XLIX
8.1.4	Einfluss von Lignanenen auf biologische Parameter in <i>C. elegans</i>	L

8.1.4.1	Modulation der A β ₁₋₄₂ -Toxizität im transgenen <i>C.elegans</i> -Modell für Morbus Alzheimer.....	L
8.1.4.2	Modulation der ROS-Akkumulation im Wildtypen unter thermalem Stress.....	LI
8.1.4.3	Modulation der ROS-Akkumulation in der <i>mev-1</i> -Mutante.....	LII
8.1.4.4	Bestimmung der radikalfangenden Kapazität <i>in vitro</i> (TEAC-Methode)	LII
8.1.4.5	Modulation der thermalen Stressresistenz im Wildtypen	LIII
8.1.4.6	Modulation der thermalen Stressresistenz in der <i>mev-1</i> -Mutante	LIV
8.1.4.7	Modulation der zellulären DAF-16::GFP-Lokalisation (Kurzzeitinkubation)	LV
8.1.4.8	Einfluss von Pino auf Lebensspanne im Wildtypen und in der <i>mev-1</i> Mutante	LVI
8.2	Rohdaten	LVII
9	Eidesstattliche Erklärung/ <i>Declaration under Oath</i>	CXLI
10	Publikationsliste.....	CXLII
11	Lebenslauf	CXLIV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Prozessierung von A β -Peptide aus dem APP.....	2
Abbildung 2: A. Anatomie und B. Lebenszyklus eines adulten <i>C. elegans</i>	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des A β ₁₋₄₂ -Genkonstruktes im transgenen <i>C. elegans</i> -Modell für Morbus Alzheimer.	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung des humanen FoxO bzw. <i>C. elegans daf-16</i> Gens.	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung des ILS in <i>C. elegans</i> und im Menschen.	9
Abbildung 6: Einfluss des ILS auf die Pathogenese von Morbus Alzheimer.	11
Abbildung 7: Grundstruktur der Polyphenole, das Phenol (A) und der Flavonoide, das Flavan (B), ein Benzopyranderivat.	12
Abbildung 8: Strukturen ausgewählter Flavonole.....	17
Abbildung 9: Strukturen ausgewählter Flavanone.	18
Abbildung 10: Strukturen methylierter Quercetinderivate.	19
Abbildung 11: Strukturen ausgewählter methylierter und prenylierter Verbindungen.....	20
Abbildung 12: Schematische Darstellung des HT115-Klonierungsvektors.....	33
Abbildung 13: Übersicht der Inkubationsschemata.....	35
Abbildung 14: Thioflavin S, Fluoreszenzfarbstoff für die Markierung von A β Plaques.	37
Abbildung 15: Schematische Darstellung des <i>daf-16a/B::gfp</i> -Genkonstrukts im transgenen <i>C. elegans</i> Stamm TJ356.	39
Abbildung 16: Schematische Darstellung des <i>skn-1b/c::gfp</i> -Genkonstrukts im transgenen <i>C. elegans</i> Stamm LD001.....	40
Abbildung 17: Schematische Darstellung des <i>hsp-16.2::gfp</i> -Genkonstrukts im transgenen <i>C. elegans</i> Stamm CL2070.....	40
Abbildung 18: Schematische Darstellung des <i>myo-3p::GFP-LacZ(NLS) + myo-3p::mitochondrial gfp</i> -Genkonstrukts im transgenen <i>C. elegans</i> Stamm PD4251.	41
Abbildung 19: Einfluss von Pflanzenextrakten auf die A β ₁₋₄₂ -Toxizität in <i>C. elegans</i>	43
Abbildung 20: Einfluss von Flavonoiden auf die A β ₁₋₄₂ - Toxizität in <i>C. elegans</i>	45
Abbildung 21: Einfluss von Flavonolen auf die Akkumulation von ThS-positiven A β -Plaques in <i>C. elegans</i>	47
Abbildung 22: Einfluss von Flavanonen auf die Akkumulation von ThS-positiven A β -Plaques in <i>C. elegans</i>	48
Abbildung 23: Antioxidative Kapazität von Flavonolen <i>in vitro</i> in einem zellfreien System.	49
Abbildung 24: Antioxidative Kapazität von Flavanonen <i>in vitro</i> in einem zellfreien System.	50

Abbildung 25: Einfluss von Flavonoiden auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im transgenen A β ₁₋₄₂ -exprimierenden <i>C. elegans</i> -Stamm unter thermalem Stress.....	51
Abbildung 26: Einfluss von Flavonoiden auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im wildtypischen <i>C. elegans</i> -Stamm unter thermalem Stress.	53
Abbildung 27: Einfluss von Flavonoiden auf das Überleben von wildtypischen <i>C. elegans</i> unter thermalem Stress.	55
Abbildung 28: Beispielhafte Darstellung zytosolischer und nukleärer DAF-16::GFP-Lokalisation im transgenen <i>C. elegans</i> -Stamm TJ356.	56
Abbildung 29: Einfluss von Flavonoiden auf die zelluläre DAF-16-Lokalisation in <i>C. elegans</i> (Kurzzeitinkubation).....	57
Abbildung 30: Beispielhafte Darstellung zytosolischer und nukleärer SKN-1::GFP-Lokalisation im transgenen <i>C. elegans</i> -Stamm LD001.....	58
Abbildung 31: Einfluss von Flavonoiden auf die zelluläre DAF-16- und SKN-1-Lokalisation in <i>C. elegans</i> (Langzeitinkubation).	59
Abbildung 32: Beispielhafte Darstellung der HSP-16.2::GFP- und MYOSIN-3::GFP-Expression in <i>C. elegans</i>	60
Abbildung 33: Einfluss von Flavonoiden auf die HSP-16.2::GFP-Expression in <i>C. elegans</i> (Langzeitinkubation).	61
Abbildung 34: Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf die A β ₁₋₄₂ -Toxizität in <i>C. elegans</i>	62
Abbildung 35: Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf die Akkumulation von ThS-positiven A β -Plaques in <i>C. elegans</i>	64
Abbildung 36: Antioxidative Kapazität von methylierten Quercetinderivaten <i>in vitro</i> in einem zellfreien System.....	65
Abbildung 37: Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im transgenen A β ₁₋₄₂ -exprimierenden <i>C. elegans</i> -Stamm unter thermalem Stress.....	66
Abbildung 38: Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im wildtypischen <i>C. elegans</i> -Stamm unter thermalem Stress.....	67
Abbildung 39: Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf das Überleben von wildtypischen <i>C. elegans</i> unter thermalem Stress.....	68
Abbildung 40: Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf die zelluläre DAF-16-Lokalisation in <i>C. elegans</i> (Kurzzeitinkubation).	69
Abbildung 41: Einfluss von Quercetin und Q-3-M auf die zelluläre DAF-16- und SKN-1-Lokalisation in <i>C. elegans</i> (Langzeitinkubation).....	70
Abbildung 42: Einfluss von Quercetin und Q-3-M auf die HSP-16.2::GFP-Expression in <i>C. elegans</i> (Langzeitinkubation).	71

Abbildung 43: Einfluss einer Prenylierung und Methylierung von Naringenin auf die A β ₁₋₄₂ -Toxizität in <i>C. elegans</i>	72
Abbildung 44: Einfluss einer Prenylierungen und Methylierung von Naringenin auf die Akkumulation von ThS-positiven A β -Plaques in <i>C. elegans</i>	74
Abbildung 45: Antioxidative Kapazität von prenylierten und methylierten Naringeninderivaten <i>in vitro</i> in einem zellfreien System.	75
Abbildung 46: Einfluss einer Prenylierung und Methylierung von Naringenin auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im transgenen A β ₁₋₄₂ -exprimierenden <i>C. elegans</i> -Stamm unter thermalem Stress.	76
Abbildung 47: Einfluss einer Prenylierung und Methylierung von Naringenin auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im wildtypischen <i>C. elegans</i> -Stamm unter thermalem Stress.	77
Abbildung 48: Einfluss einer Prenylierung und Methylierung von Naringenin auf das Überleben von wildtypischen <i>C. elegans</i> unter thermalem Stress.	78
Abbildung 49: Einfluss einer Prenylierung und Methylierung von Naringenin auf die zelluläre DAF-16-Lokalisation in <i>C. elegans</i> (Kurzzeitinkubation).	79
Abbildung 50: Einfluss einer Prenylierung von Naringenin auf die zelluläre DAF-16- und SKN-1-Lokalisation in <i>C. elegans</i> (Langzeitinkubation).	79
Abbildung 51: Einfluss einer Prenylierung von Naringenin auf die HSP-16.2::GFP-Expression in <i>C. elegans</i> (Langzeitinkubation).	80
Abbildung 52: Einfluss von Quercetin und Q-3-M auf die A β ₁₋₄₂ -induzierte Toxizität in <i>C. elegans</i> unter <i>daf-16</i> RNAi Bedingungen.	82
Abbildung 53: Einfluss von prenylierten Naringeninderivaten auf die A β ₁₋₄₂ -induzierte Toxizität in <i>C. elegans</i> unter <i>daf-16</i> RNAi Bedingungen.	84
Abbildung 54: Modifikationen an der Struktur von Quercetin beeinflussen die Bioaktivität im Morbus Alzheimer-Stamm CL4176.	90
Abbildung 55: Modifizierungen von Naringenin erhöhen die protektive Wirkung gegenüber der A β ₁₋₄₂ -Toxizität in <i>C. elegans</i>	91
Abbildung 56. Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von spezifischen Flavonoiden gegenüber der A β ₁₋₄₂ -Toxizität in <i>C. elegans</i>	105
Anh. Abbildung 57: Vorversuch zur Etablierung des Protokolls zur Untersuchung der A β ₁₋₄₂ -induzierten Paralyse in <i>C. elegans</i> (A β ₁₋₄₂ -Toxizität).	XLIII
Anh. Abbildung 58: <i>Daf-16</i> RNAi-knock down in TJ356 Nematoden.	XLIV
Anh. Abbildung 59: A β ₁₋₄₂ -induzierte Paralyse im <i>C. elegans</i> Stamm CL4176 unter <i>daf-16</i> RNAi-Bedingungen.	XLIV
Anh. Abbildung 60: Vergleichende Untersuchung der ROS-Akkumulation in den <i>C. elegans</i> -Stämmen CL4176 und CL802.	XLV

Anh. Abbildung 61: Einfluss von verschiedenen Stressoren auf die SKN-1::GFP-Lokalisation in <i>C. elegans</i> .	XLV
Anh. Abbildung 62: Vorversuch zur Etablierung der HSP-16.2::GFP-Messung in <i>C. elegans</i> mittels Plattenlesegerät.	XLVI
Anh. Abbildung 63: Vorversuch zur Etablierung der MYOSIN-3::GFP-Messung in <i>C. elegans</i> mittels Plattenlesegerät als Indikator für die Größe der Tiere.	XLVII
Anh. Abbildung 64: Einfluss von Flavanonen auf die A β ₁₋₄₂ -induzierte Toxizität in <i>C. elegans</i> .	XLVIII
Anh. Abbildung 65: Einfluss von HE und HOE auf die zelluläre DAF-16-Lokalisation in <i>C. elegans</i> (Kurzzeitinkubation).	XLIX
Anh. Abbildung 66: Lignane haben keinen Einfluss auf die A β ₁₋₄₂ -Toxizität in <i>C. elegans</i> .	L
Anh. Abbildung 67: Lignane haben keinen Einfluss auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im wildtypischen <i>C. elegans</i> -Stamm unter thermalem Stress.	LI
Anh. Abbildung 68: Lignane haben keinen Einfluss auf die intrazelluläre ROS-Konzentration in der <i>mev-1</i> -Mutante unter thermalem Stress.	LII
Anh. Abbildung 69: Antioxidative Kapazität von Lignanen <i>in vitro</i> in einem zellfreien System. Pino und SB zeigen eine starke antioxidative Aktivität.	LII
Anh. Abbildung 70: Lignane haben keinen Einfluss auf das Überleben von wildtypischen <i>C. elegans</i> unter thermalem Stress.	LIII
Anh. Abbildung 71: Einfluss von Lignanen auf das Überleben der <i>mev-1</i> Mutante unter thermalem Stress: die Inkubation mit Pino verlängert das Überleben unter thermalem Stress.	LIV
Anh. Abbildung 72: Einfluss von Lignanen auf die DAF-16::GFP-Lokalisation in <i>C. elegans</i> (Kurzzeitinkubation): die Inkubation mit Pino induziert die nukleäre DAF-16::GFP-Translokation.	LV
Anh. Abbildung 73: Die Pino-Behandlung hat keinen Einfluss auf die Lebensspanne von A. wildtypischen (N2) und B. <i>mev-1</i> -defizienten (TK22) <i>C. elegans</i> .	LVI

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einfluss von Pflanzenextrakten auf die Paralyse im transgenen <i>C. elegans</i> -Stamm CL4176.....	44
Tabelle 2: Einfluss von Flavonoiden auf die Paralyse im transgenen <i>C. elegans</i> -Stamm CL4176.....	46
Tabelle 3: Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf die Paralyse im transgenen <i>C. elegans</i> -Stamm CL4176.....	63
Tabelle 4: Einfluss von Quercetin und Q-3-M auf die Paralyse im transgenen <i>C. elegans</i> -Stamm CL4176 unter <i>daf-16</i> RNAi Bedingungen.....	81
Tabelle 5: Einfluss einer Methylierung und Prenylierung von Naringenin auf die Paralyse im transgenen <i>C. elegans</i> -Stamm CL4176.....	73
Tabelle 6: Einfluss von 8-PN und 6-PN auf die Paralyse im transgenen <i>C. elegans</i> -Stamm CL4176 unter <i>daf-16</i> RNAi Bedingungen.....	83
Tabelle 7: Ergebnisübersicht aller Experimente.....	85

Abkürzungsverzeichnis

$\alpha 7nAChR$	$\alpha 7$ nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
A β	Amyloid beta
ABTS	Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat
AChE	Acetylcholinesterase
Amp	Ampicillin
Apo	Apoprotein
APP	A β -Präkursorprotein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	<i>β-site of APP cleaving enzyme</i> / β -Sekretase
BSA	bovines Serumalbumin
CAT	Katalase
CDK	Cyclin-abhängigen Kinase
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CYP	Cytochrome P450
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DCF	Dichlorofluorescein
<i>daf</i>	Dauergen (<i>abnormal DAuer Formation</i>)
DASH	<i>Dietary Approaches to Stop Hypertension</i>
dd	doppelt destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPH	2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazelluläres Signal-regulierte Kinase

FoxO	<i>Forkhead box</i> (winged-helix DNA-Bindungsdomäne) Transkriptionsfaktoren der Klasse O
EtOH	Ethanol
FUDR	5-Fluoro-2'-deoxyuridin
GCS	Glutamatcysteinligase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GOI	<i>gene of interest</i> (zu untersuchendes Gen)
GPO	Glutathionperoxidase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GST	Glutathion-S-Transferase
HE	Hibiskus-Extrakt
HO	Hämoxygenase
HOE	Hopfen-Extrakt
H ₂ DCF-DA	2', 7' -Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
HSF	Hitzeschockfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
HSR	Hitzeschock-Antwort
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IGF-1-R	IGF-1-Rezeptor
ILS	Insulin/IGF-1 Signalweg
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
ISK	Isosakuranetin
KBE	koloniebildende Einheiten
KR	konservierte Region
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LQ	Liquiritigenin

LPH	Lactase-Phlorizin-Hydrolase
LTP	Langzeitpotenzierungen
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase(n)
MDA	Malondialdehyd
MIND	<i>Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay</i>
MKS	Multiple Klonierungsstelle
mRNA	<i>messenger RNA</i>
<i>MtLS</i>	mitochondriale Lokalisierungssequenz
mTOR	mammalian target of rapamycin
<i>myo-3</i>	<i>MYOsin heavy chain structural gene</i>
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NAD ⁺	oxidierte Form
NADH	reduzierte Form
NADP	NAD-Phosphat
NADP ⁺	oxidierte Form
NADPH	reduzierte Form
NES	nukleäre Exportsequenz
NF	nukleärer Faktor
NGMk	Nematoden-Wachstumsmedium komplett
NLS	nukleäre Lokalisierungssequenz
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO•	Stickoxidradikal
NOS	NO-Synthase
Nrf	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like</i>
OD	Optische Dichte
ÖR	Östrogenrezeptor
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
Pino	Pinoresinol
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK	Phosphoinositol-abhängige Kinase
PFA	Paraformaldehyd

Pino	Pinoresinol
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PN	Prenylnaringenin
PTL-1	<i>protein with tau-like repeats 1</i>
Q-3-M	Quercetin-3-Methylether
RAGE	<i>receptor for advanced glycation end products</i>
RFE	Relative Fluoreszenzeinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RO•	Alkyradikal
ROO•	Peroxyradikal
rpm	<i>revolution per minute</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RSNO	Nitrosylierung
RSOH	Sulfenrest
RSO ₂ H	Sulfinsäurerest
RSO ₃ H	Sulfonsäurerest
RSSG	Glutathionylierungen
RT	Raumtemperatur
SB	Schisandrin B
Seco	Secoisolariciresinol
SGK	Serumglukokortikoide regulierte Kinase
SGLT-1	Natrium-abhängiger Glukose-Transporter
sHSP	kleines HSP
Skn	SKiNhead
smg-1	<i>suppressor with morphological effect on Genitalia</i>
SOD	Superoxiddismutase
SPS	sekundäre Pflanzenstoffe
Strep	Streptomycin

T	Tween
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidative Capacity</i>
Tet	Tetracyclin
ThS	Thioflavin S
UTR	untranslatierte Region
ZM	Zellmembran

1 Einleitung

1.1 Morbus Alzheimer

1.1.1 Die Amyloid-Hypothese

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, die durch den progressiven Kognitionsverlust gekennzeichnet ist. Seit die Erkrankung durch Alois Alzheimer 1906 zum ersten Mal beschrieben wurde, steht noch immer die Aufklärung des molekularen Pathomechanismus im Fokus der pharmazeutischen Forschung. Geeignete Präventions-, Behandlungs- oder gar Heilungsstrategien waren bisher wenig erfolgreich. Gedächtnisstörungen stellen sich bei 95 % der Patienten erst in einem Alter von über 65 Jahren ein. Bei diesen Patienten wird von einem senilen Alzheimer gesprochen, wohingegen ein geringer Anteil der Patienten den präsenilen Alzheimer-Typ entwickeln, d. h. bereits vor dem 65. Lebensjahr erkrankt (Finckh 2006). Der symptomatische Verlauf der Erkrankung steht dabei im engen Zusammenhang mit charakteristischen Veränderungen im Gehirn. Zu diesen gehören Ansammlungen von senilen Plaques und neurofibrillären Bündeln, das Absterben von Nervenzellen und die Atrophie des Gehirngewebes (Übersichtsartikel von Haass & Selkoe 2007). Der Zusammenhang der pathologischen Erscheinungen wird mit der derzeit vorherrschenden „Amyloid“-Hypothese erklärt. Den Ausgangspunkt stellen hierbei die amyloidogenen Peptide Amyloid β ($A\beta$) dar, welche oligomerisieren, Fibrillen bilden und sich schließlich in unlöslichen Plaques ablagern. Das $A\beta$ -Peptid entsteht durch proteolytische Spaltung aus dem $A\beta$ -Präkursorprotein (APP), ein transmembranes Rezeptor-ähnliches Protein, das ubiquitär exprimiert wird. Unter physiologischen Bedingungen vermittelt das APP die synaptische und Zelladhäsion und ist somit für Nährstoffversorgung und Wachstum der Neuronen wichtig (Übersichtsartikel von Müller & Zheng 2012). Das codierende Gen für das APP liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 21 (Kang *et al.* 1987). Down-Syndrom-Patienten, welche ein Triplikat dieses Chromosoms aufweisen, haben folglich ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Morbus Alzheimer. Die intramembrane Proteolyse von dem APP wird von spezialisierten Sekretasen vermittelt, die den amyloidogenen Charakter von $A\beta$ -Peptiden bestimmen. Im vorherrschenden nicht-amyloidogenen Weg spalten α -Sekretasen eine große N-terminale Ektodomäne ($sAPP\alpha$) an Position C83 (83 Aminosäuren (AS) vom C-Terminus) von dem APP ab, welche anschließend in den Extrazellularräum sezerniert wird (Abb. 1). Da die Spaltung innerhalb der $A\beta$ -Domäne stattfindet, entstehen keine $A\beta$ -Peptide. Während das $sAPP\alpha$ synaptotrophische und neuroprotektive Eigenschaften aufweist, übernimmt das verbleibende transmembrane APP-Stück intrazelluläre Signaltransduktionsfunktionen (Übersichtsartikel von Müller & Zheng 2012). Im amyloidogenen Weg spaltet eine alternative Protease, die β -Sekretase (BACE), die N-terminale Ektodomäne $sAPP\beta$ an Position C99 ab, welche ebenfalls in den Extrazellularräum gelangt. Das verbleibende transmembrane APP-Stück wird anschließend von einem γ -Sekretasekomplex nach AS 38, 40 oder 42 geschnitten, wodurch $A\beta$ -Peptide freigesetzt werden. Die $A\beta_{1-42}$ -Variante neigt aufgrund ihrer Länge zur Oligomerisierung und Fibrillisierung und ist daher die vorherrschende Form in den $A\beta$ -Plaques (Abb. 1). $A\beta_{1-42}$ -Fibrillen weisen eine typische β -Faltblattstruktur auf, die mit entsprechenden Farbstoffen, wie Thioflavin S (ThS), gebunden und somit nachgewiesen werden können (Kelényi 1967). Mutationen im APP oder in Komponenten des

γ -Sekretasekomplexes führen zum präsenilen Morbus Alzheimer, der autosomal-dominant vererbt wird (Übersichtsartikel von Haass & Selkoe 2007, LaFerla *et al.* 2007).

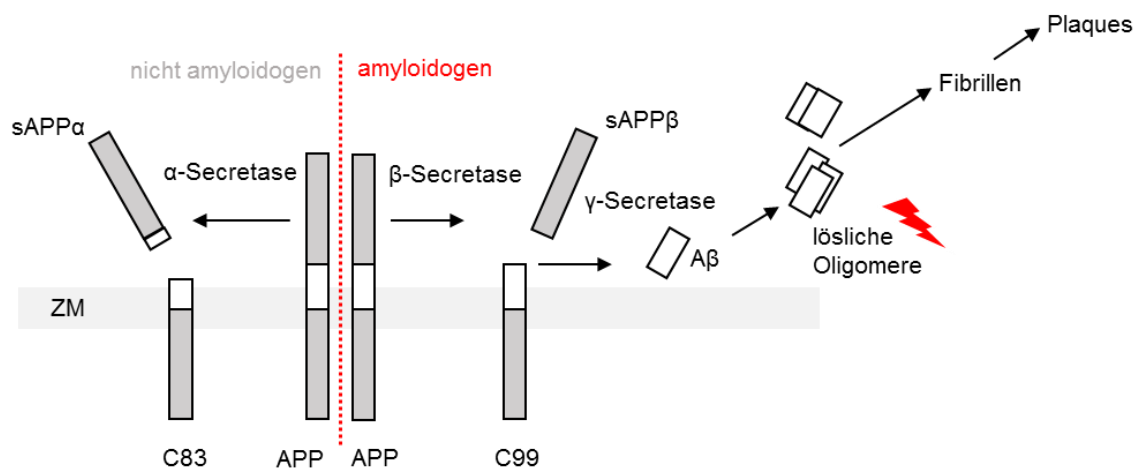


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Prozessierung von Aβ-Peptide aus dem APP. Modifiziert nach LaFerla *et al.* (2007). APP = Aβ-Präkursorprotein, ZM = Zellmembran.

Da im Gehirn von Morbus Alzheimer-Patienten *post mortem* Aβ-Plaques in unmittelbarer Umgebung von dystrophischen Neuriten lokalisiert sind, wurden jene Ablagerungen in der Vergangenheit mit der Degeneration von Nervenzellen assoziiert (Tsai *et al.* 2004). In vielen Studien konnte jedoch keine eindeutige Assoziation zwischen der Anzahl von Aβ-Plaques und der Progression der Erkrankung festgestellt werden (Übersichtsartikel von Haass & Selkoe 2007). Darüber hinaus weisen auch einige asymptotische Menschen Aβ-Ablagerungen im Gehirn auf (Iacono *et al.* 2009). Nach derzeitigem Stand der Wissenschaft stehen lösliche oligomere Aβ-Verbindungen in einem engeren Zusammenhang mit dem Gedächtnisverlust als die Plaques. Diese toxischen Aβ-Spezies können synaptische bzw. postsynaptische Kompartimente angreifen (Selkoe 2002). Wiederholte hochfrequente elektrische Stimulierungen von Synapsen, sogenannte Langzeitpotenzierungen (LTPs), im Hippocampus führen zur synaptischen Plastizität und sind daher für die Gedächtnisbildung verantwortlich. Eine Vielzahl von elektrophysiologischen Studien konnte zeigen, dass lösliche Aβ-Oligomere von der Variante 42 die Erhaltung der LTPs im Hippocampus *in vitro* und *in vivo* stören, wohingegen Aβ-Plaques keine Wirkung zeigten (Walsh *et al.* 2002, Townsend *et al.* 2006, Shankar *et al.* 2008). Des Weiteren sind die Aβ₁₋₄₂-Oligomere neurotoxisch im PC12-Zellmodell (Ono *et al.* 2009) und scheinen die Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen, die zur Bildung der charakteristischen neurofibrillären Bündeln im Gehirn von Morbus Alzheimer-Patienten führt, zu induzieren (Übersichtsartikel von Selkoe *et al.* 2016). Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das für die Zytoskelettstabilität essentiell ist. Bei der Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen kommt es zur Oligomerisierung bis hin zur Fibrillierung. Diese neurofibrillären Bündel führen zur neuronalen Dysfunktion und schließlich zum Untergang der Zelle (Übersichtsartikel von Haass & Selkoe 2007). Aus diesem Grund wird angenommen, dass phosphorylierte Tau-Proteine die Gehirnatrophie vermitteln und den Krankheitsverlauf maßgeblich bestimmen. Die Aβ-Oligomere können neben der Modulation der Tau-Proteine auch über die Bindung an spezifische Zellrezeptoren Signalwege beeinflussen. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass

A β -Peptide an N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-, $\alpha 7$ nikotinischen Acetylcholin- ($\alpha 7$ nACh), Apoprotein (Apo) E-Rezeptoren und *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) binden (Nagele *et al.* 2002, Deane *et al.* 2003, Snyder *et al.* 2005, Bu *et al.* 2006). Daneben weisen immer mehr Studien darauf hin, dass intrazelluläre A β -Peptide, die entweder aus anderen membranhaltigen Zellkomponenten durch proteolytische Spaltung aus dem APP entstehen oder aus extrazellulären A β -Pools durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden, mit dem Ubiquitin-Proteasom-System interferieren und zu einer Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen können (Übersichtsartikel von LaFerla *et al.* 2007).

Zusammenfassend besagt die Amyloid-Hypothese, dass das zur Oligomerisierung neigende A β_{1-42} -Peptid eine Vielzahl von biochemischen Veränderungen induziert, die z.T. durch eine Fehlregulation zellulärer Signalwege hervorgerufen werden und somit die zelluläre Homöostase stören. Damit einhergehend kommt es zur Bildung von neurofibrillären Bündeln, die zur weiteren Neurodegeneration beitragen, und zur Aktivierung entzündlicher Prozesse. Der Untergang der Neuronen resultiert schließlich in einer Neurotransmitterverarmung, was durch die progressive Abnahme der Kognition gekennzeichnet ist (Übersichtsartikel von Haass & Selkoe 2007). Der Alterungsprozess begünstigt durch die Abnahme der Proteinhomöostase und die Zunahme von ROS die Ansammlung von amyloidogenen Proteinen und somit die zelluläre Dysfunktion (Übersichtsartikel von Douglas & Dillin 2010).

1.1.2 Morbus Alzheimer und oxidativer Stress

Oxidativer Stress wird als jener zellulärer Status definiert, bei dem das Gleichgewicht zwischen Antioxidantien und Prooxidantien zur Seite der Prooxidantien hin verschoben ist (Sies 1985). Als Prooxidantien werden freie Radikale bezeichnet, die aus endogenen oder exogenen Quellen stammen können. Im aeroben Organismus entstehen bei der Reduktion von Sauerstoff (O₂) zu Wasser (H₂O) freie Sauerstoffradikale. Als Zwischenprodukte werden Superoxidanionenradikale (O₂^{•-}), Hydrogenperoxide (H₂O₂) und Hydroxylradikale (•OH) gebildet. Weiterhin kann (Triplet)-Sauerstoff zu Singulett-Sauerstoff (¹O₂) elektronisch angeregt werden. Greift ein Sauerstoffradikal andere Moleküle an, können Alkyl (RO•)- und Peroxylradikale (ROO•) oder auch Stickoxidradikale (NO•) entstehen. NO• können wiederum mit O₂^{•-} hochreaktives Peroxynitrit bilden. Die ROS-Produktion findet bei aeroben Organismen hauptsächlich in den Mitochondrien am Komplex I und III der Elektronentransportkette statt. Daneben werden ROS in den Peroxisomen und im Zytosol von verschiedenen Enzymen wie der Xanthinoxidase, Cyclooxygenase, Lipoxygenase und den Cytochrom P450-(CYP) Enzymen gebildet (Übersichtsartikel von Finkel & Holbrook 2000). Phagozytierende Zellen besitzen außerdem Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NADPH)-Oxidasen, die O₂^{•-} bilden, um einerseits Bakterienzellen abzutöten und andererseits die inflammatorische Antwort der Immunzellen zu organisieren. Bei Letzterem dienen ROS als Signalmoleküle, die die Produktion von Zytokinen stimulieren (Übersichtsartikel von Forman & Torres 2002). NADPH-Oxidasen werden jedoch auch in vielen anderen Zellen exprimiert, in denen die gebildeten ROS die Genexpression, Proliferation, Differenzierung, Migration und den Zelltod regulieren (Übersichtsartikel von Brown & Griendling 2009). Neben O₂^{•-} können Makrophagen Bakterienzellen mit NO• abtöten, welches von der induzierbaren NO-Synthase gebildet wird (Stuehr *et al.* 1991). Zugleich wirkt NO• als Signalmolekül und wird von Endothelzellen und Neuronen über die endotheliale bzw. neuronale NOS gebildet. NO• fungiert hierbei

als Regulator der Vasodilatation im Endothel oder übernimmt eine Neurotransmitterfunktion in den Nervenzellen (Busse & Mülsch 1990, Übersichtsartikel von Mungrue & Bredt 2004). Die endogene Entstehung von ROS wird außerdem durch das Vorhandensein von Schwermetallen begünstigt. In der Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion, wird beispielsweise Eisen oxidiert, wobei als Nebenprodukt hochreaktives $\bullet\text{OH}$ entsteht (Halliwell & Gutteridge 1984). Des Weiteren können über die Nahrung oder Chemotherapeutika ROS-generierende Substanzen aufgenommen werden (Sies 1993, Übersichtsartikel Finkel & Holbrook 2000).

Die Gegenspieler der Oxidantien sind die Antioxidantien. Diese liegen in niedrigen Konzentrationen in der Zelle vor und verzögern oder inhibieren die Oxidation von Substraten. Das antioxidative Abwehrsystem der Zelle setzt sich aus nicht-enzymatischen und enzymatischen Molekülen zusammen (Sies 1993). Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen Radikalfänger, wie Plasmaproteine, Pyruvat, Urate, das Coenzym Q oder Metallchelatoren (Sies 1985, Sies 1993). Das Tripeptid Glutathion (GSH) stellt ein besonders wichtiges Antioxidans dar, da es in humanen Zellen im millimolaren Konzentrationsbereich vorkommen kann (Chance *et al.* 1979). Zu den antioxidativen Enzymen zählen die in Zytosol und Mitochondrien befindlichen Superoxiddismutasen (SOD), die $\text{O}_2\bullet^-$ zu H_2O_2 umwandeln. Hydroperoxidasen entfernen anschließend das gebildete H_2O_2 , wobei H_2O als Endprodukt entsteht. Zu dieser Enzymfamilie gehören vor allem Glutathionperoxidasen (GPO) und Katalasen (CAT) (Sies 1985). Peroxiredoxine konvertieren ebenfalls H_2O_2 zu H_2O (Kang *et al.* 1998). Unterstützende Systeme stellen Reduktionsequivalente für die antioxidativen Enzyme bereit, wie z. B. die Glutathion-Reduktase (GR), die GSH zur Verfügung stellt, oder diverse NADPH-Regenerationssysteme (Sies 1985).

Ein ausgeglichener Haushalt zwischen Prooxidantien und Antioxidantien ist zum einen essentiell um die Zelle vor oxidativen Schäden zu schützen und zum anderen um wichtige Zellfunktionen und damit die zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten. Die entstanden ROS können Makromoleküle, die für Struktur und Funktion der Zelle notwendig sind, angreifen. Auf diesem Wege werden beispielsweise Membranlipide, Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Basen, Kohlenhydrate und Proteine modifiziert (Übersichtsartikel von Janero 1990, Halliwell 1994, Übersichtsartikel von Stadtman 2006). Harman formulierte bereits 1956 die „freie Radikal-Theorie“ (*Free Radical Theory*), welche besagt, dass der Angriff freier Radikale auf Zellbestandteile den Alterungsprozess und die Entstehung degenerative Erkrankungen forciert (Harman 1956). Diese Theorie wurde später durch Einbezug des Ungleichgewichtes zwischen Antioxidantien und Oxidantien erweitert und als „oxidativen Stress-Hypothese des Alterns“ bezeichnet (Sohal & Allen 1990). Wie bereits erwähnt ist die Produktion von ROS in bestimmten Situationen, wie bei der Pathogenabwehr, erwünscht. Des Weiteren werden geringe intrazelluläre ROS-Konzentrationen für die Signaltransduktion z. B. in der Immunantwort, Zellproliferation und -differenzierung und dem programmierten Zelltod benötigt (Übersichtsartikel von Seifried *et al.* 2007). Reaktive Cystein-Thiole in den aktiven Zentren von regulatorischen Proteinen stellen dabei eine Schlüsselkomponente dar. H_2O_2 oxidieren die Cysteinreste zum Sulfenrest (RSOH), der weiter zum Sulfinsäurerest (RSO_2H) und Sulfonsäurerest (RSO_3H) oxidiert. Des Weiteren finden Nitrosylierungen (RSNO) und Glutathionylierungen (RSSG) statt. Benachbarte Cysteine können außerdem intra- und intermolekulare Disulfidbrücken bilden. Diese kovalenten Proteinmodifikationen aktivieren und inaktivieren zahlreiche Proteine, wodurch zelluläre Stresssignalwege reguliert werden können (Übersichtsartikel von Finkel & Holbrook 2000).

Im Gehirn sind ROS für die normale hippocampale synaptische Plastizität essentiell. Superoxid fungiert als *second messenger* nach Aktivierung von NMDA-Rezeptoren. Diese Rezeptoren vermitteln den Ca^{2+} -Einstrom in postsynaptische Neuronen und regulieren somit die LTP. Antioxidantien, aber auch eine Überproduktion von ROS, können die LTP beeinträchtigen. Eine strikte Regulation von ROS ist daher für die Gedächtnisbildung essentiell. Die mit der Alterung zunehmende Störungen der LTP werden u. a. mit oxidativen Stress assoziiert (Serrano & Klann 2004). A β -Oligomere können über eine Bindung an NMDA-Rezeptoren die ROS-Bildung stimulieren und die Ca^{2+} -Homöostase stören (De Felice *et al.* 2007). Des Weiteren kommt es durch die A β -Ablagerung zur Aktivierung von immunkompetenten Zellen, die wiederum ROS bilden. Darüber hinaus besitzen A β -Peptide eine hohe Affinität zu redoxaktivem Eisen (Übersichtsartikel von Padurariu *et al.* 2013). Oxidativer Stress steht dabei nicht nur mit der Initiation der Erkrankung im Zusammenhang sondern auch mit der Bildung weiterer toxischer A β -Spezies, die das Fortschreiten der neuronalen Degradation fördern (Übersichtsartikel von Bhat *et al.* 2015). Die Vorbeugung oder Reduktion von oxidativen Stress durch Abfangen von ROS mittels direkter Antioxidantien oder durch die Induktion von antioxidativen Enzymen über die Modulation von zellulären Signalwegen könnte daher für die Prävention und Therapie von Morbus Alzheimer maßgeblich sein.

1.1.3 *Caenorhabditis elegans* als Modellsystem für Morbus Alzheimer

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) wurden als experimentelles Modell für genetische Untersuchungen des Nervensystems von Sydney Brenner etabliert (Brenner 1974). Der Fadenwurm kommt in der Natur freilebend im Boden vor und erreicht eine Größe von bis zu einem Millimeter. *C. elegans* ist ein selbstbefruchtender Hermaphrodit (XX) ($\geq 99\%$), wobei jedes Tier Eizellen und Samenzellen produziert. Daneben treten sporadisch (ca. 1%) männliche Tiere (XO) auf (Brenner 1974). Unter Laborbedingungen wird *C. elegans* auf Agarplatten monoxenisch gehalten, d. h. die Entwicklung des Nematoden ist streng wirtsspezifisch, wobei der Uracil-auxotrophe *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm OP50 als Nahrungsquelle dient (Brenner 1974). Unter diesen Bedingungen erreicht der Nematode eine mittlere Lebensspanne von ca. 20 Tagen und produziert ca. 300 Nachkommen während der ersten Woche des Erwachsenenalters (Übersichtsartikel von Gruber *et al.* 2009). Der Hermaphrodit besteht aus 959 somatischen Zellen und das männliche Tier aus 1031, wobei die vollständige Zelllinie des Organismus von der Zygote bis zum adulten Nematoden bekannt ist (Sulston *et al.* 1983). Der Lebenszyklus von *C. elegans* beträgt unter Standardlaborbedingungen bei 20°C ca. drei Tage, wobei vom Ei bis zum adulten Nematoden vier Larvenstadien durchlaufen werden (Abb. 2B). Unter ungünstigen Bedingungen, wie bei Nahrungsknappheit, können L1- und L2-Larven in das extrem widerstandsfähige Dauerlarvenstadium übergehen. Die Entwicklung dieser Larven kann über mehrere Monate arretieren bis wieder ausreichend Nahrung vorhanden ist. Das Dauerstadium wird über sogenannte Dauergene (*daf*) reguliert, die auch Metabolismus, Reproduktion und Lebensspanne bei adulten Nematoden beeinflussen (Übersichtsartikel von Yen *et al.* 2011).

Als mehrzelliger Organismus bestehend aus Nervensystem, Verdauungssystem (Pharynx, Darm, Rektum und Anus) und Reproduktionssystem (somatische Gonaden, Keimbahnen und Legeapparat) eignet sich *C. elegans* als Modellsystem, um komplexe Fragestellungen hinsichtlich physiologischer Prozesse in höheren Organismen zu untersuchen (Abb. 2A) (Übersichtsartikel von Hulme & Whitesides 2011). Aus ernährungswissenschaftlicher Sicht ist *C. elegans* besonders interessant, da der Darm des Nematoden dem menschlichen Verdauungs- und Ausscheidensystem samt Leber, Pankreas, Niere,

Dünndarm und Colon entspricht. Hierbei übernimmt der Darm nicht nur die Verdauungsfunktion, sondern auch die Biosynthese von Metaboliten und die Detoxifizierung (Übersichtsartikel von Blackwell *et al.* 2015). Das Genom des Nematoden wurde bereits 1998 vollständig sequenziert und für 60-80% der humanen Gene sind Homologe in *C. elegans* bekannt (*The C. elegans Sequencing Consortium* 2012). Aus diesem Grund besitzt der Modellorganismus höchste Relevanz hinsichtlich der Untersuchung von evolutionär konservierten Signalwegen und molekularen Prozessen, die bei menschlichen Erkrankungen eine Rolle spielen (Übersichtsartikel von Hulme & Whitesides 2011). Beispielsweise wurden regulatorische Gene für den Alterungsprozess und die Apoptose erstmals in *C. elegans* identifiziert. Der Nematode dient heute als etabliertes Modellsystem in der Altersforschung (Hengartner & Horvitz 1994, Friedman & Johnson 1987). Zugleich kann *C. elegans* aufgrund seiner einfachen experimentellen Handhabung, kurzen Lebensspanne und hohen Reproduktionsrate als *Screening*-System für neue Wirkstoffe gegen altersassoziierte Erkrankungen eingesetzt werden (Übersichtsartikel von Hulme & Whitesides 2011). Zu diesem Zweck wurden unter anderem transgene Stämme generiert, die spezifische krankheitsassoziierte Proteine exprimieren. Des Weiteren wurden durch gezielte genetische Veränderungen *C. elegans*-Stämme entwickelt, die Fusionsproteine bestehend aus fluoreszierenden Markern, wie z. B. dem grün fluoreszierenden Protein (GFP), und einem Schlüsselprotein exprimieren. Aufgrund der Transparenz der Nematoden können dadurch molekulare Prozesse in Echtzeit beobachtet werden. Außerdem ist es möglich durch Ribonukleinsäure-Interferenzen (RNAi) über die Fütterung von doppelsträngigen RNA exprimierenden Bakterien regulatorische Gene auszuschalten. Mutante Stämme, bei denen bestimmte Genen ausgeschaltet sind, wurden durch Selektionen und Kreuzungen mit männlichen Tieren über Generationen erhalten und stehen der Forschungsgemeinschaft über das *Caenorhabditis Genetics Center* zur Verfügung (Jorgensen & Mango 2002). Diese gentechnischen Modulationen ermöglichen nicht nur die Erforschung des Pathomechanismus bestimmter Erkrankungen, sondern auch die Identifizierung von neuen potentiellen Therapeutika und deren Wirkmechanismus.

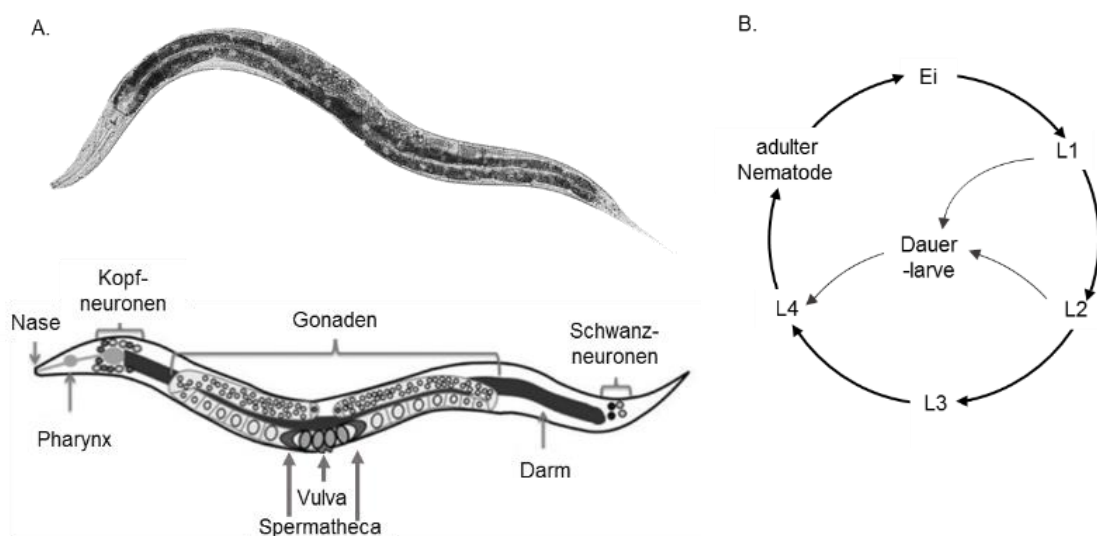


Abbildung 2: A. Anatomie und B. Lebenszyklus eines adulten *C. elegans*.
Modifiziert nach Yen *et al.* (2011).

Zur Untersuchung des molekularen Pathomechanismus von Morbus Alzheimer wird *C. elegans* seit über 20 Jahren als Modellsystem eingesetzt (Link 1995). Der Nematode besitzt das Homolog für das humane Amyloid-Präkursor-ähnliche Protein *apl-1*, das jedoch anders als das APP keine A β -Peptidsequenz besitzt (Daigle & Li 1993). Des Weiteren weist das Genom von *C. elegans* kein Homolog für das humane BACE-Gen auf, jene Sekretase, die die A β -Sequenz aus dem APP schneidet (Link 2006). Um dennoch die Amyloid-Hypothese in *C. elegans* untersuchen zu können, wurden transgene Stämme entwickelt, die humane A β -Peptide gewebespezifische exprimieren (Link 1995). Bei dem Stamm CL2006 wird das A β_{1-42} -Gen unter der Kontrolle des Promotors *unc-54* exprimiert. Die A β_{1-42} -Expression führt in diesem Stamm zur progressiven Paralyse und Akkumulation von A β -Plaques, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff ThS nachweisbar sind. Rebolledo *et al.* (2011) zeigten, dass die A β_{1-42} -induzierte Paralyse auf einer Inhibition der synaptische Transmission durch eine Störung der nACh-Rezeptoren beruhen. Da die Paralyse im CL2006-Stamm altersabhängig ist und in sehr unterschiedlichen Altersstadien einsetzen kann, muss bei diesem Stamm das Paralyseverhalten über die gesamte Lebensspanne betrachtet werden (Link 1995). Ein Vorteil bietet der Stamm CL4176, der ein temperaturinduzierbares A β_{1-42} -Transkript unter der Kontrolle des Körperwandmuskel-spezifischen *myo-3* (*MYOsine heavy chain structural gene*) Promotors exprimiert. Das Minigen-Transkript wird durch eine abnormal lange 3'-untranslatierten Region destabilisiert und folglich durch das *messenger* (m)RNA Kontrollsystems abgebaut (Abb. 3). Unter basalen Bedingungen (16°C) wird A β_{1-42} daher nur schwach in den Nematoden exprimiert. Der Stamm enthält zusätzlich eine temperatursensitive *smg-1* (*Suppressor with morphological effect on Genitalia*) Mutation. Da das *smg-1* Gen eine essentielle Komponente des mRNA-Kontrollsystems ist, bewirkt diese Mutation eine temperaturinduzierte signifikante Transgeninduktion durch eine erhöhte A β_{1-42} -Minigen-Transkriptstabilität (5-fach erhöhte *steady-state* transgene mRNA) und A β_{1-42} -Expression. Bei einer Temperaturerhöhung auf 25°C für 24 Stunden führt diese A β_{1-42} -Transgeninduktion zu einer Störung der Synapsenfunktion der Körperwandmuskelzellen (motorische Endplatte) und ist als Paralyse am ganzen Körper des Tieres beobachtbar (Link 2003). Die schnelle Temperatur-induzierte A β_{1-42} -Expression ermöglicht es, die toxische Wirkung des A β_{1-42} -Peptids unabhängig von dem Alterungsprozess in *C. elegans* zu betrachten. Der Stamm enthält außerdem den *rol-6* Selektionsmarker. Anders als der CL2006 Stamm bildet der CL4176 Stamm keine A β -Plaques (Link 2006).

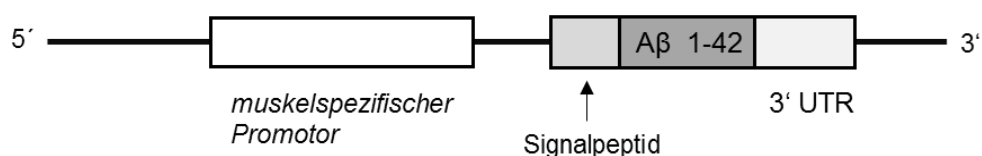


Abbildung 3: Schematische Darstellung des A β_{1-42} -Genkonstruktes im transgenen *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer.

Modifiziert nach Link (2006) und (2003). A β = Amyloid beta, UTR = untranslatierte Region.

1.1.4 Insulin/Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1 Signalweg und Morbus Alzheimer

Der Insulin/Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (IGF)-1 Signalweg (ILS) ist ein hochkonservierter Signalweg, der zentrale metabolische Funktionen im Organismus reguliert. Mithilfe von *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass der Signalweg für die Stressresistenz, Alterung und Proteinhomöostase essentiell ist (Übersichtsartikel von Baumeister *et al.* 2006). Eine Fehlregulation des ILS könnte daher auch im Menschen im Zusammenhang mit Alterungsprozessen und degenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, stehen.

Die Aktivierung des Signalweges geht von Insulin-ähnlichen Liganden aus, die an DAF-2, das *C. elegans* Homolog für den Insulin/IGF-1-Rezeptor (IR/IGF-1R), binden (Kimura *et al.* 1997) (Abb. 5). Umweltreize, wie bestimmte Nährstoffe oder die Nahrungsmittelverfügbarkeit, können die Sekretion von Insulin-ähnlichen Liganden in den Neuronen stimulieren (Übersichtsartikel von Partridge & Gems 2002). Über das Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)-Homolog AGE-1 werden durch die Formation von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) die Phosphoinositol-abhängige Kinase (PDK1), AKT-1/2 und Serumglukokortikoide regulierte Kinase (SGK-1) aktiviert (Hertweck *et al.* 2004). AKT-1/2 und SGK-1 phosphorylieren den Transkriptionsfaktor DAF-16 an spezifischen AS, wodurch der nukleäre Faktor mit 14-3-3-Proteinen assoziiert und im Zytosol verbleibt (Li *et al.* 2007) (Abb. 5). Das *C. elegans*-Dauergen *daf-16* gilt als das Ortholog zum humanen *forkhead box O (FOXO)3A*-Gen (Ogg *et al.* 1997), wobei sich die Gene in 67 % der Basenpaare gleichen (Lin *et al.* 1997). Wie im Menschen weist das Gen eine *winged-helix* DNA-Bindungsdomäne, nukleäre Lokalisations- und -Exportsignalsequenzen, Bindungsstellen für 14-3-3-Proteine sowie Phosphorylierungs- und Acetylierungsstellen auf (Abb. 4).

human/ C. elegans

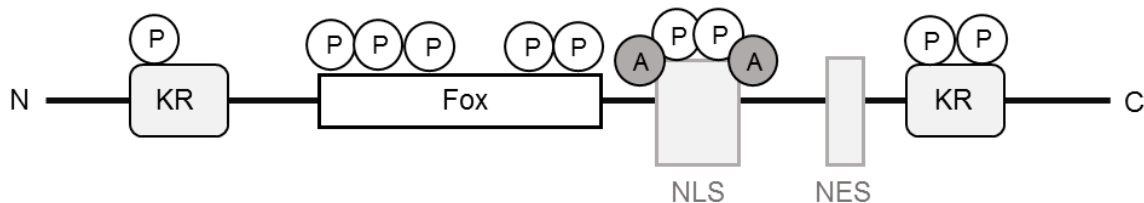


Abbildung 4: Schematische Darstellung des humanen FoxO bzw. *C. elegans* *daf-16* Gens.

Modifiziert nach Klotz *et al.* (2015) und Yen *et al.* (2011). A = Acetylierungsstellen, Fox = *Forkhead box/winged-helix* DNA-Bindungsdomäne, KR = konservierte Region (Bindungsstellen für 14-3-3-Proteine), NES = nukleäre Exportsequenz, NLS = nukleäre Lokalisierungssequenz, P = Phosphorylierungsstellen.

Je nach Gewebe treten unterschiedlich gespaltene Formen auf, die sich zum Teil in den Phosphorylierungsstellen unterscheiden. Unterbrechungen in der Signalkaskade führen zur DAF-16-Translokation in den Zellkern und folglich zur Transkription von spezifischen Zielgenen. Zu diesen gehören u. a. die antioxidativen Gene *sod-3*, *catalase* und *glutathion S-transferase* (Honda & Honda 1999, Taub *et al.* 1999, Lee *et al.* 2003). Weiterhin werden *metallothionein-1* und kleine Hitzeschockproteine (*shsp*) von DAF-16 reguliert (Baryte *et al.* 2001, Hsu *et al.* 2003). Des Weiteren existiert eine Vielzahl von Cofaktoren, die die transkriptionelle Aktivität von DAF-16 beeinflussen. Der Hitzeschockfaktor (HSF)-1, welcher die HSP-Chaperone hochreguliert, wird ebenfalls über den ILS reguliert. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass beide Transkriptionsfaktoren zusammenwirken,

um die Lebensspanne von *C. elegans* zu verlängern (Hsu *et al.* 2003). Weiterhin wurde gezeigt, dass das *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Nrf2) -Homolog SKiNhead (SKN)-1 parallel zu DAF-16 wirkt (Tullet *et al.* 2008). Neben dem ILS wird die Aktivität von DAF-16 bzw. FOXO auch über andere Kinasen, Phosphatasen, Acetylasen oder Deacetylasen reguliert und ist vom Redox-Status der Zelle abhängig (Übersichtsartikel von Salih & Brunet 2008 und Klotz *et al.* 2015).

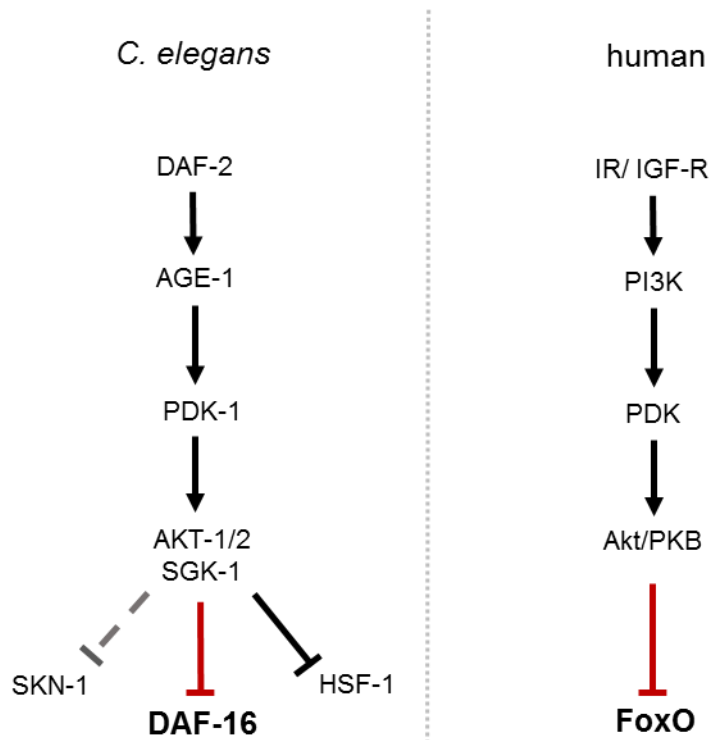


Abbildung 5: Schematische Darstellung des ILS in *C. elegans* und im Menschen.

Modifiziert nach O'Neill *et al.* (2012). DAF = Dauergen (*abnormal DAuer Formation*), FOXO = *forkhead box O*, HSF = Hitzeschockfaktor, IGF-R = Insulinähnlicher Wachstumsfaktorrezeptor, IR = Insulinrezeptor, PKB = Proteinkinase B, SGK = Serumglukokortikoide regulierte Kinase, SKN = SKiNhead.

Die Aktivierung von DAF-16 führt zu einer Induktion der Stressantwort und Verlängerung der Lebensspanne von *C. elegans* (Friedman & Thomas 1987, Kenyon *et al.* 1993, Lin *et al.* 1997). Auch im Menschen gibt es Hinweise darauf, dass bestimmte Komponenten des Insulinsignalweges mit Langlebigkeit assoziiert sind: Variationen in den Genen von IGF-1, PI3K, Insulinrezeptorsubstrat (IRS) oder IGF-1R korrelieren mit der humanen Lebensspanne (Van Heemst *et al.* 2005, Suh *et al.* 2008). Ebenso führt eine Variation im FOXO3A-Gen zur Langlebigkeit im Menschen (Willcox *et al.* 2008, Flachsbar *et al.* 2009).

Bei Morbus Alzheimer-Patienten wurde *post mortem* eine Störung des ILS im Gehirn festgestellt. Dabei kommt es zu einer andauernden Aktivierung von Akt, was wiederum zu einer *feedback*-Inhibition von IR und IGF-1R führt. In der Literatur wird daher von einem gehirnspezifischen Diabetes gesprochen (Übersichtsartikel von O'Neill *et al.* 2012). Aus experimentellen Studien mit Rattenzellen ist bekannt, dass toxische A β -Oligomere eine Umverteilung der IR innerhalb der Hippocampusneuronen verursachen können. Hierbei binden A β -Oligomere an die IR in der Zellmembran der Dendriten und fördern die Internalisierung der Rezeptoren. Gleichzeitig nimmt die Anzahl der IR in der Zellmembran der Somata zu. Des Weiteren induzieren A β -Oligomere eine Phosphorylierung und damit Aktivierung

von Akt in diesen Neuronen (Zhao *et al.* 2008). Da Tau-Proteine von Akt an bestimmten Serin-Resten phosphoryliert werden können, stellt die Überaktivierung des ILS durch die A β -Oligomere eine mögliche Verbindung zwischen den A β -Peptiden und den toxischen Tau-Filamenten dar (Griffin *et al.* 2005). In einem *Drosophila*-Versuch wurde weiterhin gezeigt, dass eine Hyperaktivierung des Akt-Signalweges durch A β ₁₋₄₂-Spezies mit dem Gedächtnisverlust der Tiere korrelierte (Chiang *et al.* 2010). In dem transgenen *C. elegans*-Stamm CL2006 schützt eine Herunterregulierung des IR/IGF-1-R-Homologs *daf-2* vor der A β ₁₋₄₂-induzierten Paralyse (Cohen *et al.* 2006). Die Autoren konnten außerdem zeigen, dass dieser protektive Effekt von den Transkriptionsfaktoren DAF-16 und HSF-1 abhängig ist. Hierbei induziert HSF-1 eine Disaggregationsmaschinerie, die kleine toxische A β -Aggregate auflöst, welche anschließend degradiert werden. Wird die Kapazität der HSF-1-Maschinerie überschritten, dann vermittelt die DAF-16-induzierte Genexpression die Aggregation von A β -Oligomere in höhermolekulare weniger toxischen A β -Ablagerungen, die anschließend von der HSF-1-Maschinerie degradiert werden (Abb. 6) (Cohen *et al.* 2006). Demnach sind höhermolekulare A β -Aggregate *per se* nicht toxisch und stellen möglicherweise einen Pool für pathogene A β -Oligomere dar. Dies zeigt auch die Studie von Cohen *et al.* (2009): Hierbei führte eine Reduzierung des ILS in transgenen Alzheimer-Mäusen zu einer erhöhten Ablagerung von A β -Aggregaten, was mit einem geringeren Kognitionsverlust assoziiert war. Die HSF-1-induzierte Disaggregation scheint der primäre Schutzmechanismus in *C. elegans* zu sein, da eine Inhibition der HSF-1-Expression und weniger der DAF-16-Expression die Paralyserate der transgenen Nematoden verstärkt. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass sich die HSP-16.2-Proteine mit den A β -Plaques in *C. elegans* zusammenlagern und ein kurzer Hitzeschock die Paralyserate verringert (Link 2006, Wu *et al.* 2010). Ein möglicher Pathomechanismus für Morbus Alzheimer ergibt sich dann wie folgend: Im Alter kommt es zu einer fehlerhaften Regulation des ILS, was zu einer Hyperaktivierung dieses Signalweges führt. Da Degradationssysteme durch den ILS inhibiert werden, erhöht sich die A β -Peptid-Akkumulation im Gehirn. Oligomere A β -Peptide aktivieren zudem den Akt-Signalweg, wodurch einerseits protektive Transkriptionsfaktoren wie FOXO und HSF-1 gehemmt und andererseits Tau-Proteine hyperphosphoryliert werden. Die unterdrückten Stressantwortsysteme machen die Zelle anfällig für oxidativen Stress und die Hyperaktivierung des ILS führt durch eine *feedback*-Inhibition von IR und IGF-1-R zur Insulinresistenz. Die Schäden durch hyperphosphorylierte Tau-Filamente und oxidativen Stress beeinträchtigen die normale Zellfunktion und führen schließlich zum Untergang der Zelle (O'Neill *et al.* 2012).

Daneben scheint auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 bzw. SKN-1 vor der A β -Toxizität zu schützen. Aus der Untersuchung von Ramsey *et al.* (2007) geht hervor, dass die Aktivierung von Nrf2 im Gehirn von Morbus Alzheimer-Patienten inhibiert wird. In transgenen Mäusen (APP/PS1) wurden ähnliche Beobachtungen gemacht: Hierbei weisen die Alzheimer-Tiere im Vergleich zu dem Wildtypen eine reduzierte Nrf2-induzierte Genexpression im Gehirn auf (Kanninen *et al.* 2008). Eine Transduktion von humanen Nrf2 in den Hippocampus dieser Mäuse konnte Lern- und Gedächtnisdefizite ausgleichen. Darüber hinaus schützte eine pharmakologische Nrf2-Aktivierung sowie eine Nrf2-Überexpression vor A β ₁₋₄₂-induzierten Zelltod in hippocampalen Neuronen (Kanninen *et al.* 2008, 2009). Des Weiteren wurde ein Polymorphismus im humane NFE2L2-Gen entdeckt, welcher mit dem Auftreten des präsenilen Morbus Alzheimer-Typs assoziiert ist (von Otter *et al.* 2010). Es wird vermutet dass die Nrf2-Aktivierung die A β ₁₋₄₂-Toxizität über antioxidative und antiinflammatorische Mechanismen sowie über die Induktion von zellulären Degradationswegen reduziert (Übersichtsartikel von Prasad 2016).

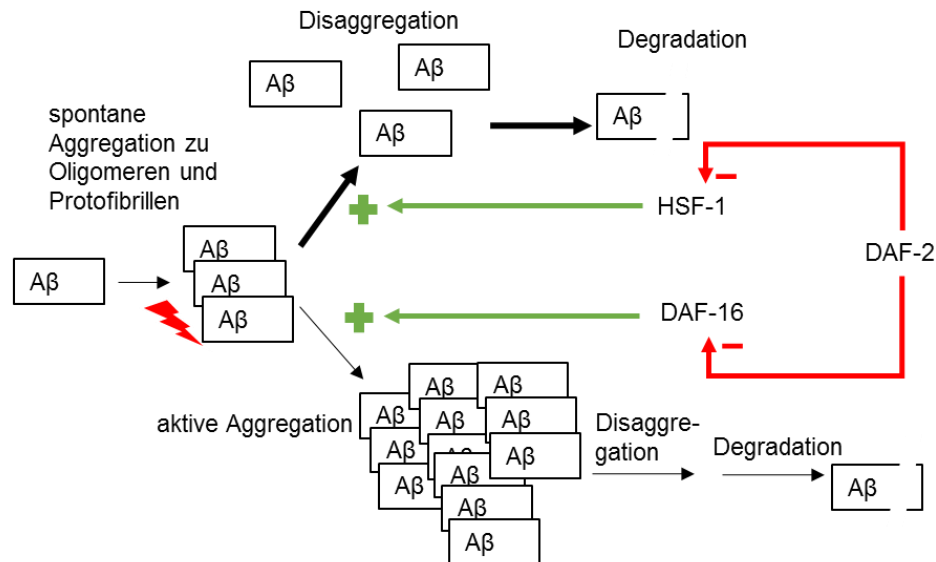


Abbildung 6: Einfluss des ILS auf die Pathogenese von Morbus Alzheimer.

Eine Inhibition des ILS führt in *C. elegans* zu der Degradation von toxischen Aβ-Spezies durch ein Zusammenspiel aus HSF-1 und DAF-16. Modifiziert nach Cohen *et al.* (2006). DAF = Dauergen (*abnormal DAuer Formation*), FOXO = *forkhead box O*, HSF = Hitzeschockfaktor, PI3K = Phosphoinositol-3-Kinase.

1.2 Ernährung zur Prävention von Morbus Alzheimer

Nach derzeitigem Stand der Wissenschaft ist bei der Entstehung von Morbus Alzheimer eine Vielzahl an Faktoren beteiligt. Neben genetischen Prädispositionen können auch Lebensstilfaktoren das Erkrankungsrisiko beeinflussen. Die mediterrane Ernährung, von der bereits bekannt ist, dass sie vor koronare Herz-Kreislauf-Erkrankungen schützen kann, wurde auch als präventive Maßnahme gegenüber Morbus Alzheimer untersucht. Die Ernährungsform basiert auf dem kulturellen Lebensstil der griechischen, spanischen und italienischen Bevölkerung, wobei eine hohe Aufnahme von grünem Gemüse und eine niedrige Aufnahme von Fleischprodukten im Vordergrund stehen. Daneben wird ein hoher Olivenöl-, Vollkorn-, Fisch- und moderater Weinkonsum empfohlen (Übersichtsartikel von Trichopoulos & Vasilopoulou 2000). Einige epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass Menschen, die sich nach mediterranem Vorbild ernähren, ein geringeres Risiko für Demenzerkrankungen aufweisen als Gleichaltrige, die sich nach westlichem Vorbild ernähren (Roberts *et al.* 2010, Scarmeas *et al.* 2011, Tangney *et al.* 2011, Cao *et al.* 2015, Morris *et al.* 2015). Eine ähnliche Ernährungsform, die *Dietary Approaches to Stop Hypertension* (DASH), führte in epidemiologischen Studien ebenfalls zu einer erhöhten kognitiven Leistungsfähigkeit gegenüber einer herkömmlichen Ernährung (Smith *et al.* 2010, Tangney *et al.* 2014). Wie die mediterrane Kost basiert auch die DASH-Ernährung auf pflanzlichen Lebensmitteln, hat jedoch keinen kulturellen Hintergrund und zielt im Speziellen auf die Reduktion des Körpergewichtes und damit einhergehend des Blutdruckes ab (Tangney *et al.* 2014). Aus beiden Ernährungsformen wurde die *Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay* (MIND) entwickelt, welche sich auf die Prävention von Morbus Alzheimer spezialisiert. Dabei werden aus beiden Ernährungsweisen jene Lebensmittel ausgewählt, die in wissenschaftlichen Studien signifikante neuroprotektive Wirkungen zeigten (Übersichtsartikel von Morris 2016). Die Basis der MIND bildet eine gesteigerte Aufnahme von grünblättrigen Gemüse und

Beeren, welche in verschiedenen prospektiven Kohortenstudien die altersbedingte Abnahme der kognitiven Fähigkeiten verzögern konnte (Kang *et al.* 2005, Morris *et al.* 2006, Devore *et al.* 2012, Trichopoulou *et al.* 2015). Als physiologisch wirksame Inhaltsstoffe werden hierbei u. a. Folsäure, Antioxidantien und Polyphenole diskutiert (Roberts *et al.* 2010, Chin *et al.* 2013, Cao *et al.* 2015). Epidemiologische Studien aus den letzten Jahren zeigen, dass die Aufnahme von polyphenolreichen Lebensmitteln das Eintreten von Morbus Alzheimer verzögern und Demenzzanzeichen in Patienten vermindern kann (Commenges *et al.* 2000, Dai *et al.* 2006, Letenneur *et al.* 2007, Devore *et al.* 2012). Der genaue Wirkmechanismus dieser bioaktiven Substanzen ist jedoch nur teilweise aufgeklärt. Zusätzlich bieten die häufig angewandten retrospektiven Fallkontrollstudien nur eine begrenzte Aussage zur tatsächlichen Polyphenolaufnahme und prospektive Interventionsstudien sind aufgrund der ethischen Rahmenbedingungen und hoher *Drop-out*-Quoten der Probanden selten. Aus diesem Grund sind die gesundheitsfördernden Wirkungen von Polyphenolen im Menschen umstritten. Hinzukommend zeigen Studien, die die Aufnahme von isolierten Polyphenolen als Nahrungsergänzungsmittel untersuchten, kontroverse Ergebnisse (Edwards *et al.* 2007, Egert *et al.* 2008, Heinz *et al.* 2010). Daher soll in dieser Arbeit mithilfe des Modellorganismus *C. elegans* zum einen das protektive Potential von Polyphenolen gegenüber Morbus Alzheimer und zum anderen der zugrunde liegende molekulare Mechanismus untersucht werden.

1.2.1 Polyphenole

Polyphenole gehören zu der Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe (SPS). Im Gegensatz zu den primären Pflanzenstoffe, die für den Stoffwechsel und den Aufbau der Zelle notwendig sind, sind diese Sekundärmetaboliten nicht-essentielle niedermolekulare Pflanzeninhaltsstoffe mit teilweise gesundheitsfördernden bzw. pharmakologischen Eigenschaften (Biesalski & Bischoff 2012). Die Klasse der Polyphenole umfasst über 10.000 Verbindungen, die als Grundstruktur einen sechsgliedrigen aromatischen C-Atomring (Phenyl-) mit einer Hydroxylgruppe (-OH) tragen (Abb. 7A) (Übersichtsartikel von Kuhnert 2013).

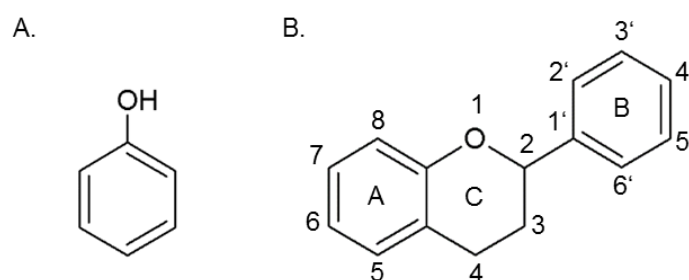


Abbildung 7: Grundstruktur der Polyphenole, das Phenol (A) und der Flavonoide, das Flavan (B), ein Benzopyranderivat.

Der Polyphenolgehalt und die Komposition der Polyphenolzusammensetzung sind in Pflanzen sehr variabel (Übersichtsartikel von Cheynier 2005). Daher ergeben sich z. T. beträchtliche Schwankungen in der Abschätzung der menschlichen Polyphenolaufnahme zwischen den verschiedenen Studien. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die maximale Polyphenolaufnahme in der Regel nicht 1 g pro Tag überschreitet (Übersichtsartikel von Manach *et al.* 2004). Polyphenole liegen in Pflanze meist glykosyliert vor (meist β -O-Glykoside), was die Wasserlöslichkeit des hydrophoben Charakters erhöht

(Ebermann & Elmadfa 2011). Die Glykoside werden im Dünndarm zum einen über den Natrium-abhängigen Glukose-Transporter (SGLT-1) in die Enterozyten transportiert und anschließend durch intrazelluläre β -Glukosidasen gespalten und zum anderen über die bürstensaumständige β -Glukosidase, Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH), extrazellulär hydrolysiert, wobei das freie Aglykon durch die Membran in die Enterozyten diffundiert (Day *et al.* 1998, Day *et al.* 2000). Polyphenol-Glykoside, die im Dünndarm nicht resorbiert werden, können durch β -Glukoronidasen der Mikroflora im Dickdarm in Aglykone und weiter in aromatische Säuren zerlegt werden (Übersichtsartikel von Hollman & Katan 1997). Die Aglykone werden über Catechol-O-Methyltransferasen, Sulfotferasen, UDP-Glukuronosyltransferasen entsprechend konjugiert, um die Löslichkeit zu erhöhen und somit zum einen den Transport im Körper und zum anderen die Ausscheidung über Galle und Urin zu ermöglichen. Die konjugierten Polyphenole werden im Plasma an Albumin gebunden, wobei die Plasmakonzentration der Metaboliten im nano- bis mikromolarem Bereich liegt (Übersichtsartikel von Manach *et al.* 2004). In *C. elegans* können Polyphenol-Glykoside, wie Quercetin-1-Glykosid, über die Klotho-Orthologe *klo-1* und *klo-2* deglykosyliert werden (Duenas *et al.* 2013). Des Weiteren findet eine Biotransformation von Quercetin zu den konjugierten Metaboliten statt (Surco-Laos *et al.* 2011, Duenas *et al.* 2013).

Polyphenole sind vor allem für ihre antioxidative Wirkung bekannt. Das antioxidative Potential ist dabei von der Anzahl und Zugänglichkeit der Phenoleinheiten abhängig, wobei vor allem Hydroxylgruppen in o-Stellung, sogenannte Catecholgruppe, eine hohe radikalfangende Kapazität zeigen (Cheynier 2005). Daneben können einige Polyphenole ebenfalls als indirekte Antioxidantien fungieren, indem sie antioxidative und Phase-II-Enzyme induzieren (Übersichtsartikel von Dinkova-Kostova & Talalay 2008).

1.2.2 Flavonoide

Flavonoide sind Polyphenole, die zwei aromatische Ringe (A und B) enthalten, die über einen oxygenierten heterozyklischen γ -Pyroneering (C) verbunden sind (Abb. 7B). Je nach Oxidationsstufe des C-Rings werden die Flavonoide in fünf Unterklassen eingeteilt: Flavanone, Flavone, Flavonole, Flavane und Anthocyanidine (Ebermann & Elmadfa 2011).

Neben Hydroxylierungen können weitere Modifizierungen, wie Methylierungen und Prenylierungen, am Grundgerüst auftreten (Übersichtsartikel von Cheynier 2005). Methylierungen an O- oder C-Atomen können die biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften stark beeinflussen. Beispielsweise wird die Affinität zu Proteinen und der Membrantransport durch eine O-Methylierung von Flavonoiden erhöht (Cao *et al.* 2013). Methoxyflavonoide weisen eine höhere metabolische Stabilität als unsubstituierte Flavonoide auf, da die OH-Gruppen für Sulfatierungen und Glukuronidierung nicht zugänglich sind (Wen & Walle 2006). Methylierungen von Flavonoiden können folglich die Bioverfügbarkeit und somit auch die biologische Wirkung erhöhen (Walle *et al.* 2007). Prenyleinheiten an den aromatischen Ringen führen theoretisch zu einer erhöhten Lipophilie und somit gesteigerten Membrangängigkeit der Flavonoide. *In vitro*- und *in vivo*-Studien zeigen jedoch, dass die Bioverfügbarkeit von Prenylflavonoiden geringer ist als von den unprenylierten Verbindungen. Dies wird zum Teil auf einen gehemmten basolateralen Transport der Prenylverbindungen in den Enterozyten zurückgeführt (Mukai *et al.* 2013). In Langzeitfütterungsstudien mit Nagern zeigte sich jedoch, dass prenylierte im Vergleich zu unprenylierten Flavonoiden dennoch ein erhöhtes Potential zur Bioakkumulation in Muskeln und Leber zeigen (Mukai *et al.* 2012 und 2013). Darüber hinaus können

Prenylflavonoide eine starke östrogene und anticancerogene Aktivität aufweisen (Übersichtsartikel von Yang *et al.* 2015).

Die protektiven Wirkungen von Polyphenolen im Menschen werden u. a. auf die Flavonoiden zurückgeführt, da sie neben ihrer hohen antioxidativen Aktivität auch mit intrazellulären Signalwegen, wie den Insulin/PI3K-, Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)- und nukleärer Faktor (NF)κB-Signalwegen, interagieren können. Bindungsstellen für Flavonoide stellen dabei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Liganden-gesteuerte Ionenkanäle und Rezeptortyrosinkinasen dar. Niedrige Konzentrationen von Flavonoiden können *in vitro* zur Aktivierung von nachgeschalteten Kinasen führen, während hohe Konzentrationen diese inhibieren (Übersichtsartikel von Williams & Spencer 2012). Darüber hinaus können bestimmte Flavonoide auch direkt an die Adenosintriphosphat (ATP)-bindende Seite der PI3K binden (Walker *et al.* 2000). Diese intrazellulären Wirkungen von Flavonoiden scheinen dabei stark von der Struktur abhängig zu sein, wobei Anzahl und Substituierungen der OH-Gruppen im B-Ring und der Grad der Sättigung der C2-C3-Verbindung die Bioaktivität bestimmen (Übersichtsartikel von Williams & Spencer 2012). Aus *C. elegans*-Studien ist bekannt, dass bestimmte Flavonoide die Lebensspanne und Stressresistenz der Nematoden in Abhängigkeit von dem FOXO Ortholog DAF-16 verlängern können (Kampkötter *et al.* 2008, Büchter *et al.* 2013). Eine protektive Wirkung von Flavonoiden gegenüber Morbus Alzheimer über eine Inhibition des PI3K-Signalweges bzw. Aktivierung von FOXO/DAF-16 wäre daher ebenfalls denkbar (Abb. 6).

In dieser Arbeit soll die Wirkung von zwei flavonoidreichen Pflanzenextrakte auf die Aβ₁₋₄₂-Toxizität *in vivo* untersucht werden. Aufgrund von Schwankungen der Extraktzusammensetzung wurde die Wirkung von isolierten Naturstoffe in dem Modellorganismus analysiert. Hibiskusextrakte (HE) enthält zahlreiche Flavonoide der Flavonol-Klasse, wie Quercetin und Myricetin (Übersichtsartikel von Da-Costa-Rocha *et al.* 2014). Hingegen sind in Hopfenextrakte (HOE) prenylierte Chalcone und Flavanone zu finden (Milligan *et al.* 2000). Folglich wurden zuerst die unsubstituierten Flavonole und Flavanone und anschließend methylierte und prenylierte Flavonoidderivate in *C. elegans* untersucht.

1.2.2.1 Flavonole

Flavonole sind in der pflanzlichen Nahrung weitverbreitet, wobei größere Mengen in Zwiebeln, Beeren, Brokkoli, Wein und Tee zu finden sind (Übersichtsartikel von Heim *et al.* 2002). Charakteristische Merkmale von Flavonolen sind die Carbonylgruppe (C=O) an Position C4, die C3-Hydroxygruppe und die C2-3-ungesättigte Verbindung. Die hier ausgewählten Flavonole unterscheiden sich in Anzahl und Stellung der OH-Gruppen (Abb. 8).

Quercetin. Quercetin weist neben der OH-Gruppen an C3, zwei weitere OH-Gruppen an C5 und C7 im A-Ring auf und zwei weitere OH-Gruppen in o-Stellung am B-Ring (C3' und C4'). Quercetin ist das wohl weitverbreitetste und am häufigsten untersuchte Flavonol und kommt in zahlreichen Obst- und Gemüsesorten vor (Übersichtsartikel von El Gharras 2009). Der Naturstoff ist für seine antioxidativen, antiinflammatorischen, antikoagulativen, antiatherogenen und antiproliferativen Eigenschaften bekannt (Übersichtsartikel von Boots *et al.* 2008). Daneben weisen zahlreiche Untersuchungen auf ein neuroprotektives Potential von Quercetin hin: z. B. schützte eine Inkubation mit dem Flavonol vor der Aβ-Peptid-Toxizität in kortikalen und hippocampalen Zellen von Nagern (Shi *et al.* 2010, Choi *et al.* 2014) und in einem transgenen Alzheimer-Tiermodell modulierte die Behandlung mit Quercetin bzw. Quercetin-3-Glucuronid das Langzeitgedächtnis (Sabogal-Guáqueta *et al.* 2015, Ho *et al.* 2013). Des

Weiteren wurde in *C. elegans* bereits gezeigt, dass eine Quercetin-Behandlung die Lebensspanne und Stressresistenz verlängern und die ROS-Akkumulation reduzieren kann (Kampkötter *et al.* 2007b und 2008, Saul *et al.* 2008, Pietsch *et al.* 2011). Zudem erhöhte die Quercetin-Behandlung die DAF-16-Translokation in die Zellkerne der Nematoden (Kampkötter *et al.* 2007b, Kampkötter *et al.* 2008, Grünz *et al.* 2012). Auch in *C. elegans*-Modellen für Morbus Alzheimer wies das Flavonoid protektive Wirkungen auf. Hierbei werden antioxidative Effekte, die Hemmung der *in vitro*-A β -Fibrillenbildung und die Modulation von Proteindegradationsprozessen als ursächlich gesehen (Jagota & Rajadas 2012, Smith & Luo 2003, Regitz *et al.* 2014). Aufgrund der ausführlichen Untersuchungen des Flavonoids in *C. elegans* wurde Quercetin als Vergleichsbasis für die anderen Flavonole und methylierten Derivate gewählt.

Galangin. Das Flavonol weist neben der 3-OH-Gruppe zwei weitere Hydroxylgruppen an Position C5 und C7 auf und kommt in Propolis und Gewächsen der Ingwerfamilie vor (Tao *et al.* 2006, Gardana *et al.* 2007). Bisher sind über das Flavonol antibakterielle, antivirale und antikanzerogene Eigenschaften aus vorwiegend *in vitro*-Versuchen bekannt (Cushnie *et al.* 2003, Amoros *et al.* 1992, Cao *et al.* 2016). Daneben konnte bereits gezeigt werden, dass eine Galangininkubation vor oxidativen Stress in humanen retinalen Epithelzellen und Keratozyten schützte (Hanneken *et al.* 2006, Madduma Hewage *et al.* 2015). Fütterungsstudien weisen außerdem darauf hin, dass der Pflanzenstoff den Glukosestoffwechsel in diabetischen Tiermodellen normalisieren kann (Sivakumar *et al.* 2010, Sivakumar & Anuradha 2011). Ergebnisse zum neuroprotektiven Potential von Galangin sind jedoch begrenzt und z.T. kontrovers: In humanen Neuroblastom-Zellen (SH-SY5Y) senkte eine Galangininkubation die Produktion von A β ₁₋₄₂-Peptiden über eine Modulation der proteolytischen Spaltung des Vorläuferpeptids (Zeng *et al.* 2015). Hingegen konnten keine protektiven Effekte des Naturstoffes auf die kognitiven Fähigkeiten von Nagern gefunden werden (Lei *et al.* 2012).

Fisetin: Die Flavonolstruktur von Fisetin unterscheidet sich von Quercetin nur durch das Fehlen der OH-Gruppe an C5. Der Mensch nimmt den Pflanzenstoff über Lebensmittel wie z. B. Erdbeeren, Äpfel und Zwiebeln auf (Übersichtsartikel von Khan *et al.* 2013). Aufgrund der zwei OH-Gruppen in o-Stellen besitzt das Flavonoid potente antioxidative Eigenschaften *in vitro* (Myara *et al.* 1993, Ishige *et al.* 2001, Kang *et al.* 2014). Zudem zeigte Fisetin in verschiedenen Zellkulturstudien antiatherosklerotische, antiinflammatorische und neuroprotektive Effekte, die z. B. über die Aktivierung der Nrf2-abhängigen Genexpression vermittelt wurden (Lee *et al.* 2011, Smirnova *et al.* 2011, Seo & Jeong 2015, Kim *et al.* 2016). Studien an Nagern weisen auf ein neuroprotektives Potential des Flavonols hin, wobei Defizite in Langzeitgedächtnis und Lernverhalten durch die Fisetin-Behandlung ausgeglichen werden konnten. Fisetin induzierte hierbei u. a. PI3K- und MAPK-Signalwege (Maher *et al.* 2006, Maher *et al.* 2011, Currais *et al.* 2014, Ahmad *et al.* 2016). Zudem inhibiert das Flavonoid die *in vitro*-A β -Fibrillenbildung (Kim *et al.* 2005, Akaishi *et al.* 2008). In *C. elegans* erhöhte eine Fisetin-Behandlung die Resistenz gegenüber thermalem Stress möglicherweise durch eine Reduktion der ROS-Bildung (Kampkötter *et al.* 2007a). Daneben erhöhte der Pflanzenstoff die nukleäre DAF-16-Akkumulation und die Expression der Histon-Deacetylase SIR-2.1 im Nematoden (Wood *et al.* 2004, Kampkötter *et al.* 2007a). In *Drosophila melanogaster* verlängerte eine Fisetin-Behandlung die Lebensspanne (Wood *et al.* 2004).

Morin. Der Naturstoff kommt z. B. in der Pflanzengattung der Maulbeeren (*Moraceae*) und im Rotwein vor (Fang *et al.* 2006, Yang *et al.* 2010). Die Flavonolgrundstruktur ist bei dieser Verbindung um vier

weitere OH-Gruppen an den Positionen C7, C5, C2' und C4' substituiert. Der Pflanzenstoff besitzt potente antioxidative Eigenschaften gegenüber der Lipidperoxidation und LDL-Oxidierung *in vitro* (Yuting *et al.* 1990, Naderi *et al.* 2003). Des Weiteren schützt eine Morin-Behandlung vor γ -Strahlung- und H₂O₂-induzierten Lipidmembran- und DNA-Schäden *in vitro*, wobei verschiedene Stresssignalwege durch das Flavonol reguliert werden können (Zhang *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2011). Im Nagermodell wurden ebenfalls antioxidative und antiinflammatorische Wirkungen des Pflanzenstoffes nachgewiesen, sowie eine Aktivierung von Nrf2 (Ola *et al.* 2014, Athira *et al.* 2016, Ma *et al.* 2016, Mathur *et al.* 2016). Aus Zell- und Tierversuchen sind potente neuroprotektive Wirkungen von Morin bekannt. Neben den antioxidativen Eigenschaften des Flavonols werden hierbei weitere molekulare Mechanismen, wie die Inhibierung oder Aktivierung von Kinasen oder die Prozessierung von amyloidogenen Proteinen, diskutiert (Gong *et al.* 2011, Du *et al.* 2016, Lee *et al.* 2016). Eine Studie von Jagota & Rajadas (2012) zeigte ebenfalls, dass eine Morin-Behandlung vor der altersabhängigen A β -Toxizität in einem transgenen *C. elegans*-Stamm schützt.

Myricetin. Das Flavonol aus Beeren, Wein und verschiedenen Gemüsearten ist aus der Literatur u. a. für antiinflammatorische, immunmodulatorische, antidiabetische und antikanzerogene Wirkungen bekannt (Übersichtsartikel von Semwal *et al.* 2016). Aufgrund der drei Hydroxylgruppen an den Positionen C3', C4' und C5' besitzt Myricetin potente radikalfangende Eigenschaften *in vitro* (Übersichtsartikel von Semwal *et al.* 2016). Zusätzlich schützt eine Myricetin-Inkubation vor oxidativem Stress, indem u. a. antioxidative Enzyme über die Regulation von PI3K/Akt-, MAPK- und Nrf2-Signalwegen in verschiedenen Zellmodellen induziert werden (Ah Kang *et al.* 2010, Wang *et al.* 2010, Qin *et al.* 2013). Darüber hinaus wird das Flavonoid als mögliches Therapeutikum gegen Morbus Alzheimer diskutiert. Aus *in vitro*-Versuchen gibt es Hinweise darauf, dass Myricetin A β -Fibrillen bindet, mit diesen interagiert und dadurch die Fibrillogenese hemmt (Ono *et al.* 2003, Choi *et al.* 2008, Naldi *et al.* 2012). Weiterhin reduzierte das Flavonol die Menge von A β -Oligomeren in verschiedenen Zelllinien (Shimmyo *et al.* 2008, Ono *et al.* 2012). Ähnliche Ergebnisse wurden in einem Alzheimer-Rattenmodell gefunden, wobei eine Myricetin-Behandlung den A β -Aggregationsweg von Monomeren zu Oligomeren inhibierte (Hamaguchi *et al.* 2009). Experimente mit *C. elegans* weisen darauf hin, dass eine Behandlung mit dem Naturstoff die ROS-Akkumulation reduzieren, die Lebensspanne verlängern und die DAF-16-Translokation in den Zellkern induzieren kann (Grünz *et al.* 2012, Büchter *et al.* 2013). Büchter *et al.* (2013) konnten zeigen, dass diese protektiven Effekte von Myricetin über DAF-16 vermittelt werden, wohingegen die Arbeitsgruppe von Grünz *et al.* (2012) keine Abhängigkeit feststellen konnte.

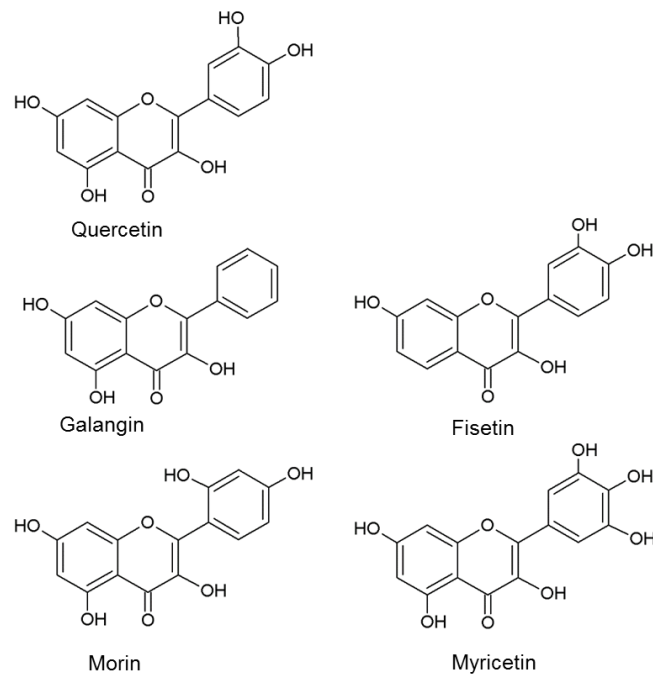


Abbildung 8: Strukturen ausgewählter Flavonole.

1.2.2.2 Flavanone

Flavanone zeichnen sich durch eine Carbonylgruppe (C=O) im C-Ring aus und kommen vor allem in Zitrusfrüchten vor, wo sie oftmals glykosyliert an Position C7 vorliegen und einen bitteren Geschmack vermitteln (Manach *et al.* 2004). Die ausgewählten Verbindungen sind in Abb. 9 dargestellt.

Naringenin. Das Flavanon trägt an C5, C7 und C4' Hydroxylgruppen und ist vor allem in Grapefruitfrüchten zu finden (Übersichtsartikel von Manach *et al.* 2004). In Zellversuchen wurden bereits antiinflammatorische Eigenschaften sowie eine schwache östrogene Aktivität von Naringenin nachgewiesen (Zierau *et al.* 2003, Hämäläinen *et al.* 2007). Auch im Tierversuch zeigte der Naturstoff antiinflammatorische Wirkungen, wobei Naringenin u. a. die *Nrf2*-mRNA-Expression in dem verletzten Gewebe induzierte (Manchope *et al.* 2016). Harmon & Patel (2004) zeigten außerdem, dass Naringenin die Insulin-induzierte Akt- und MAPK-Phosphorylierung inhibierte, wodurch die Glukoseaufnahme und Proliferation von MCF-7-Zellen gehemmt wurde. Weiterhin weist Naringenin im Zell- und Nagermodell lipidmodulatorische, antioxidative und zytoprotektive Eigenschaften auf (Renugadevi & Prabu 2009, Mulvihill *et al.* 2009, Goldwasser *et al.* 2010). In *C. elegans* reduzierte eine Naringenin-Behandlung die Lipidakkumulation und erhöhte die SOD-3-Proteinexpression, welche auf eine verstärkte nukleäre Akkumulation von DAF-16 zurückzuführen war. Das Flavanon hatte jedoch keinen Einfluss auf mitochondriale Superoxidbildung, Proteincarbonylgehalt und Lebensspanne der Nematoden (Grünz *et al.* 2012, Bhattacharya *et al.* 2013). In verschiedenen Tiermodellen wurden neuroprotektive Eigenschaften von Naringenin gezeigt (Zbarsky *et al.* 2005, Khan *et al.* 2012, Chtourou *et al.* 2014, W. Yang *et al.* 2014, Ghofrani *et al.* 2015). Eine Naringenin-Behandlung bewirkte z. B. eine gesteigerte Lern- und Gedächtnisleistungen in Ratten, denen A β -Peptide oder Streptozotocin in kritische Gehirnbereiche injiziert wurden (Khan *et al.* 2012, Ghofrani *et al.* 2015).

Liquiritigenin (LQ). Das aus der Süßholzwurzel (*Glycyrrhizae radix*) stammende Flavanon unterscheidet sich vom Naringenin durch das Fehlen der OH-Gruppe an C5 und ist vor allem für seine östrogene Wirkung bekannt (Kupfer *et al.* 2008). Daneben scheint LQ indirekte antioxidative Wirkungen aufzuweisen, beispielsweise induzierte der Pflanzenstoff die Nrf2-abhängige Expression in Hepa1c1c7 und HepG2 Zellen (Hajirahimkhan *et al.* 2015, Gong *et al.* 2015). Auch die antiinflammatorische Wirkung des Flavanons im Zell- und Tiermodell scheint über die Modulation antioxidativer Enzyme vermittelt zu werden (Yu *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2015). Des Weiteren wies LQ eine Antidepressiva-ähnliche Wirkung in chronisch gestressten Mäusen auf. Dieser Effekt war mit einer Erhöhung der Serumkonzentration antioxidativer Enzyme und der Induktion des PI3K-Signalweges assoziiert (Tao *et al.* 2016). Im Gegensatz dazu inhibierte das Flavonoid den PI3K-Signalweg in Gliomzellen und aktivierte MAPK-Signalwegen in hepatischen Karzinomzellen (Wang *et al.* 2014, Liu *et al.* 2015). Weiterhin weist der Pflanzenstoff neuroprotektive Eigenschaften auf: In hippocampalen Nervenzellen schützte eine LQ-Inkubation vor A β ₍₂₅₋₃₅₎- und Glutamat-induzierter Zytotoxizität (Liu *et al.* 2009, Yang *et al.* 2013). Letzteres wird u. a. mit der Reduktion der intrazellulären ROS-Spiegel erklärt (Yang *et al.* 2013). In einem murinen Alzheimermodell erhöhte eine LQ-Behandlung die Gedächtnisleistung der Mäuse, was mit einer Reduktion der AChE-Aktivität und Konzentration von A β -Oligomeren im Gehirn assoziiert war (Liu *et al.* 2011). In *C. elegans* wurde die Wirkung von *Glycyrrhiza uralensis*-Extraktinhaltsstoffen untersucht, wobei LQ die Anzahl der A β -Aggregate in einem transgenen Stamm Alzheimer-Stamm reduzierte. Die A β -induzierte Toxizität blieb jedoch durch die Behandlung unbeeinflusst (Link *et al.* 2015).

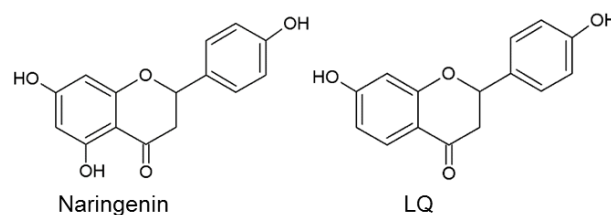


Abbildung 9: Strukturen ausgewählter Flavanone.

1.2.2.3 Methylierte Flavonoide

Der Einfluss einer Methylierung auf die Bioaktivität von Flavonoiden in *C. elegans* wurde anhand von drei Derivaten des Quercetins untersucht. Die Strukturen der Verbindungen sind in Abb. 10 dargestellt.

Quercetin-3-Methylether (Q-3-M). Das Quercetinderivat besitzt eine Methoxygruppe an C3 und kommt natürlich in vielen medizinischen Pflanzen vor, zu welchen u. a. Korbblütler, Kakteenarten und Kreuzdorngewächse gehören (Wei *et al.* 2001, Lee *et al.* 2003, Takeara *et al.* 2003, Rubio *et al.* 2007). Der Naturstoff zeigt *in vitro* potente antiinflammatorische und antikanzerogene Eigenschaften, die die Bioaktivität von Quercetin übertreffen (Wei *et al.* 2001, Rubio *et al.* 2006, Li *et al.* 2013). In einem Modell mit murinen Leberzellen (FL83B) schützte das methylierte Flavonoid vor Cu²⁺-induzierter Zytotoxizität, was mit einer Erhöhung der FOXO3A-Proteinexpression und Reduktion der ROS-Spiegel assoziiert war (Li *et al.* 2013). Des Weiteren zeigte eine Q-3-M-Inkubation neuroprotektive Eigenschaften in kortikalen Rattenzellen: Das Derivat inhibierte den H₂O₂-induzierten neuronalen Zelltod (halbmaximale inhibitorische Konzentrationen (IC₅₀): 0,6 µg/ml \approx 1,9 µM) und war fast zehnmal potenter als Quercetin

(Dok-Go *et al.* 2003). In einem Rattenmodell für zerebrale Ischämie reduzierte eine Q-3-M-Behandlung das Infarktvolume im Gehirn und verminderte neurologische Defizite (Jung *et al.* 2012).

Isorhamnetin bzw. 3'-O-Methylquercetin. Der Naturstoff kommt zusammen mit Quercetin in vielen Gemüse- und Obstsorten wie Zwiebeln und Äpfeln vor (Park & Lee 1996, Schieber *et al.* 2002). Des Weiteren wird Quercetin in Säugern und in *C. elegans* zu Isorhamnetin metabolisiert (Manach *et al.* 1996, de Boer *et al.* 2005, Surco-Laos *et al.* 2011). Huebbe *et al.* (2010) konnten zeigen, dass die Konzentration von Isorhamnetin nicht nur im Plasma, sondern auch im Gehirn von Mäusen (C57BL/6) nach einer 6 wöchigen Quercetin-Fütterung (2 mg/g Futter) ansteigt. Die Verbindung ist vor allem für ihre antioxidativen Eigenschaften in Zellkulturen und in verschiedenen Tiermodellen bekannt (Hwang & Yen 2009, Sun *et al.* 2013, Qiu *et al.* 2016). Die Wirkungsweise wird dabei auf eine Interaktion mit zellulären Stresssignalwegen zurückgeführt: beispielsweise erhöhte eine Isorhamnetininkubation die nukleäre Translokation von Nrf2 in HepG2 und murinen hepatische Sternzellen (Yang *et al.* 2014 und 2016). In *C. elegans* steigerte das Flavonoid nicht nur die Resistenz gegenüber oxidativem und thermalem Stress, sondern verlängerte auch die Lebensspanne (Surco-Laos *et al.* 2012). Wie Q-3-M schützte Isorhamnetin (100 µM) vor H₂O₂-induziertem neuronalen Zelltod, lag jedoch unter der biologischen Aktivität von Quercetin (Wu *et al.* 2016). Im ischämischen Rattenmodell reduzierte eine Isorhamnetin-Behandlung das Infarktvolume und neurologische Defizite, was über eine Aktivierung von Nrf2 vermittelt wurde (Zhao *et al.* 2016).

Tamarixetin bzw. 4'-O-Methylquercetin. Wie Isorhamnetin entsteht Tamarixetin aus Quercetin durch Konjugierungsreaktionen in Darm- und Leberzellen (Van Der Woude *et al.* 2004). In *C. elegans* findet eine Transformation von Quercetin zu Tamarixetin nicht in nennenswerten Mengen statt (Surco-Laos *et al.* 2011). Das Flavonol zeigt potente antiinflammatorische und anticancerogene Eigenschaften *in vitro* (Moltke *et al.* 2004, Nicolini *et al.* 2013). In *C. elegans* erhöhte Tamarixetin die thermale Stresstoleranz und verlängerte die Lebensspanne (Surco-Laos *et al.* 2012). Des Weiteren fungiert die Substanz als Acetylcholinesterase (AChE)- und Cytochrome P450 (CYP) 2C-Inhibitor (Min *et al.* 2010, Wang *et al.* 2014).

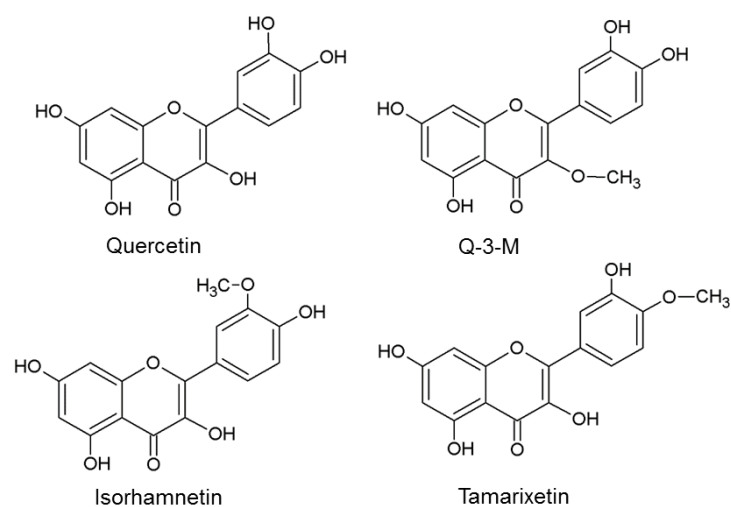


Abbildung 10: Strukturen methylierter Quercetinderivate.

1.2.2.4 Prenylierte Flavonoide

Der Einfluss einer Prenylierung auf die Bioaktivität von Flavonoiden in *C. elegans* wurde anhand von zwei prenylierten Naringeninderivaten untersucht. Vergleichend dazu wurde auch ein methyliertes Naringeninderivat analysiert. Die Strukturen sind in Abb. 11 dargestellt.

8-Prenylnaringenin (8-PN) und 6-Prenylnaringenin (6-PN). Die Naringeninderivate weisen eine Prenyleinheit an C8 oder C6 auf und sind Bestandteile von *Humulus Lupulus L.*, wobei die strukturverwandten Verbindungen Xanthohumol und Isoxanthohumol in höheren Konzentrationen in der Hopfenblüte vorliegen (Milligan *et al.* 2000). Bei der Verdauung können jedoch fast 80 % des Isoxanthohumol-Bestandteils vom Mikrobiom im distalen Kolon zu 8-PN konvertiert werden (Possemiers *et al.* 2006). Die Prenylierung von Naringenin erhöht die östrogene Wirkung, wobei 8-PN die höchste Aktivität besitzt und sowohl an den α -Östrogenrezeptor (ÖR) als auch an den β ÖR bindet (Milligan *et al.* 2000, Zierau *et al.* 2003, Kretzschmar *et al.* 2010). 8-PN wird daher als Östrogensatztherapie diskutiert, da das prenylierte Flavanon in Rattenstudien sowohl Osteoporose vorbeugt als auch die Plasma-Cholesterinkonzentrationen senkte (Sehmisch *et al.* 2008, Böttner *et al.* 2008). Mechanistische Studien an MCF-7-Zellen weisen darauf hin, dass 8-PN den PI3K/Akt-Signalweg inhibieren kann (Brunelli *et al.* 2009). Zusätzlich zeigen Blanquer-Rosselló *et al.* (2013), dass bereits geringe Konzentrationen 8-PN (0,01 μ M bis 20 μ M) die ROS-Konzentration senken und 1 μ M 8-PN die SIRT1-Proteinexpression in MCF-7-Zellen erhöhen. In zwei *in vitro*-Systemen wurde zudem beschrieben, dass 8-PN die Nrf2-abhängige Enzymexpression induzieren kann (Miranda *et al.* 2000, Dietz *et al.* 2013). Des Weiteren wurden antiproliferative Effekte von 8-PN in diversen Krebszelllinien nachgewiesen (Delmulle *et al.* 2006, Busch *et al.* 2015).

Isosakuranetin (ISK). Das Flavanon besitzt an C4' eine Methoxygruppe und kommt hauptsächlich in Orangen vor (Gattuso *et al.* 2007). Zellkulturstudien weisen darauf hin, dass das Flavonoid Stoffwechselfunktionen beeinflussen kann, z. B. erhöhte ISK die Glukoseaufnahme in L6 Muskelzellen und inhibiert die Cholesterinaufnahme in Caco-2-Zellen (Kawabata *et al.* 2011, Nekohashi *et al.* 2014). In spontan hypertensiven Ratten scheint eine Behandlung mit ISK den Blutdruck zu reduzieren (Maruyama *et al.* 2009). Das Flavanon wurde bisher noch nicht in *C. elegans* untersucht.

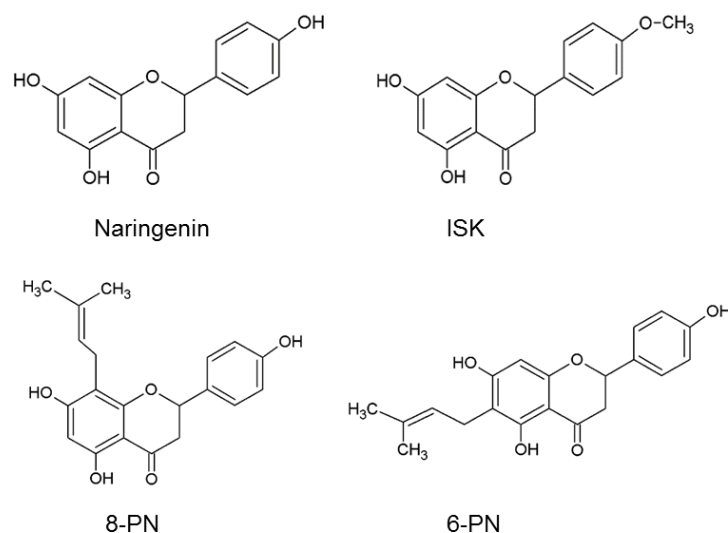


Abbildung 11: Strukturen ausgewählter methylierter und prenylierter Verbindungen.

1.3 Zielsetzung

Der Pathomechanismus von Morbus Alzheimer wird durch die vorherrschende Amyloid-Hypothese erklärt, wobei A β -Peptide der Variante 42 eine Kaskade von biochemischen Prozessen, die die zelluläre Homöostase im Gehirn stören, induzieren (Übersichtsartikel von LaFerla *et al.* 2007). Da der ILS sowohl die oxidative Stressabwehr als auch Proteindegradationswege steuert, stellt eine altersbedingte Fehlregulation dieses Signalweges eine mögliche Verknüpfung zwischen dem Alterungsprozess und Morbus Alzheimer dar (Übersichtsartikel von Baumeister *et al.* 2006). Eine flavonoidreiche Ernährungsweise wird als eine mögliche Präventionsstrategie gegenüber Morbus Alzheimer diskutiert, zumal die Bioaktivität der Flavonoide auf direkten antioxidativen Eigenschaften und der Modulation zellulärer Signalwege beruht (Übersichtsartikel von Williams & Spencer 2012). Da Ergebnisse aus epidemiologischen Studien jedoch häufig kontrovers und Tierversuche aufwendig sind, wird in dieser Arbeit der Nematode *C. elegans* als alternatives Modellsystem verwendet, um die molekularen Mechanismen von Flavonoide *in vivo* zu untersuchen.

Der Einfluss von flavonoidreichen Pflanzenextrakten auf die A β ₁₋₄₂-Toxizität wird mittels eines transgenen Stammes (CL4176), der humane A β ₁₋₄₂-Peptide in den Körperwandmuskelzellen exprimiert, analysiert. Anschließend werden Vertreter der Flavonole und Flavanone als mögliche bioaktive Inhaltsstoffe der Extrakte untersucht. Neben unsubstituierten Verbindungen sollen auch in den Extrakten enthaltene methylierte und prenylierte Flavonoide untersucht werden, um mögliche Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzuklären. Neben der A β ₁₋₄₂-Toxizität wird auch die Wirkung der Naturstoffe auf die A β -Plaques-Akkumulation im transgenen *C. elegans*-Modell (CL2006) untersucht. Um zu überprüfen, ob die protektiven Effekte der Naturstoffe auf deren antioxidativen Aktivität beruhen, wird zuerst die radikalfangende Kapazität *in vitro* mittels der *Trolox Equivalent Antioxidative Capacity* (TEAC)-Methode gemessen. Anschließend wird die antioxidative Wirkung der Substanzen in *C. elegans* analysiert. Hierbei werden die ROS-Spiegel im Morbus Alzheimer-Modell (CL4176) und im Wildtypen (N2) unter thermalem Stress mit der Fluoreszenzsonde Dichlorofluorescein (DCF) gemessen. Ziel dabei ist es herauszufinden, ob die Flavonoide spezifisch im Morbus Alzheimer-Modell (CL4176) oder auch unter basalen Bedingungen in *C. elegans* (N2) wirken. Da eine erhöhte Stresstoleranz sowohl mit antioxidativen Effekten als auch mit einer Protektion gegenüber der A β ₁₋₄₂-induzierten Paralyse in *C. elegans* assoziiert ist, soll anschließend überprüft werden, ob die Naturstoffe die thermale Stressresistenz der Nematoden (N2) beeinflussen (Link 2006, Wu *et al.* 2010). Nach den phänomenologischen Effekten, wird anschließend die Wirkungsweise der ausgewählten Flavonoide auf molekularer Ebene erforscht. Zu diesem Zweck wird die nukleäre Translokation von zwei Transkriptionsfaktoren des ILS mittels transgener *C. elegans*-Stämme, die entweder ein DAF-16::GFP- oder ein SKN-1::GFP-Fusionsprotein (TJ356 oder LD001) exprimieren, untersucht. Anschließend wird die Proteinexpression des DAF-16-Zielgens HSP-16.2 mittels eines HSP-16.2::GFP-Stammes (CL2070) im Fluoreszenzspektrometer analysiert. Im letzten Schritt soll überprüft werden, ob die Protektion gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* (CL4176) durch spezifische Flavonoide von DAF-16 abhängig ist. Zu diesem Zweck werden die Paralyseversuche unter *daf-16* RNAi-Bedingungen wiederholt.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
2,7-Dichlorodihydrofluorescein (DCF)-Diacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Albumin aus Rinderserum, Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Ampicillin-Natrium (Amp)	Calbiochem, VWR International GmbH, Darmstadt, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Bacto™ Agar	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Bacto™ Pepton	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Bacto™ Trypton	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Bacto™ Yeast (Hefeextrakt)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Calciumchlorid Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Cholesterin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol (EtOH) 96 %, vergällt mit 1 % Methylethylketon	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
EtOH abs. 99 %	VWR International GmbH, Darmstadt, D
5-Fluoro-2'-deoxyuridin (FUDR)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Glycerin	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Promega Corp, Madison, Wisconsin, USA
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, D

Kalziumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Levamisol-Hydrochlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumhypochloridlösung 13 %	Bernd Kraft GmbH, Düsseldorf, D
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Pepton aus Soja	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Streptomycin Sulfat (Strep)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
SYTOX® Green Nucleic Acid Stain (5mM in DMSO)	MolecularProbes, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Tetracyclin Hydrochlorid (Tet)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Thioflavin S (ThS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Triton X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Tween® 20	Merck KGaA, Darmstadt, D
Wasserstoffperoxid 33 %	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, D

2.2 Naturstoffe

Naturstoff	Reinheit	Hersteller
6-Prenylnaringenin	HPLC = 99,75 %	PhytoLab, MB-Holding GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth, D
8-Prenylnaringenin	HPLC = 97,3 %	PhytoLab, MB-Holding GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth, D
Fisetin (3,3',4',7-Tetrahydroxyflavon)	HPLC ≥ 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Galangin (3,5,7-Trihydroxyflavon)	HPLC ≥ 95 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D

Hibiskus-Extrakt getrocknet (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) (HE)	wässriger Extrakt, 100 % nativ	Plantextrakt GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth, D
Hopfenblüten-Trockenextrakt (<i>Lupuli e. flos spir. sicc.</i>) (HOE)	ethanolischer Extrakt, 80 % nativ, 17 % Lactose- Monohydrat, 3 % hochdisperses Siliciumdioxid)	Finzelberg GmbH & Co. KG, Andernach, D
Isorhamnetin (3,4',5,7- Tetrahydroxy-3'-methoxyflavon)	HPLC ≥ 99 %	Extrasynthese, Z.I Lyon Nord, F
Isosakuranetin (5,7-Dihydroxy-4'- methoxyflavanon)	HPLC ≥ 99 %	Extrasynthese, Z.I Lyon Nord, F
Liquiritigenin (4',7- Dihydroxyflavanon)	HPLC ≥ 98.5 %	Extrasynthese, Z.I Lyon Nord, F
Morinhydrat (2',3,4',5,7- Pentahydroxyflavon)	HPLC ≥ 85 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Myricetin (3,3',4',5,5',7- Hexahydroxyflavone)	HPLC ≥ 99 %	Extrasynthese, Z.I Lyon Nord, F
Naringenin (4',5,7- Trihydroxyflavanon)	HPLC ≥ 99 %	Extrasynthese, Z.I Lyon Nord, F
Negletein (5,6-Dihydroxy-7- methoxyflavone)	HPLC ≥ 90 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Pinoresinol	HPLC ≥ 95 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Quercetin-3-Methylether (3',4',5,7- Tetrahydroxy-3-methoxyflavon)	HPLC ≥ 90 %	Extrasynthese, Z.I Lyon Nord, F
Quercetindihydrat (3,3',4',5,7- Pentahydroxyflavon Dihydrat)	HPLC ≥ 95 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Schisandrin B	HPLC ≥ 98 %	(LKT Labs), Biomol GmbH, Hamburg, D
Secoisolariciresinol	HPLC ≥ 95 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Sesamin	HPLC ≥ 95 %	(Cayman), Biomol GmbH, Hamburg, D
Tamarixetin (3,3',5,7-Tetrahydroxy- 4'-methoxyflavon)	HPLC ≥ 99 %	Extrasynthese, Z.I Lyon Nord, F

2.3 Lösungen und Puffer

Lösungen/ Puffer	Zusammensetzung
Bleichelösung	1:1 Mischung von 5 M Natriumhydroxid und 13%-iger Natriumhypochlorit-Lösung
BSA-Mix (10x)	10 g BSA 500 µL Strep (100 mg/ml) in 100 ml NGMk (sterilfiltriert)
DABCO-Lösung	2,5 g DABCO in 90 ml Glycerin und 10 ml 10x PBS
Einfrierlösung	30 % Glycerin in S-Basal (autoklaviert)
Fixierlösung (4 % PFA in PBS)	80 ml PBS (auf 60°C erwärmen) 4 g PFA 2 M NaOH (zur Klärung der Lösung) Abkühlen und auf 100 ml mit PBS auffüllen pH 6,9 Lagerung bei 4°C
Lösung A	0,5 g Cholesterin in 100 ml absoluten EtOH (unvergällt)
Lösung B (1 M CaCl₂)	27,8 g CaCl ₂ bzw. 36,8 g CaCl ₂ × 2 H ₂ O ad 250 ml ddH ₂ O (autoklaviert)
Lösung C (1 M MgSO₄)	30,1 g MgSO ₄ bzw. 61,6 g MgSO ₄ × 7 H ₂ O ad 250 ml mit ddH ₂ O (autoklaviert)
Lösung D (1 M KPO₄ Puffer)	108,3 g KH ₂ PO ₄ 35,6 g K ₂ HPO ₄ ad 1 l mit ddH ₂ O pH 6 (autoklaviert)
M9	6 g Na ₂ HPO ₄ 3 g KH ₂ PO ₄ 5 g NaCl 0,25 g MgSO ₄ × 7 H ₂ O ad 1 l ddH ₂ O

	(autoklaviert)
M9T	M9 mit 0,1 % Tween® 20 versetzt
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) (10x)	39,7 g Natriumchlorid 1,9 g Kaliumchlorid 7,21 g Dinatriumhydrogenphosphat 1 g Kaliumdihydrogenphosphat in 1 l ddH ₂ O pH 7,0 (autoklaviert)
PBST	1x PBS mit 0,1 % Tween® 20 versetzt
Permeabilisierungslösung	1 % Triton X-100 5 % β-Mercaptoethanol in 125 mM TRIS-Puffer
RNAi BSA-Mix (10X)	10 g BSA 1 ml Amp (100 mg/ml) 2,5 ml Tet (5 mg/ml) 2 ml 0,5 M IPTG in 100 ml NGM _{komplett} (sterilfiltriert)

2.4 Medien

Medien	Zusammensetzung
Lysogeny Broth (LB)	10 g Bacto™ Pepton 5 g Bacto™ Yeast 5 g NaCl ad 1 l ddH ₂ O (autoklaviert)
LB-Agar	10 g Bacto™ Pepton 5 g Bacto™ Yeast 5 g NaCl 20 g Bacto-Agar ad 1 l ddH ₂ O (autoklaviert) nach dem Abkühlen entsprechend Antibiotika hinzugeben
Nematodenwachstumsmedium-komplett (NGMk)	3 g NaCl 2,5 g Pepton

	<p>975 ml ddH₂O (autoklaviert) 1 ml Lösung A 0,5 ml Lösung B 1 ml Lösung C 25 ml Lösung D</p>
NGMk-Agar	<p>3 g NaCl 2,5 g Pepton 20 g Bacto-Agar 975 ml ddH₂O (autoklaviert) 1 ml Lsg. A 0,5 ml Lsg. B 1 ml Lsg. C 25 ml Lsg. D</p>
S-Basal	<p>5,85 g NaCl 1 g K₂HPO₄ in 1 l ddH₂O</p>
RNAi-Fütterungsplatten	<p>3 g NaCl 2,5 g Pepton 20 g Bacto-Agar 967,5 ml ddH₂O (autoklaviert) 2 ml 0,5 M IPTG (1 mM) 0,5 ml 100 mg/ml Amp (50 µg/ml) 2,5 ml 5 mg/ml Tet (12,5 µg/ml) 1 ml Lösung A 0,5 ml Lösung B 1 ml Lösung C 25 ml Lösung D</p>

2.5 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
12-Well-Platte (transparent)	Greiner bio-one International GmbH, Frickenhausen, D
35 mm Schalen	Greiner bio-one International GmbH, Frickenhausen, D
384 Well Platten schwarz	Greiner bio-one International GmbH, Frickenhausen, D
60 mm Schalen	Greiner bio-one International GmbH, Frickenhausen, D

94 mm Schalen	Greiner bio-one International GmbH, Frickenhausen, D
96-Well-Platte (transparent)	Greiner bio-one International GmbH, Frickenhausen, D
Abdeckfolie (schwarz)	PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA
Deckgläser für Objektträger	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, D
Flacon (15 und 50 mL)	Greiner bio-one International GmbH, Frickenhausen, D
Glasobjektträger	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, D
Glasobjektträger	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Parafilm	Bemis Company, Inc., Neenah, WI, USA
Pipettenspitzen (10,100, 1000 und 2500 µL)	Greiner bio-one International GmbH, Frickenhausen, D
Plastikküvetten	Greiner bio-one International GmbH, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	Greiner bio-one International GmbH, Frickenhausen, D
Stopfwatte	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D

2.6 *C. elegans*-Stämme

Bezeichnung	Beschreibung	Genotyp (beschrieben von)
CL2006	[pCL12(unc-54/human A-beta peptide (1-42) minigene); pRF4 rol-6 (su1006)], progressive Paralyse	dvls2 (Link 1995)
CL2070	[hsp-16.2p::GFP + rol-6 (su1006gf)]	dvls70 (Link <i>et al.</i> 1999)
CL4176	[(pAF29)myo-3p::A-beta (1-42)::let-? 3'UTR) + pRF4 rol-6 (su1006)], temperaturinduzierbare Paralyse	smg-1(cc546) I; dvls27 X. (Link 2003)
CL802	Kontrollstamm für CL4176	smg-1(cc546) I; rol-6(su1006) II. (Fonte <i>et al.</i> 2011)
LD001	[Pskn-1::skn-1b/c::gfp; pRF4 rol-6 (su1006gf)]	ldls007 (An & Blackwell 2003)
N2	Wildtyp	(Brenner 1974)
PD4261	[(pSAK2) myo-3p::GFP::LacZ::NLS + (pSAK4) myo-3p::mitochondrial GFP + dpy-20(+)]	ccls4251 I; dpy-20(e1282) IV. (Fire <i>et al.</i> 1998)
TJ356	[Pdaf-16::daf-16p::daf-16a/b::gfp; pRF4 rol-6 (su1006gf)]	zls356 IV (Henderson & Johnson 2001)
TK22	$\Delta mev-1$, sensitiv gegenüber oxidativen Stress	mev-1(kn1) III (Ishii <i>et al.</i> 1990)

2.7 Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung
OP50	<i>E. coli</i> B, uraxil auxotroph
OP50-1	OP50 mit Strep-Resistenz
HT 115 (DE3) L4440	<i>E. coli</i> , RNase III-defizient mit IPTG-induzierbarer T7 Polymeraseaktivität und Tet-Resistenz, enthält Amp-resistenten L4440 Vektor mit zwei T7 Promotoren, zwischen denen kein dDNA-Fragment eingefügt wurde (Leervektor) (Genotyp: F-, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, lambda -, rnc14::Tn10(DE3 lysogen: lavUV5 promoter -T7 polymerase) (IPTG-inducible T7 polymerase) (RNase III minus))
HT 115 (DE3) daf-16	HT115 (DE3) mit klonierten Fragment der daf-16 cDNA im L4440 Vektor

2.8 Geräte

Gerät	Hersteller
Bakterienschüttler - Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, D
Binokular - SMZ-168	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, D
Binokular - Stemi 2000	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Fluoreszenzmikroskop - Axioskop mit AxioCam MRC	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Fluoreszenzmikroskop - Eclipse Ni mit Intensilight C-HGFI	Nikon GmbH, Düsseldorf, D
Kamera - DS-Vi1 mit Digital Sight	Nikon GmbH, Düsseldorf, D
Kamera - Moticam 3	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, D
Metallblockthermostat - EPT-130-36/18-1,5/18-2,0	Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG Labortechnik, Bielefeld, D
Monochromator-basierter Multi-Detektions-Reader für Mikroplatten - Synergy HT	BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA
Monochromator-basierter Multi-Detektions-Reader für Mikroplatten - Synergy MX	BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA
pH-Meter - C860	Consort bvba, Turnhout, BL
Plattformschüttler - Unimax 1010 mit Inkubator 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, D
Stepper - Multipette®plus	Eppendorf AG, Hamburg, D

Thermoschrank	AQUALYTIC® Germany, Dortmund, D
Thermoschrank - IPP 500	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, D
Thermoschrank - Wtc	BINDER GmbH, Tuttlingen, D
Vortexer - Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Waage - PT600	Sartorius AG, Göttingen, D
Waage - Si64	Denver Instrument GmbH, Göttingen, D
Zentrifuge - Centrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge - Heraeus Megafuge 8	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA

2.9 Software

Software	Hersteller
Excel 2013	Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA
Gen 5 2.0	BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
ImageJ (Version 1.47v)	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Motic Images Plus (Version 2.0)	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, D
NIS-Elements D 4.30.02	Nikon GmbH, Düsseldorf, D
SPSS Statistics (Version 22)	IBM Corp., Armonk, NY, USA

3 Methoden

3.1 *in vitro*-Methoden

3.1.1 Bestimmung der radikalfangenden Kapazität (TEAC-Assay)

Die radikalfangenden Eigenschaften der zu untersuchenden Polyphenole wurden mittels dem TEAC Assay bestimmt. Das Prinzip beruht auf der Reaktivität von ABTS, das im oxidativen Milieu ein grünes Radikalkation bildet. Bei Reduktion des Kations durch Antioxidantien, kommt es zu einer Entfärbung der Lösung, welche photometrisch bestimmbar ist. Da sich die Abnahme der gemessenen Extinktion proportional zur radikalfangenden Aktivität der Substanz verhält, lässt sich anschließend eine quantitative Aussage über die antioxidative Kapazität der Testsubstanz treffen. Als Referenz wurde das synthetische Vitamin E-Derivat Trolox mitgeführt.

Zu Beginn wurde eine ABTS-Radikallösung aus gleichen Teilen ABTS (14 mM) und APS (4,9 mM) hergestellt und über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde die ABTS-Lösung mit 70%-igen Ethanol auf eine Absorption von 0,6 bei 734 nm in einer 96-Well-Platte mittels Photometer (Synergy MX, BioTek Instruments, Inc) eingestellt. Von Trolox wurde eine Verdünnungsreihe (0 μ M, 150 μ M, 300 μ M, 450 μ M und 600 μ M) und von den Naturstoffen eine 600 μ M konzentrierte Lösung in 70 %-igen Ethanol hergestellt. Anschließend wurden 10 μ l der jeweiligen Troloxverdünnung bzw. des Naturstoffes (600 μ M) in je ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert und 290 μ l der eingestellten ABTS-Lösung auf jedes Well hinzugegeben. Folglich lagen die Endkonzentrationen im Well für Trolox bei 0, 5, 10, 20 und 25 μ M und für die Naturstoffe bei 100 μ M. Als Leerwert wurden 300 μ l 70 %-iger Ethanol verwendet. Nach 6 min Inkubation wurde die Absorption bei 734 nm im Plattenlesegerät (Synergy MX, BioTek Instruments, Inc.) photometrisch bestimmt. Flavonoide, die die ABTS-Absorption um über 50 % reduzierten, wurden weiter zu Endkonzentration von 10, 25 und 50 μ M im Well verdünnt, mit ABTS-Lösung versetzt und erneut gemessen. Für Pflanzenstoffe, die in einer Konzentration von 10 μ M die ABTS-Radikale fast vollständig abfingen, wurde eine weitere Bestimmung mit den Endkonzentration 1,25, 2,5 und 5 μ M durchgeführt. Hierbei erfolgte die Messung im Triplikat. Alle Versuche wurden dreimal durchgeführt.

3.2 *in vivo*-Methoden

3.2.1 Kultivierung von *C. elegans*

Die Kultivierung der *C. elegans* Laborstämme erfolgte auf NGM-Agarplatten mit dem Uracil-auxotrophen *E. coli*-Stamm OP50 als Nahrungsquelle in einem temperaturkontrolliertem Inkubator. Dafür wurden 94 mm große Petrischalen mit frisch hergestelltem NGMk-Agar befüllte und nach einem Tag Aushärtung mit OP50 *E. coli*s beimpft. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert, sodass sich ein dichter Bakterienrasen bilden konnte. Nach dem Abkühlen der Petrischalen auf Raumtemperatur (RT) wurden diese bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Der wildtypische N2 Stamm wurde bei 20°C im Inkubator gehalten und zweimal pro Woche auf eine neue Platte übertragen, um Nahrungsmangel und Überpopulation zu vermeiden. Die TJ356, CL2006, LD001, CL2070, PD4251 und TK22-Stämme wurden ebenfalls bei 20 °C gehalten, wohingegen der Stamm CL4176 bei 16°C kultiviert wurde.

3.2.2 Kultivierung von Bakterienstämmen

3.2.2.1 OP50 und OP50-1 *E. coli*

Für die Kultivierung von *C. elegans* wurde ausschließlich der *E. coli*-Stamm OP50 und für die Experimente der Streptomycin (Strep)-resistente *E. coli*-Stamm OP50-1 eingesetzt.

Bei der Herstellung einer OP50-Bakterienkultur wurde zuerst eine Einzelkolonie von einer LB-Stammpatte in 200 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben übertragen. Anschließend wurde der Ansatz für ca. 18 h bei 37°C schüttelnd (200-220 rpm) inkubiert (Unimax 1010, Heideloph Instruments GmbH & Co.KG). Die frisch gewachsene *E. coli*-Suspension wurde nun aus dem Kolben in vier 50 ml-Röhrchen überführt und bei 4500 rpm für 15 min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 8, Thermo Fisher Scientific, Inc.). Zur Aufkonzentrierung der OP50-Bakterien wurde der Überstand aller Röhrchen bis auf 10 ml verworfen, das Bakterienpellet resuspendiert, anschließend vereinigt und in 2 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Analog dazu wurde die OP50-1 *E. coli*-Kultur aufgearbeitet. Für die Kultivierung wurden jedoch 50 µg/ml Strep aus einer 100 mg/ml Stocklösung hinzugegeben und die Aufkonzentrierung erfolgte in einem Volumen von 1,5 ml. Um eine mögliche Kontamination auszuschließen, wurde ein 3-Ösenausstrich der frischen Kultur auf einer LB-Agarplatte angefertigt und diese bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der Ausstrich mikroskopisch auf Reinheit überprüft.

Für die OP50-1 *E. coli*s wurde eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Hierfür wurde der konzentrierte Bakterienansatz 1:200 mit Wasser verdünnt und die Optische Dichte (OD) bei 600 nm bestimmt (Synergy MX, BioTek Instruments, Inc.). Die Messung wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Zur *ad libidum* Fütterung von *C. elegans* wurden 10^9 koloniebildende Einheiten (KBE)/ml in die Inkubationslösung eingesetzt. Die Berechnung des einzusetzenden Volumens erfolgte nach folgender Formel:

1.

$$OD_{\text{kai}} = OD_{\text{MW}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.

$$\frac{10^9 \times 1\text{ml}}{OD_{\text{kai}}} = \frac{\text{KBE}}{\text{ml}}$$

$$\text{gegeben, dass: } OD_{600} = 1 = 10^9 \frac{\text{KBE}}{\text{ml}}$$

OD_{MW} = Mittelwert der gemessenen OD aus zwei Verdünnungen einer Probe

OD_{kai} = kalkulierte OD einer Probe

Die konzentrierten Bakterien und die LB-Stammpatte wurden bei 4°C gelagert. Die hergestellten OP50-1 *E. coli*s wurden am nächsten Tag hitzeinaktiviert. Hierbei erfolgte eine Überführung von max. 500 µl Bakteriensuspension in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß, welches für 30 min bei 65°C in den Metallblock-Thermostat (EPT-130-36/18-1,5/18-2,0, Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG Labortechnik) gestellt wurde. Eine Überprüfung der Hitzeinaktivierung wurde mittels 3-Ösenausstrich analog zur Kontaminationsüberprüfung durchgeführt. Die abgetöteten OP50-1 *E. coli*s wurden anschließend 1:1 mit Einfrierlösung verdünnt, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

3.2.2.2 HT115 *E. coli*

Für RNAi-Experimente wurde der Ribonuklease (RNase) III-defizienten *E. coli* Stamm HT115 mit einem T7-Expressionssystem (DE3) verwendet. Dieser Stamm ist Tet-resistent und enthält eine IPTG-induzierbare Polymeraseaktivität aus der Bakteriophage T7. In *E. coli*s wird die Expression von Proteinen für den Laktosemetabolismus durch das *lac* Operon reguliert. Das *lac* Operon ist eine Funktionseinheit der genomischen DNA, an die die *E. coli*-Polymerase bindet, um die mRNA für die Laktose-metabolisierenden Enzyme LacZ, LacY- und LacA zu transkribieren. In Abwesenheit von Laktose fungiert das Protein des *lacI* Gens als Repressor des *lac* Operons. Eine Bindung von Allolaktose bzw. IPTG an den *lac*-Repressor verändert dessen Konformation. Der *lac*-Repressor dissoziiert von der DNA und die *E. coli*-Polymerase kann an das *lac* Operon binden. In dem HT115 (DE3) Stamm wurde zusätzlich der L4440 (pPD129.36)-Klonierungsvektor transformiert (Abb. 12). Dieser enthält zwei Bakteriophage-T7 Polymerasepromotoren in entgegengesetzter Orientierung, die durch eine Multiple Klonierungsstelle (MKS) voneinander getrennt sind. In die MKS können Polymerasekettenreaktion (PCR)-Amplifikate des zu untersuchenden Gens (*gene of interest (GOI)*) kloniert werden. Die in Anwesenheit von IPTG exprimierte T7 Polymerase transkribiert nun das eingefügte Gen in der MCS. Das hier gentechnisch eingefügte Gen für die T7-RNA-Polymerase in das *E. coli*-Chromosom wird durch das *E. coli lac*-Operon reguliert. In Anwesenheit von IPTG dissoziiert der *lac*-Repressor von der DNA und die *E. coli*-Polymerase exprimiert die T7 Polymerase. Der Klonierungsvektor enthält außerdem ein Amp-Resistenzgen. Bei Hinzufügen von Amp während der HT115-Kultivierung wird sichergestellt, dass sich nur die HT115-Bakterien vermehren, die auch den Klonierungsvektor tragen.

Ein eingebautes Tn10 Transposon unterbricht das *rnc14* Gene, das für die RNase III-Aktivität der HT115 *E. coli*s verantwortlich ist. Das Tn10 Transposon enthält zusätzliche eine Tet-Resistenz. Durch die Zugabe von Tet bei der Kultivierung von HT115 *E. coli*s bleibt somit die RNase III-Defizienz erhalten.

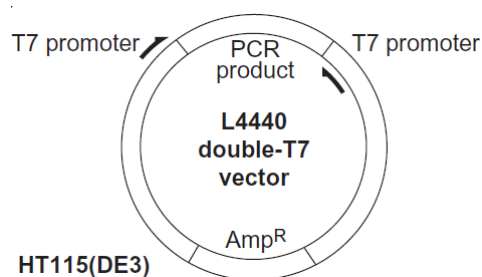


Abbildung 12: Schematische Darstellung des HT115-Klonierungsvektors.

(Kamath et al. 2000). Amp = Ampicillin, PCR product = Polymerasekettenreaktionsamplifikat des zu untersuchenden Gens.

Die Kultivierung von HT115-*E. coli*s erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Herstellung einer OP50-1 *E. coli*-Kultur. Als Einzelkolonieplatten wurden jedoch LB-Platten mit 50 µg/ml Amp (Stocklösung: 100 mg/ml) und 12,5 µg/ml Tet (Stocklösung: 5mg/ml) hergestellt. Von diesen Stammpplatten wurde eine Einzelkolonie abgetragen und in einen Erlenmeyerkolben mit LB-Medium und 50 µg/ml Amp überführt und für 18 h bei 37°C geschüttelt (Unimax 1010, Heideloph Instruments GmbH & Co.KG).

Anschließend wurde 1 mM IPTG (Stocklösung: 0,5 M) hinzugegeben und die Kultur wurde für weitere 4 h bei 37°C geschüttelt, um die Transkription doppelsträngiger RNAs des gewünschten Zielgens zu

induzieren. Es folgten Aufkonzentrierung, Konzentrationsbestimmung, Hitzeinaktivierung und Kontaminationsüberprüfung analog zur Kultivierung von OP50-1 *E. colis*.

3.2.3 Synchronisation von *C. elegans*

Für alle Experimente wurden alterssynchrone Tiere eingesetzt. Hierzu wurden die Nematoden mittels Bleiche- oder Eiablage-Methode synchronisiert.

3.2.3.1 Bleichesynchronisation

Für die Bleichesynchronisation wurden graviden Tieren mit 2,5 ml NGMk von einer dicht bewachsenen Kulturplatte abgespült und mittels Pipette in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Absinken der Nematoden auf den Boden des Reaktionsgefäßes wurde der Überstand verworfen und die Tiere mit 500 µl einer Bleichelösung für 1,5 min behandelt. Die Bleichelösung bestand aus gleichen Teilen einer 5 M NaOH- und einer 13 % NaClO-Lösung. Nach Zentrifugieren der Tiere bei 7500 rpm für 1 min (Centrifuge 5415D, Eppendorf AG) wurde der Überstand verworfen, die Nematoden in 2 ml NGMk gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift wurde dreimal wiederholt, wobei im letzten Schritt der Überstand bis auf ca. 500 µl entfernt wurde und das Pellet aus Eiern und toten Nematoden resuspendiert und auf eine neue NGMk-Platte mit ausgestrichenen OP50 überführt wurde. Die geschlüpften Nematoden konnten nach 2,5 Tagen bei 20°C als L4-Larven bzw. jung adulte Tiere für das Experiment eingesetzt werden. Die Bleichesynchronisation wurde für die Stämme N2, TJ356, CL2006 und TK22 vorgenommen.

3.2.3.2 Synchronisation per Eiablage

Die Synchronisation per Eiablage wurde für eine Behandlung ab dem Ei-Stadium für den temperatursensitiven Stamm CL4176 sowie für die Stämme TJ356, LD001, CL2070 und PD4251 angewandt. Hierbei wurden gravide Nematoden von einer Kulturplatte in 1,5 ml flüssiges NGMk mit hitzeinaktivierten OP50-1 oder HT115 *E. colis* überführt und für 4 h bei 16°C (CL4176) bzw. 20°C (TJ356, LD001, CL2070, PD4251) inkubiert. Anschließend wurden die abgelegten Eier mittels Pipette in die Inkubationslösung überführt.

3.2.4 Naturstoffinkubation von *C. elegans*

Die Behandlung von *C. elegans* mit den Naturstoffen erfolgte ab dem L4- oder jung adultem Stadium in 1,5 ml Inkubationsmedium in 35 mm großen Petrischalen. Inkubationen ab dem Ei-Stadium wurden in 12-Well-Platten mit je 0,7 ml Medium pro Well durchgeführt. Die Inkubationsschemata für die einzelnen Versuche sind in Abb. 13 dargestellt. Das Standard-Inkubationsmedium mit den Pflanzenextrakten und den Reinsubstanzen setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Hibiskus-Extrakt	Hopfen-Extrakt	Reinsubstanzen
0/ 0,5/ 1 mg/ml Extrakt 50 µg/ml Strep NGMk 10 ⁹ OP50-1/ml (lebend)	DMSO/ 0,125/ 0,25/ 0,5 mg/ml Extrakt 1 % BSA mit 50 µg/ml Strep NGMk 10 ⁹ OP50-1/ml (lebend)	DMSO/ 50/ 100 µM Substanz 1 % BSA mit 50 µg/ml Strep NGMk 10 ⁹ OP50-1/ml (inaktiviert)

Das Hibiskus-Extrakt wurde zuvor in einer Konzentration von 10 mg/ml in NGMk gelöst. Die Kontrollgruppe enthielt anstatt dem Extrakt die entsprechende Menge NGMk. Von dem Hopfenextrakt und den Reinsubstanzen wurden 250 mg/ml- bzw. 100- und 50 mM-Stocklösungen in DMSO hergestellt. Die Kontrollgruppe erhielt anstatt den Pflanzenstoff den entsprechenden Anteil DMSO (0,2 oder 0,1 %). NGMk diente als Basismedium und BSA als Träger für den Pflanzenstoff. Das Antibiotika Strep wurde zur Verhinderung von bakteriellen Kontaminationen eingesetzt und die Strep-resistenten OP50-1 *E. colis* dienten als Nahrungsquelle und wurden für die Reinsubstanzinkubation standardmäßig hitzeinaktiviert, um eine mögliche Wirkung des Naturstoffes auf die Bakterien auszuschließen. Ausgenommen sind hierbei die Experimente mit Lignan, bei denen lebenden OP50-1 *E. colis* verwendet wurden. Für die RNAi-Experimente wurden die entsprechenden hitzeinaktivierte IPTG-induzierte HT115 *E. colis* eingesetzt. Anstelle von Strep wurde dem BSA-Mix 50 µg/ml Amp und 12,5 µg/ml Tet zugesetzt. Die Behandlungs- und DMSO-Kontrollgruppen wurden mit Leer-Vektor-HT115-Bakterien bzw. GOI-Vektor-HT115-Bakterien inkubiert.

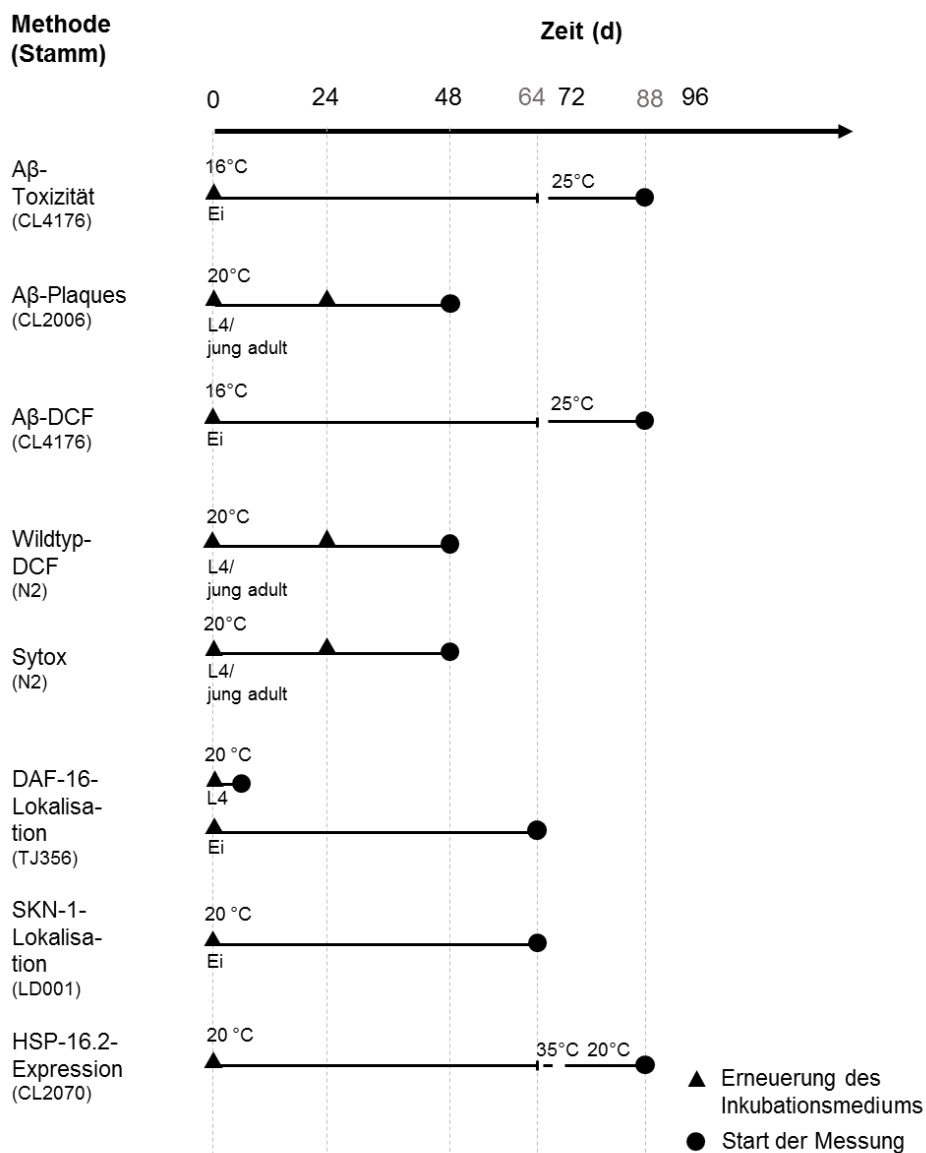


Abbildung 13: Übersicht der Inkubationsschemata.

Aβ = Amyloid beta Protein, DAF= Dauergen (*abnormal DAUER Formation*), DCF = Dichlorofluorescein, HSP = Hitzeschockprotein, SKN = SKINhead.

3.2.5 Untersuchung der A β ₁₋₄₂-induzierten Paralyse in *C. elegans* (A β ₁₋₄₂-Toxizitätsassay)

Um zu untersuchen, ob Pflanzenextrakte und Polyphenole schützend gegenüber Morbus Alzheimer wirken können, wurde der transgener *C. elegans*-Stamm CL4176 mit temperaturinduzierbarer A β ₁₋₄₂-Expression verwendet. Die Etablierung der A β ₁₋₄₂-Toxizitätsmethode erfolgte nach den Protokoll von Dostal *et al.* (2010) und Regitz *et al.* (2014) mit leichten Abänderungen: Die Nematoden des Stammes CL4176 wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Coffein als Positivkontrolle bzw. ddH₂O in 0,8 ml Flüssigmedium behandelt. Es wurde ebenfalls ein Inkubationen mit 10, 50 und 100 μ M Quercetin bzw. 0,1 % DMSO durchgeführt, um die Standardkonzentration für Flavonole im A β ₁₋₄₂-Toxizitätsassay zu ermitteln.

Nach Festlegung der experimentellen Bedingungen wurden die Versuche mit den Extrakten bzw. Reinsubstanzen wie folgt durchgeführt: adulte Nematoden vom Stamm CL4176 wurden per Eiablage in 1,5 ml flüssigem NGMk mit den jeweiligen *E.colis* bei 16°C synchronisiert (Siehe 3.2.3.2 Synchronisation per Eiablage). Anschließend wurden ca. 60 Eier in das jeweilige Inkubationsmedium mit dem Pflanzenextrakt, der Reinsubstanz oder der entsprechenden Kontrolllösung mit der Pipette überführt und für 64 h bei 16°C inkubiert. Anschließend wurden ca. 40 Larven pro Gruppe auf je eine 60 mm große NGMk-Platte mit OP50-Bakterien überführt und bei 25°C gestellt. Die NGMk-Platten wurden zuvor frisch hergestellt und nicht länger als zwei Wochen gelagert. Drei Tage vor Beginn der Paralyse-Testung wurden 250 μ l frisch hergestellte OP50-*E.colis*, deren OD₆₀₀ mit autoklavierten ddH₂O auf 0,4 bis 0,6 eingestellt wurde (Synergy MX, BioTek Instruments, Inc.), auf die Platten ausgestrichen. Nach 24 h Inkubation bei 25°C wurden die Tiere aller 2 h mit einem Platindraht untersucht, um das Einsetzen der Paralyse festzustellen. Tiere, die keine Bewegung zeigten oder nur den Kopf bewegten, wurden als „paralysiert“ klassifiziert. Verlorengegangene oder verletzte Tiere wurden zensiert.

Für die RNAi-Experimente wurden die synchronisierten Eier der CL4176-Tiere in RNAi-Inkubationsmedium \pm Reinsubstanz oder DMSO mit entsprechenden leer-Vektor oder GOI-Vektor HT115 *E. coli*s für 64 h bei 16°C inkubiert. Die Gruppen wurden auf 60 mm große NGM-RNAi-Fütterungsplatten mit den entsprechenden HT115 *E. coli*s überführt, zeitversetzt bei 25°C gestellt und nach 24 h aller 2 Stunden auf die Paralyse überprüft.

3.2.6 Bestimmung der Aggregation von Amyloid beta-Plaques in *C. elegans* (ThS-Assay)

Im menschlichen Gehirn bilden A β ₁₋₄₂-Peptide Fibrillen und aggregieren zu unlöslichen Plaques, welche als Kennzeichen von Morbus Alzheimer gelten. Da der transgene *C. elegans* Stamm CL4176 hauptsächlich niedermolekulare A β -Peptide bildet, wurde der CL2006 Stamm verwendet. In diesem Stamm aggregieren die A β ₁₋₄₂-Peptide zu Plaques, die über β -Faltblattstruktur-bindende Farbstoffe nachgewiesen werden können (Drake 2003).

Zur Untersuchung des Einfluss von Flavonoiden auf die Aggregation von A β ₁₋₄₂-Peptiden wurde der Farbstoff ThS verwendet (Abb. 14). ThS hat eine hohe Sensitivität gegenüber höhermolekularen A β -Ablagerungen, wohingegen verwandte Farbstoffe mit verschiedene A β -Spezies assoziieren. Nach Bindung an β -Faltblattstrukturen zeigt der Farbstoff eine verstärkte grüne Fluoreszenz.

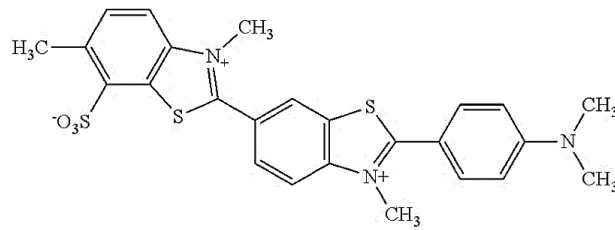


Abbildung 14: Thioflavin S, Fluoreszenzfarbstoff für die Markierung von A β Plaques.

Für die Experimente wurden ca. 100 synchronisierte L4 *C. elegans* vom Stamm CL2006 in 1,5 ml Flüssiginkubationsmedium mit dem Flavonoid oder der entsprechenden Kontrolle behandelt. Nach 24 h wurde das Medium erneuert und nach 48 h wurden die Nematoden für 1 h in 1,5 ml PBST gewaschen, um Substanzreste und anhaftende Bakterien zu entfernen. Anschließend wurden die Tiere in 2 ml Reaktionsgefäße mit 1 ml Fixierlösung, bestehend aus 4 % PFA in PBS, mit der Pipette überführt und über Nacht bei 4°C gelagert. Nach zwei Waschsritten in PBST wurden 400 μ l Permeabilisierungslösung auf die Nematoden gegeben und die Ansätze wurden für 24 h bei 37°C im Dunkeln geschüttelt (Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG). Die Nematoden wurden erneut zweimal in PBST gewaschen und anschließend gefärbt. Hierfür wurden die Tiere in 50 % Ethanol, anschließend in 0,125 % ThS-Lösung (in 50 % Ethanol) und erneut in 50 % Ethanol für je 2 min inkubiert. Nach Entfernung des Ethanols folgte ein letzter Waschsritt in 10x PBST für 2 min, welches anschließend so weit entfernt wurde, dass die Nematoden in einem geringen Volumen auf die Objektträger pipettiert werden konnten. Um ein schnelles Ausbleichen der ThS-Fluoreszenz zu verhindern wurden 5 μ l einer DABCO-Lösung auf die Tiere pipettiert und der Objektträger mit einem Deckgläschen und Vaseline versiegelt. Die Präparate wurden mittels Fluoreszenzmikroskop im GFP-Filter und mit 20-facher Vergrößerung betrachtet. Alle Plaques, die im Schwanz- und Kopfbereich sichtbar waren wurden gezählt. Für die Auswertung wurden die Tiere entsprechend der Anzahl der gezählten Plaques in vier Gruppen eingeteilt: A (0-15 Plaques/Tier), B (16-29 Plaques/Tier), C (30-45 Plaques/Tier) und D (> 45 Plaques/Tier). Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

3.2.7 Bestimmung der ROS-Akkumulation in wildtypischen *C. elegans* unter thermalem Stress (Wildtyp-DCF-Assay)

Der Einfluss der Flavonoide auf die ROS-Konzentration in *C. elegans* wurde mittels der DCF-Methode bestimmt. Das Prinzip beruht auf der Oxidierung des nicht fluoreszierenden 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceins (H₂DCF) zum grün fluoreszierenden DCF. Die Intensität des Fluoreszenzsignals verhält sich dabei proportional zur ROS-Menge im Nematoden. In dieser Arbeit wurde das veresterte Derivat 2',7'-H₂DCF-Diacetat (DA) verwendet, welches passiv durch die Zellmembran diffundiert. In der Zelle wird das Substrat von Esterasen zum H₂DCF gespalten und akkumuliert folglich intrazellulär.

Aufgrund der hohen oxidativen Empfindlichkeit der ROS-Sonde wurde eine 100 mM H₂DCF-DA-Stöcklösung in DMSO hergestellt, welche bei -20°C eingefroren und nur einmal nach dem Auftauen verwendet wurde. Die Akkumulierung von ROS in den Nematoden wurde durch die Applikation von thermalem Stress (37°C) induziert.

Für die Versuche mit wildtypischen *C. elegans* (N2) wurden alterssynchrone L4 oder jung adulte Nematoden in 1,5 ml Inkubationsmedium mit entsprechender Konzentration der Reinsubstanz oder DMSO in 35 mm großen Petrischalen bei 20°C inkubiert. Die Tiere wurden nach 24 h in neues Inkubationsmedium überführt und für weiter 24 h bei 20°C inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschrift, um anhaftende Substanzreste und Bakterien zu entfernen. Hierbei wurden die Nematoden in 1,5 ml PBST-Waschlösung überführt und für 1 h bei 20°C inkubiert. Für die Fluoreszenzmessung wurde eine 384-Well-Platte verwendet, die vorher mit 7 µl M9 pro Well befüllt wurde. Die Tiere wurden einzeln in 1 µl PBST mit der Kolbenhubpipette aufgesaugt und in jeweils ein Well übertragen. Anschließend wurden 2 µl einer 250 µM H₂DCF-DA-Lösung in M9 hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 50 µM zu erhalten. Für die Hintergrundmessung wurden 8 Wells mit 7 µl M9, 1 µl der PBST-Waschlösung und 2 µl 250 µM H₂DCF-DA-Lösung bestückt. Die Platte wurde mit einer schwarzen Folie versiegelt, um eine Verdunstung zu verhindern. Die Fluoreszenz (Extinktion: 485 ± 9 nm; Emission: 535 ± 9 nm) wurde über 12 h im Fluoreszenzspektrometer (Synergy MX, BioTek Instruments, Inc.) gemessen. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt, wobei 8 Nematoden pro Gruppe eingesetzt wurden.

3.2.8 Bestimmung der ROS-Akkumulation in transgenen *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer unter thermalem Stress (Aβ-DCF-Assay)

Für die Bestimmung der ROS-Menge im transgenen Morbus Alzheimer-*C. elegans*-Stamm CL4176 wurde das DCF-Experiment modifiziert, um die gleichen Behandlungsbedingungen wie im Aβ-Toxizitätsassay zu garantieren. Hierbei wurden die Tiere ab dem Ei-Stadium bei 16°C mit dem Naturstoff oder der entsprechenden Kontrolle in Flüssigmedium behandelt und nach 64 h auf 60 mm NGM-Platten überführt und bei 25°C gestellt. 24 h nach der Temperaturerhöhung wurden die Nematoden zweimal in PBST (1,5 ml) gewaschen und anschließend wie die wildtypischen Nematoden in eine 384-Well-Platte überführt, mit H₂DCF-DA versetzt und im Fluoreszenzspektrometer gemessen (Extinktion: 485 ± 9 nm; Emission: 535 ± 9 nm; Synergy MX, BioTek Instruments, Inc.). Aufgrund der geringen Größe der transgenen Nematoden wurden 10 Tiere pro Well im Triplikat eingesetzt. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt, wobei 30 Nematoden pro Gruppe eingesetzt wurden.

3.2.9 Bestimmung der thermalen Stressresistenz in *C. elegans* (SYTOX-Assay)

Die thermale Stressresistenz von *C. elegans* wurde mithilfe der SYTOX-Methode nach Gill *et al.* (2003) und Kampkötter *et al.* (2007b) ermittelt. SYTOX Green ist ein grüner Fluoreszenzfarbstoff, der nach Bindung an Nukleinsäuren eine um 500-fach erhöhte Fluoreszenz aufweist. Der SYTOX-DNA-Komplex besitzt bei Anregung mit Licht mit einer Wellenlänge zwischen 450 und 490 nm ein Emissionsmaximum, das bei 523 nm liegt. Da der Farbstoff nur Zellen mit unterbrochener Membranintegrität passieren kann, wird die SYTOX-Fluoreszenz als Marker für Zellschäden und tote Zellen eingesetzt.

Die Behandlung der Tiere erfolgte analog zur DCF-Methode im Wildtypen: Alterssynchrone L4 oder jung adulte Nematoden wurde in 1,5 ml Inkubationsmedium mit entsprechender Konzentration Naturstoff bzw. DMSO in 35 mm Petrischalen bei 20°C für insgesamt 48 h inkubiert und täglich umgesetzt. Anschließend wurden die Tiere für 1 h in 1,5 ml PBST gewaschen und einzeln in je 1 µl PBST in die Wells einer 384-Wellplatte überführt, wobei 8 Nematoden je Behandlungsgruppe eingesetzt wurden.

Zuvor wurden die Wells mit je 9 μ l PBS befüllt. Für die Hintergrundmessung wurden ebenfalls 8 Wells mit je 9 μ l PBS vorbereitet. Nach dem Überführen der Tiere, wurden 10 μ l der 2 μ M SYTOX Green *Nucleid Acid Stain*-Lösung in jedes Well hinzugegeben. Die Platte wurde mit einer schwarzen Folie versiegelt und die Fluoreszenz (Extinktion: 485 ± 9 nm; Emission: 535 ± 9 nm) für 12 h bei 37°C gemessen (Synergy MX, BioTek Instruments, Inc.). Aus den gemessenen Fluoreszenzwerten wurde eine Fluoreszenzkurve für jeden Nematoden ermittelt. Als Schwellenwert für den Todeszeitpunkt wurde der dreifache Mittelwert aus den ersten vier Fluoreszenzwerten festgelegt. Wenn die Fluoreszenzkurve eines Tieres den individuellen Schwellenwert überschreitet („virtueller Todeszeitpunkt“), wurde diese als tot eingestuft. Zensiert wurden jene Tiere, die beim Pipettieren in die 384-Wellplatte verletzt wurden. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt.

3.2.10 Untersuchung der Lokalisation von GFP-gekoppelten Transkriptionsfaktoren (Fluoreszenzmikroskopie)

Signalmoleküle und zelluläre Prozesse können im transparenten Nematoden mittels der Expression von GFP-Fusionsproteinen erforscht werden. Hierbei ist es möglich eine Aussage über die zelluläre Lokalisation von Proteinen zu treffen. Da Transkriptionsfaktoren in den Zellkern gelangen müssen, um die Transkription von Zielgenen zu regulieren, wurde zur Vereinfachung nur zwischen einer zytosolischen und nukleären Lokalisation von GFP-gekoppelten Transkriptionsfaktoren unterschieden.

3.2.10.1 Untersuchung der DAF-16::GFP-Lokalisation in *C. elegans*

Der transgenen *C. elegans* Stämme TJ356 überexprimiert ein DAF-16 a/b::GFP Fusionsprotein und enthält zusätzlich den Selektionsmarker *rol6*, der ein mutiertes Kollagenen codiert, dessen Expression zum „Roller“ Phänotyp führt (Abb. 15) (Henderson & Johnson 2001).

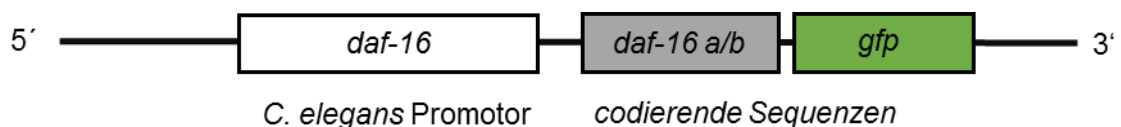


Abbildung 15: Schematische Darstellung des *daf-16a/B::gfp*-Genkonstrukts im transgenen *C. elegans* Stamm TJ356.

daf = Dauergen (*abnormal DAuer Formation*), gfp = grün fluoreszierendes Protein.

Zur Untersuchung des Einflusses von Polyphenolen auf die zelluläre DAF-16-Lokalisation wurden eine Kurzzeit- und eine Langzeitinkubation durchgeführt. Für die Kurzzeitinkubation wurden 40 synchronisierte L4-Larven für 1 h bei 20°C in 1,5 ml Inkubationslösung mit dem Naturstoff bzw. DMSO in entsprechender Konzentration inkubiert. Die Langzeitinkubation erfolgte ab dem Ei-Stadium für 64 h bei 20°C in 0,7 ml Inkubationsmedium in einer 12-Well-Platte. Anschließend wurden 40 Nematoden in 9 μ l Inkubationslösung auf den Objektträger überführt und mit 9 μ l einer 10 mM Levamisollösung sediert. Nach dem Abdecken des Präparates mit einem Deckgläschen und Vaseline wurden die Tiere unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Carl Zeiss AG/ Eclipse Ni, Nikon GmbH) mit passenden GFP-Filter bei 20-facher Vergrößerung innerhalb von 10 min analysiert. Nematoden, bei denen über den gesamten Körper hinweg die GFP-Fluoreszenz in den Zellkernen sichtbar war, wurden als „nukleär“ eingestuft,

wohingegen Tiere mit einer diffusen Fluoreszenz als „zytosolisch“ klassifiziert wurden. Als Positivkontrolle diente ein fünfminütiger Hitzestress bei 37°C oder eine einstündige Behandlung mit dem Flavonoid Negletein, welches zuvor als DAF-16-Aktivator identifiziert wurde. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt.

3.2.10.2 Untersuchung der SKN-1::GFP-Lokalisation in *C. elegans*

Der transgene *C. elegans* Stamm LD001 enthält ein Fusionsprotein aus SKN-1b/c und GFP sowie den Selektionsmarker *rol-6* (Abb. 16) (An & Blackwell 2003).

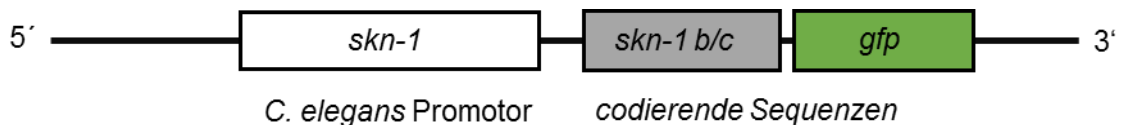


Abbildung 16: Schematische Darstellung des *skn-1b/c::gfp*-Genkonstrukts im transgenen *C. elegans* Stamm LD001.

gfp = grün fluoreszierendes Protein, *skn* = SKiNhead.

Der Einfluss von Polyphenolen auf die zelluläre SKN-1b/c::GFP-Lokalisation wurde mittels Langzeitinkubation ab Ei-Stadium untersucht. Die Versuchsdurchführung gestaltete sich analog zum DAF-16::GFP-Versuch. Nematoden, bei denen die GFP-Fluoreszenz in mehr als drei Darmzellkernen sichtbar war, wurden als „nukleär“ eingeteilt und Tiere, die eine diffuse grüne Fluoreszenz aufwiesen, wurden als „zytosolisch“ eingestuft. Als Positivkontrolle wurde eine einstündige Inkubation 10 mM H₂O₂ verwendet. Jedes Experiment wurde dreimal wiederholt.

3.2.11 Untersuchung der HSP16.2- und MYOSIN-3-Proteinexpression in *C. elegans*

Der Einfluss von ausgewählten Polyphenolen auf die HSP16.2-Proteinexpression in *C. elegans* wurde mittels dem transgenen Stamm CL2070, der ein Fusionsprotein aus HSP-16.2 und GFP exprimiert, untersucht (Abb. 17) (Link *et al.* 1999).

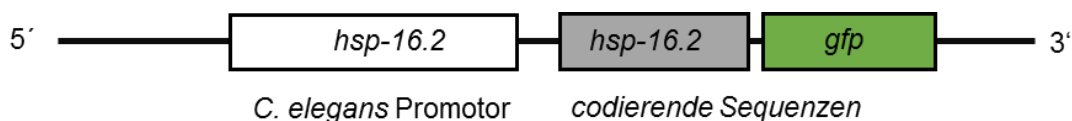


Abbildung 17: Schematische Darstellung des *hsp-16.2::gfp*-Genkonstrukts im transgenen *C. elegans* Stamm CL2070.

gfp = Grün fluoreszierendes Protein, *hsp* = Hitzeschockprotein.

Hierfür wurden die Tiere, analog zum A β -Toxizitätstest, ab dem Ei-Stadium für 64 h bei 20°C in 0,7 ml Inkubationsmedium mit 50 μ M oder 100 μ M des Flavonoids oder entsprechendem Anteil DMSO in einer 12-Well-Platte behandelt. Anschließend wurden 80 Nematoden pro Gruppe in je ein Well einer neuen 12-Well-Platte mit 0,7 ml NGMk und hitzeinaktivierten OP50-1 *E. colis* mit der Pipette übertragen und für 45 min bei 35°C inkubiert (Synergy MX, BioTek Instruments, Inc.). Nach einer 24-stündigen

Regenerationsphase bei 20°C wurden 3 Wells einer 384-Wellplatte mit je 20 Nematoden befüllt und die Fluoreszenz (Extinktion: 488 ± 9 nm und Emission: 511 ± 9 nm) im Plattenlesegerät (Synergy MX, BioTek Instruments, Inc.) gemessen. Zuvor wurde die optimale Dauer des Hitzeschocks bestimmt und die Sensitivität der Messung im Fluoreszenzspektrometer mit der im Fluoreszenzmikroskop (Eclipse Ni, Nikon GmbH) verglichen (Anh. Abb. 62). Hierbei stellte sich heraus, dass die Messung der HSP-16.2-Expression im Fluoreszenzspektrometer durch die Größe der Nematoden beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden Nematoden vom Stamm PD4251, welche ein Konstrukt aus MYOSIN-3 (MYO-3) und GFP exprimieren (Abb. 18), analog zu den CL2070-Tieren behandelt und folglich als Indikator für die Größe der Tiere betrachtet. Auch hier wurde zuvor die manuelle Größenmessung der PD4251-Tiere (Siehe 3.2.12) der GFP-Messung im Fluoreszenzspektrometer (Synergy MX, BioTek Instruments, Inc.) gegenüber gestellt (Anh. Abb. 63). Jeder Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt.

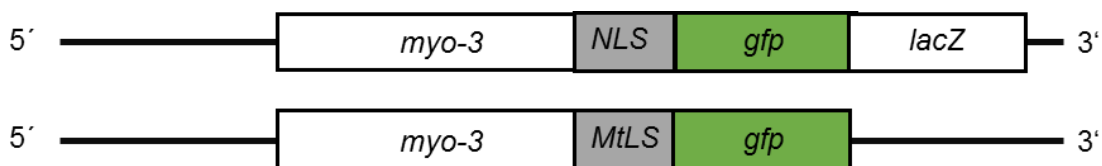


Abbildung 18: Schematische Darstellung des *myo-3p::GFP-LacZ(NLS)* + *myo-3p::mitochondrial gfp*-Genkonstrukts im transgenen *C. elegans* Stamm PD4251.

gfp = grün fluoreszierendes Protein, MtLS = mitochondriale Lokalisierungssequenz, NLS = nukleäre Lokalisierungssequenz.

3.2.12 Größenmessung von *C. elegans*

PD4521 Tiere wurden ab dem Ei-Stadium in 0,7 ml Inkubationsmedium mit 0,1 % DMSO und lebenden oder hitzeinaktivierten OP50-1 *E.colis* inkubiert. Es erfolgte eine tägliche Bestimmung der Fläche der Tiere, wobei 20 Larven in 9 µl Inkubationsmedium auf einen Objektträger übertragen und mit 9 µl einer 10 mM Levamisollösung sediert wurden. Nach dem Abdecken des Präparates mit einem Deckgläschen wurden die Tiere bei fünffacher Vergrößerung fotografiert (Binokular - Stemi 2000, Carl Zeiss GmbH und Motic Images Plus (Version 2.0), Motic Deutschland GmbH). Die Fläche der einzelnen Nematoden wurde anschließend mit Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) vermessen. Die Fläche der Tiere wurde an den ersten vier Lebenstagen bestimmt. Versuche mit lebende OP50 *E.colis* wurden zweimal und mit hitzeinaktivierten *E.colis* einmal durchgeführt.

3.2.13 Lebensspannenanalyse von *C. elegans*

Die Lebensspannenanalyse wurde mit den *C. elegans*-Stämmen N2 und TK22 durchgeführt. Hierfür wurden 50 alterssynchrone L4 Larven bzw. junge adulte Nematoden in 1,5 ml Inkubationsmedium mit dem zu untersuchenden Naturstoff (100 µM) oder der Lösemittelkontrolle DMSO überführt und bei 25°C inkubiert. Der erste Tag der Inkubation entsprach Tag 0 der Lebensspanne. Um eine mögliche Vermischung mit Nachkommen zu verhindern, wurde zusätzlich 0,12 mM FUDR in der reproduktiven Periode (bis zum Tag dreizehn der Behandlung) eingesetzt. FUDR ist ein DNA-Synthese-Inhibitor, der die Entwicklung vom Ei zur Larve inhibiert.

Die Tiere wurden fünfmal pro Woche auf ihr Überleben überprüft und in frisches Inkubationsmedium überführt. Zu diesem Zweck wurde die *touch-provoked movement*-Methode angewandt, bei der die Tiere mit einem Platindraht am Kopf- und Schwanzende berührt werden, um eine Bewegung hervorzurufen. Wenn nach 3 s keine Reaktion erfolgt, wird der entsprechende Nematode in der Körpermitte berührt. Bei ausbleibender Bewegung wird das Tier als „tot“ klassifiziert und aus dem Medium entfernt. Individuen, die herausgestülpte Organe aufwiesen oder verloren gegangen waren, wurden bei der Auswertung zensiert. Lebende Tiere wurden anschließend in frisches Inkubationsmedium überführt. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

3.3 Statistik

Die Statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism 6 und SPSS Statistics. Für den Mittelwertvergleich von zwei Gruppen wurde der *unpaired t-test* und von mehr als zwei Gruppen die *one-way* oder *two-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest angewandt. Überlebensanalyse wurden mittels Kaplan-Meier-Schätzung und *log-rank (Mantel-Cox) test* ermittelt. Werte galten als signifikant unterschiedlich, wenn das Signifikanzwert (p) kleiner gleich 0,05 war: *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$.

4 Ergebnisse

4.1 Pflanzenextrakte

4.1.1 Modulation der A β ₁₋₄₂-Toxizität im transgenen *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer

Zuerst wurde der Einfluss von flavonoidreichen Pflanzenextrakten auf die A β ₁₋₄₂-Toxizität *in vivo* untersucht. Zu diesem Zweck wurde der transgene *C. elegans* Stamm CL4176, der das humane A β ₁₋₄₂-Peptid temperaturabhängig in den Körperwandmuskelzellen exprimiert, analysiert. Die A β ₁₋₄₂-Toxizität äußert sich in diesem Stamm durch die Paralyse des Körpers, wobei der Zeitpunkt des Eintretens der Lähmung für jeden Nematoden erfasst werden kann. Sowohl das HE als auch HOE reduzierten die A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* (Abb. 19): Die Inkubation mit 0,5 und 1 mg/ml HE verlängerte die mittlere Zeitspanne bis zum Eintreten der Paralyse um 0,8 h ($p = 0,002$) und 0,9 h ($p < 0,001$) gegenüber der Kontrolle. Die HOE-Behandlung zeigte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Protektion und verlängerte die mittlere paralysefreie Zeit um 0,7 h (0,125 mg/ml, $p = 0,004$), 1,1 h (0,25 mg/ml, $p < 0,001$) und 1,2 h (0,5 mg/ml, $p < 0,001$) im Vergleich mit der DMSO-Gruppe. Bei der Konzentration von 0,5 mg/ml wies das HOE eine um ca. 30 % potentere Wirkung als das HE gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität in den CL4176-Nematoden auf. Die mittleren und medianen Zeitpunkte des Paralyseeintritts aller Behandlungsgruppen sind in Tabelle 1 ersichtlich.

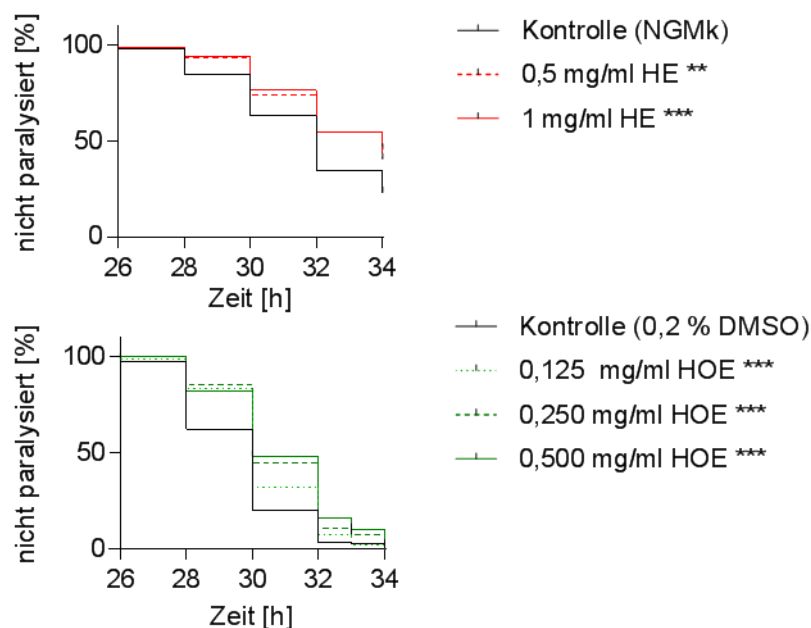


Abbildung 19: Einfluss von Pflanzenextrakten auf die A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans*.

Nematoden vom transgenen Stamm CL4176, die das humane A β ₁₋₄₂-Peptid temperaturabhängig in den Körperwandmuskelzellen exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit dem Extrakt bzw. entsprechender Kontrolle bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 25°C für 24 h. Mittels *touch-provoked movement* wurde das Eintreten der Paralyse festgestellt. Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven, $n = 3$ (40 Individuen/Versuch), ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ (Log-rank (Mantel-Cox) Test) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. Die Daten zu dem Hibiskus-Extrakt wurden von Frau Nora Weldle im Rahmen ihrer Masterarbeit erstellt. HE = Hibiskus-Extrakt, HOE = Hopfen-Extrakt.

Tabelle 1: Einfluss von Pflanzenextrakten auf die Paralyse im transgenen *C. elegans*-Stamm CL4176.

DMSO = Dimethylsulfoxid, HE = Hibiskus-Extrakt, HOE = Hopfenextrakt, SEM = Standardfehler.

Behandlung	mittlere Zeit (h) bis zum Eintreten der Paralyse \pm SEM	mediane Zeit (h) bis zum Eintreten der Paralyse \pm SEM	n	p-Wert (log-Rank)
Kontrolle (NGMk)	31,6 \pm 0,202	32 \pm 0,307	120	
0,5 mg/ml HE	32,4 \pm 0,184	34 \pm 0,633	120	0,002
1 mg/ml HE	32,5 \pm 0,178	34 \pm 0,030	120	<0,001
Kontrolle (0,2 % DMSO)	29,7 \pm 0,154	30 \pm 0,172	120	
0,125 mg/ml HOE	30,4 \pm 0,150	30 \pm 0,179	110	0,004
0,250 mg/ml HOE	30,8 \pm 0,154	30 \pm 0,221	119	<0,001
0,500 mg/ml HOE	30,9 \pm 0,169	30 \pm 0,275	120	<0,001

4.2 Flavonoide

4.2.1 Modulation der $A\beta_{1-42}$ -Toxizität im transgenen *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer

Zur Identifizierung bioaktiver Flavonoide aus den Pflanzenextrakten wurde der Einfluss von Flavonolen und Flavanonen auf die $A\beta_{1-42}$ -Toxizität im transgenen *C. elegans* Stamm CL4176 untersucht. Im Vordergrund stand dabei eine Strukturwirkungsbeziehung der Substanzen. Zur Untersuchung der Flavonole wurden Quercetin als Leitsubstanz und die strukturverwandten Verbindungen Fisetin, Galangin, Morin, und Myricetin ausgewählt. Für Quercetin wurde zuvor eine konzentrationsabhängige Untersuchung durchgeführt, wobei sich bei 50 μ M die stärkste Protektion gegenüber der $A\beta_{1-42}$ -Toxizität in *C. elegans* einstellte (Anh. Abb. 57). Aus diesem Grund wurden alle strukturverwandten Verbindungen in derselben Konzentration eingesetzt. Von den untersuchten Flavonolen zeigten, bis auf Fisetin, alle Substanzen eine protektive Wirkung gegenüber der $A\beta_{1-42}$ -Toxizität in *C. elegans* (Abb. 20A). Eine Behandlung mit Quercetin oder Galangin verlängerte die mittlere Zeitspanne bis zum Eintreten der Paralyse der Nematoden statistisch signifikant um 0,9 h ($p < 0,001$) bzw. 0,7 h ($p = 0,026$) im Vergleich zur DMSO-Behandlung. Die Myricetin-Gruppe (50 μ M) zeigte eine vergleichbare Verschiebung der mittleren paralysefreien Zeit wie die Galangin-Gruppe (0,7 h, $p = 0,014$) gegenüber den DMSO-behandelten Tieren. Die stärkste Protektion wurde durch eine Inkubation mit Morin erreicht, wobei die mittlere Zeitspanne bis zum Eintreten der Paralyse von *C. elegans* um 0,9 h ($p = 0,001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe verlängert wurde.

Zur Untersuchung der Flavanone wurde Naringenin als Leitsubstanz gewählt und die strukturverwandte Verbindung LQ. Die Behandlung mit 100 μ M Naringenin zeigte keinen Einfluss auf das Eintreten der $A\beta_{1-42}$ -induzierten Paralyse in *C. elegans*, wohingegen eine Inkubation mit 100 μ M LQ die mittlere paralysefreie Zeit um 0,6 h ($p = 0,032$) verlängerte (Abb. 20B). Eine Inkubation mit 50 μ M LQ zeigte keine statistisch signifikante Wirkung auf das Paralyseverhalten der Nematoden (Anh. Abb. 64). Die mittleren und medianen Zeiten bis zum Paralyseeintritt aller Behandlungsgruppen sind in Tabelle 2 dargestellt.

A. CL4176

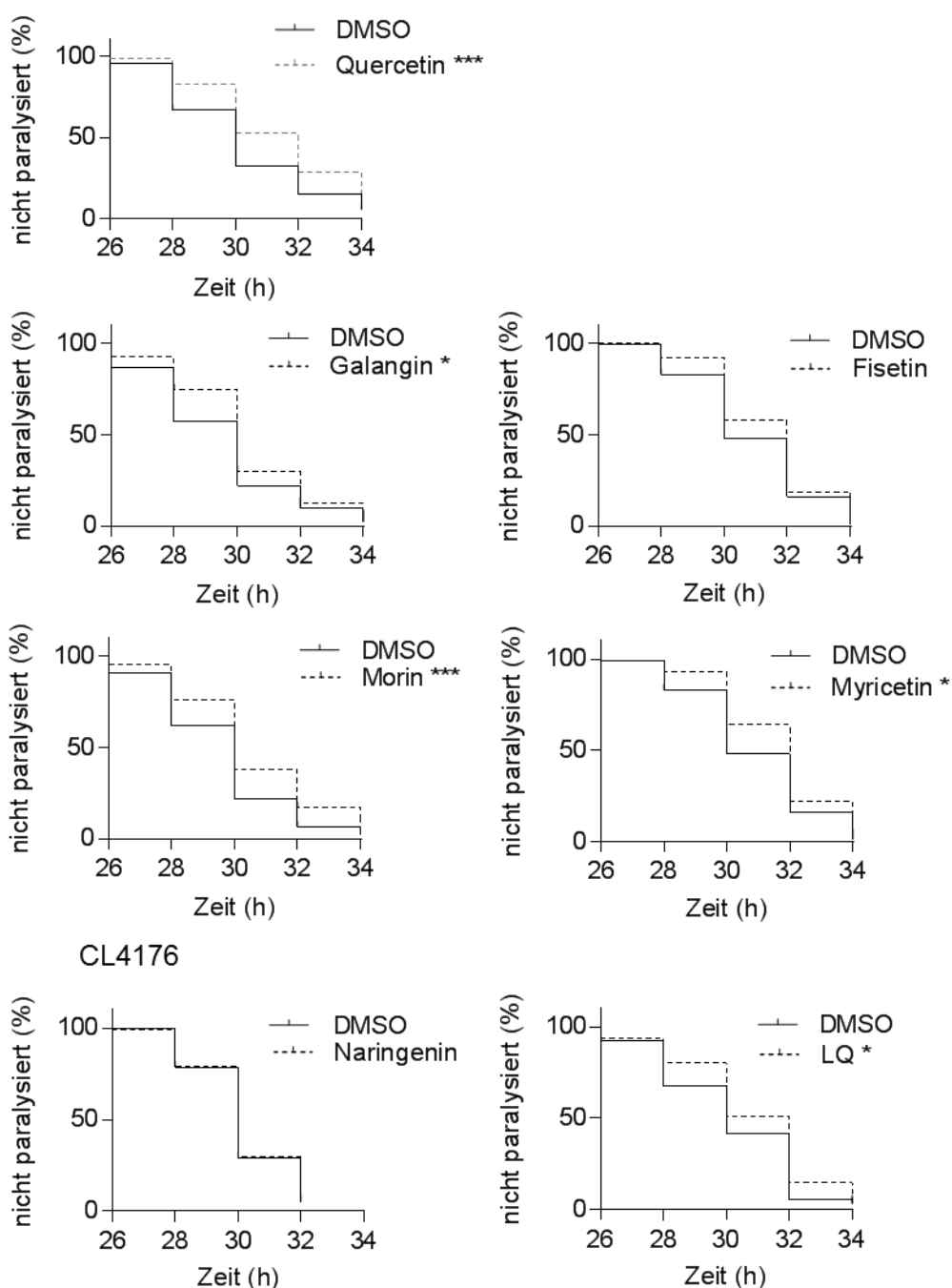


Abbildung 20: Einfluss von Flavonoiden auf die A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans*.

A. 50 µM Flavonole,

B. 100 µM Flavanone.

Nematoden vom transgenen Stamm CL4176, die das humane A β ₁₋₄₂-Peptid temperaturabhängig in den Körperwandmuskelzellen exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit dem Flavonoid bzw. 0,1 % DMSO bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 25°C für 24 h, wobei die Tiere zeitversetzt auf NGM-Platten überführt wurden. Mittels *touch-provoked movement* wurde das Eintreten der Paralyse festgestellt. Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven, n = 3 (40 Individuen/Versuch), *p ≤ 0,05, ***p ≤ 0,001 (Log-rank (Mantel-Cox) Test) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. Die Naringenin-Daten wurden von Herrn Gabriel Schulz im Rahmen seiner Masterarbeit erstellt. DMSO = Dimethylsulfoxid, LQ = Liquiritigenin.

Tabelle 2: Einfluss von Flavonoiden auf die Paralyse im transgenen *C. elegans*-Stamm CL4176.
 DMSO = Dimethylsulfoxid, LQ = Liquiritigenin, SEM = Standardfehler.

Behandlung	mittlere Zeit (h) bis zum Eintreten der Paralyse \pm SEM	mediane Zeit (h) bis zum Eintreten der Paralyse \pm SEM	n	p-Wert (log-Rank)
Flavonole				
0,1 % DMSO	30,2 \pm 0,107	30 \pm 0,125	400	
50 μ M Quercetin	31,0 \pm 0,108	30 \pm 0,165	401	<0,001
0,1 % DMSO	29,5 \pm 0,218	30 \pm 0,227	113	
50 μ M Galangin	30,2 \pm 0,198	30 \pm 0,190	121	0,026
0,1 % DMSO	30,9 \pm 0,176	30 \pm 0,270	124	
50 μ M Fisetin	31,4 \pm 0,158	32 \pm 0,183	120	0,062
0,1 % DMSO	29,6 \pm 0,188	30 \pm 0,188	119	
50 μ M Morin	30,5 \pm 0,197	30 \pm 0,227	126	0,001
0,1 % DMSO	30,9 \pm 0,176	30 \pm 0,270	124	
50 μ M Myricetin	31,6 \pm 0,162	32 \pm 0,180	122	0,014
Flavanone				
0,1 % DMSO	30,2 \pm 0,131	30 \pm 0,169	117	
100 μ M Naringenin	30,2 \pm 0,135	30 \pm 0,174	119	0,953
0,1 % DMSO	30,2 \pm 0,184	30 \pm 0,339	121	
100 μ M LQ	30,8 \pm 0,198	32 \pm 0,196	122	0,032

4.2.2 Modulation der Aggregation von A β -Plaques im transgenen *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer

Die Alzheimer-Erkrankung ist im Menschen durch die Ablagerung von aggregierten A β -Fibrillen als unlösliche Plaques im Gehirn charakterisiert. Bei spezifischen transgenen *C. elegans*-Stämmen aggregieren die A β -Peptide ebenfalls in Fibrillen, die sich im Interzellularraum ablagern und mittels ThS nachweisen lassen (Abb. 21C).

Folglich wurde der Einfluss von Flavonoiden auf die Akkumulation von ThS-positiven A β -Plaques im transgenen *C. elegans* Stamm CL2006 untersucht. Behandlungen mit den einzelnen Flavonolen (50 μ M) hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die mittlere Anzahl der A β -Plaques im Nematoden. Tiere, die mit Quercetin oder Fisetin inkubiert wurden, wiesen jedoch geringere Werte auf, wobei die mittlere A β -Plaque-Anzahl um ca. 28 bzw. 17 % reduziert wurde im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 21A). Bei der Klassifizierung der Nematoden nach der Anzahl der Plaques wurden ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe festgestellt (Abb. 21B). Jedoch enthielt die Quercetin-Gruppe keine Individuen, die der Klasse mit dem meisten Plaques (D > 45 Plaques) zugeordnet wurden, wohingegen von den DMSO-behandelten Nematoden ca. 8 % der Tiere zu dieser Klasse zählten. Der Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander zeigte, dass der Anteil der Nematoden in Klasse C (30-45 Plaques) der Galangin-Gruppe statistisch signifikant (p = 0,030) höher lag als bei der Myricetin-Gruppe, was auf eine Reduktion der Anzahl der Tiere in den Klassen A und B zurückzuführen war (Abb. 21B).

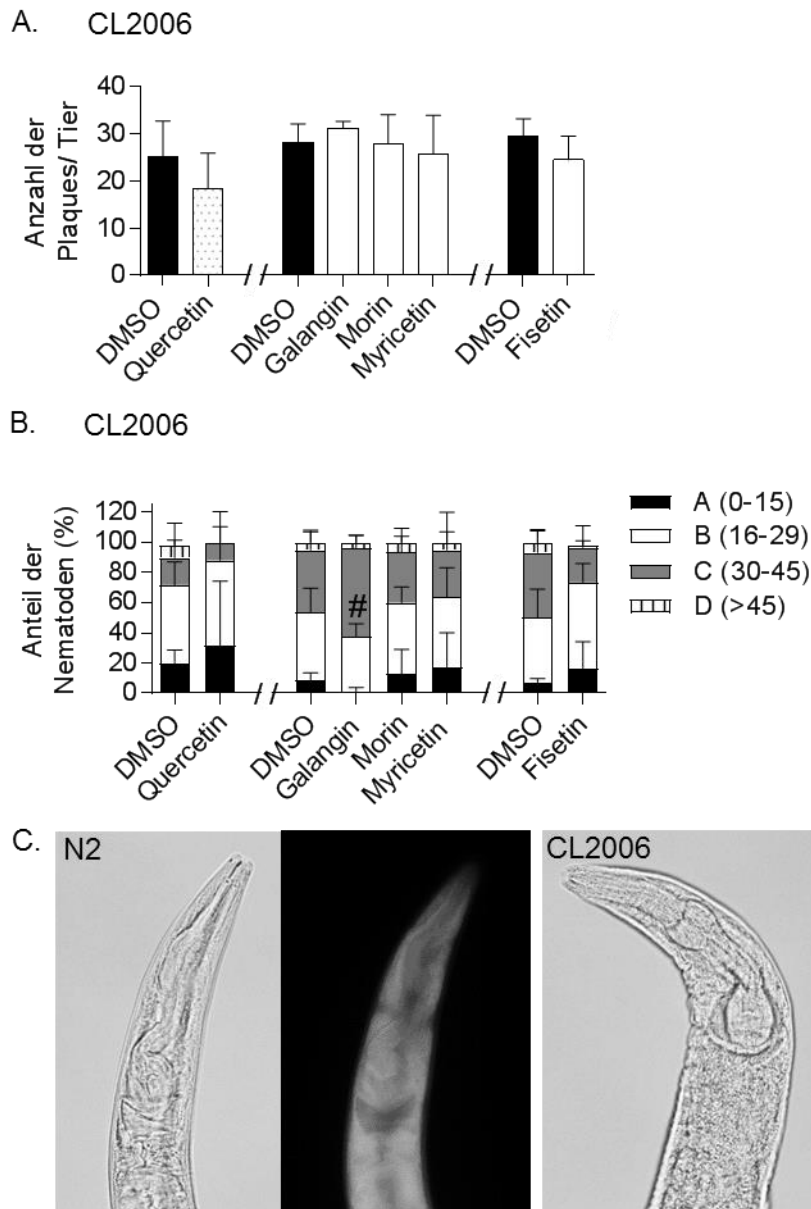


Abbildung 21: Einfluss von Flavonolen auf die Akkumulation von ThS-positiven A β -Plaques in *C. elegans*.

Nematoden vom transgenen Stamm CL2006, die das humane A β ₁₋₄₂-Peptid konstitutiv in den Körperwandmuskelzellen exprimieren, wurden ab dem L4-Stadium für 48 h mit 50 μ M des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO bei 20°C inkubiert. Anschließend wurden die Tiere fixiert, permeabilisiert und mit ThS gefärbt.

A. Anzahl der Plaques/Tier, angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest).

B. Klassifizierung nach Anzahl der Plaques, angegeben sind Mittelwerte des prozentualen Anteils der Nematoden pro Klasse und Behandlungsgruppe \pm Standardabweichung, #*p* \leq 0,05 (*two-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur Myricetin-Gruppe.

n = 4 bis auf Fisetin und Quercetin n = 3 (20 Individuen/Versuch und Gruppe),

C. Repräsentative Abbildung von CL2006 Nematoden mit ThS-positiven Plaques (rechts) und wildtypischen (N2) Tieren ohne Plaques (links).

DMSO = Dimethylsulfoxid.

Die Untersuchung der zwei ausgewählten Flavanone zeigte, dass die Behandlungsgruppen eine vergleichbare mittlere Anzahl der Plaques pro Nematoden wie die DMSO-Gruppe aufwiesen (Abb. 22A). Die Klassifizierung der Tiere nach der Anzahl der Plaques ergab ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe (Abb. 22B).

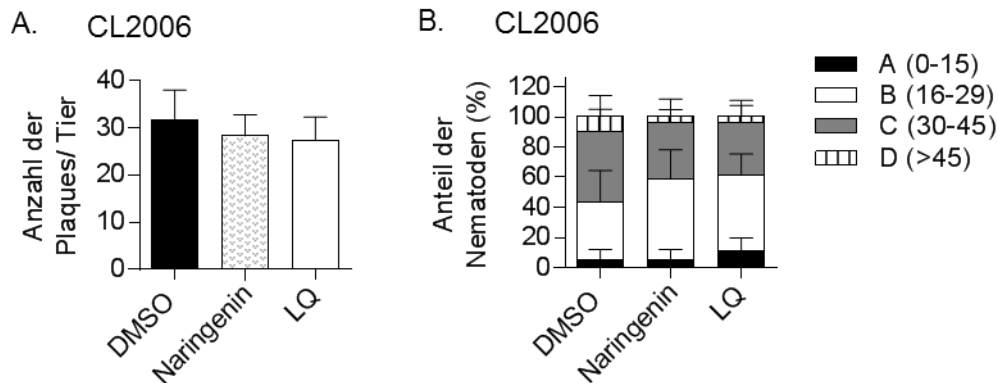


Abbildung 22: Einfluss von Flavanonen auf die Akkumulation von ThS-positiven A β -Plaques in *C. elegans*.

Nematoden vom transgenen Stamm CL2006, die das humane A β ₁₋₄₂-Peptid konstitutiv in den Körperwandmuskelzellen exprimieren, wurden ab dem L4-Stadium für 48 h mit 100 μ M des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO bei 20°C inkubiert. Anschließend wurden die Tiere fixiert, permeabilisiert und mit ThS gefärbt.

A. Anzahl der Plaques/ Tier, angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest)

B. Klassifizierung nach Anzahl der Plaques, angegeben sind Mittelwerte des prozentualen Anteils der Nematoden pro Klasse und Behandlungsgruppe \pm Standardabweichung, (*two-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest).

n = 4 (20 Individuen/Versuch und Gruppe)

DMSO = Dimethylsulfoxid, LQ = Liquiritigenin.

4.2.3 Bestimmung der radikalfangenden Kapazität *in vitro* (TEAC-Assay)

Die antioxidativen Eigenschaften von Flavonolen wurden mittels einer ABTS-Radikallösung, die sich nach Zugabe von Antioxidantien entfärbt, überprüft. Als Referenzsubstanz diente hierbei das synthetische Vitamin E-Derivat Trolox.

Alle Substanzen zeigten bereits ab einer Konzentration von 10 μ M radikalfangende Eigenschaften, da sie die ABTS-Absorption im Vergleich zur DMSO-Kontrolle statistisch signifikant ($p \leq 0,001$) reduzierten (Abb. 23A). Morin und Galangin reduzierten die ABTS-Absorption gleichermaßen um ca. 48 % im Vergleich zu DMSO und lagen damit im antioxidativen Bereich der Referenzsubstanz Trolox (10 μ M) (Abb. 23B). Fisetin unterschied sich ab 10 μ M statistisch signifikant ($p \leq 0,001$) von Galangin und reduzierte die ABTS-Absorption um ca. 56 % im Vergleich zur Kontrolle. Quercetin und Myricetin waren in diesem Vergleich die potentesten Radikalfänger und verringerten die ABTS-Absorption ab einer Konzentration von 10 μ M fast vollständig (Abb. 23B).

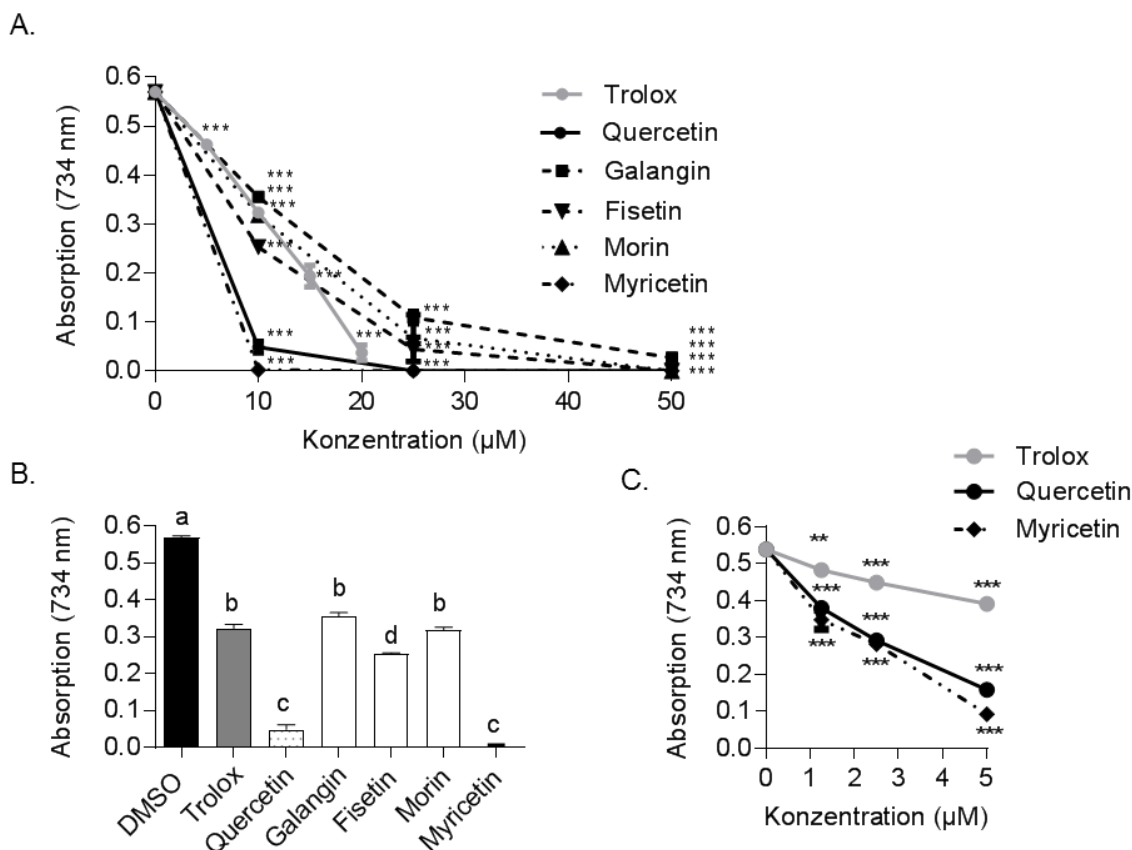


Abbildung 23: Antioxidative Kapazität von Flavonolen *in vitro* in einem zellfreien System.

Photometrische Bestimmung der Absorption des blau-grün gefärbten ABTS-Radikals nach sechsminütiger Inkubation mit dem jeweiligen Flavonol in entsprechend angegebener Konzentration. Die Abnahme der Absorption korreliert mit der antioxidativen Kapazität des Flavonoids. Für die Standardreihe wurde das synthetische Vitamin E-Derivat TROLOX verwendet.

A. Konzentrationen: 10-50 µM,

B. Konzentration: 10 µM,

C. Konzentrationen: 1,25 -5 µM.

Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, $^{a,b,c,d} p \leq 0,0\%$ Gruppen mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest). DMSO = Dimethylsulfoxid.

Ein separater Vergleich der zwei Substanzen zeigte, dass beide Flavonole bereits ab einer Konzentration von 1,25 µM die ABTS-Radikale statistisch signifikant abfingen ($p \leq 0,001$) und potenter als die Referenzsubstanz Trolox ($p \leq 0,001$) waren (Abb. 23C). Da sich die ABTS-Absorption von Myricetin bei 5 µM von der von Quercetin statistisch signifikant ($p \leq 0,001$) unterschied, scheint Myricetin eine etwas höhere antioxidative Kapazität aufzuweisen. Das antioxidative Potential der untersuchten Flavonole in der TEAC-Methode lässt sich wie folgt zusammenfassen: Galangin = Morin < Fisetin < Quercetin < Myricetin.

Die ausgewählten Flavanone Naringenin und LQ zeigten selbst in einer Konzentration von 100 µM keine statistisch signifikanten Unterschiede in der ABTS-Absorption gegenüber der DMSO-Kontrolle (Abb. 24).

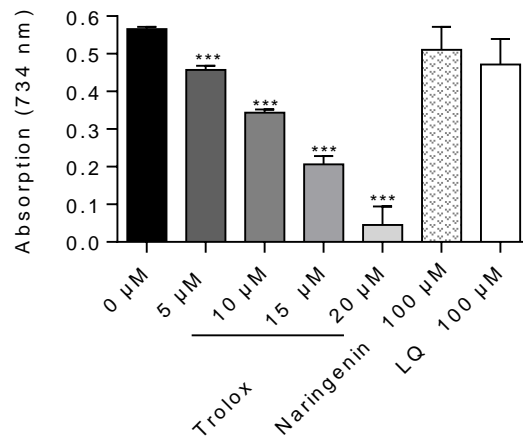


Abbildung 24: Antioxidative Kapazität von Flavanonen *in vitro* in einem zellfreien System.

Photometrische Bestimmung der Absorption des blau-grün gefärbten ABTS-Radikals nach sechsminütiger Inkubation mit 100 µM Substanz. Die Abnahme der Absorption korreliert mit der antioxidativen Kapazität des Flavonoids. Für die Standardreihe wurde das synthetische Vitamin E-Derivat TROLOX verwendet.

Angegeben ist der Mittelwert ± Standardabweichung, $n = 3$, $***p \leq 0,001$ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest). DMSO = Dimethylsulfoxid, LQ = Liquiritigenin.

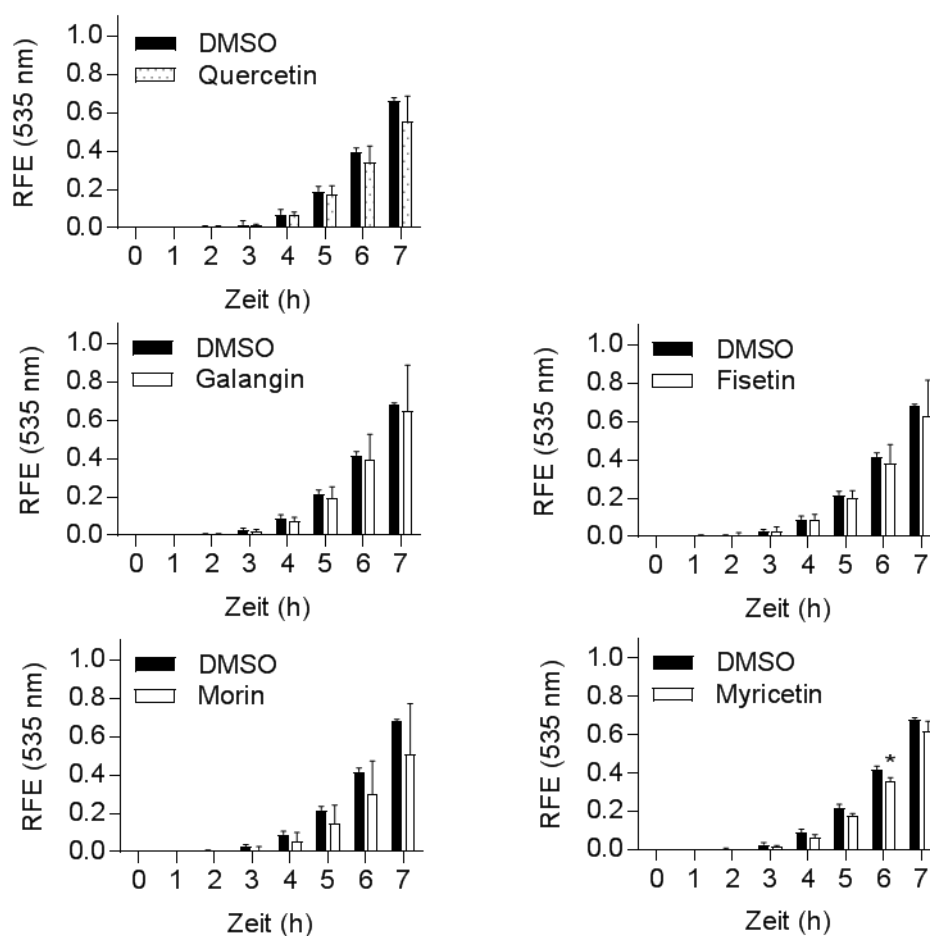
4.2.4 Modulation der ROS-Akkumulation im transgenen *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer unter thermalem Stress

Der ROS-Status im transgenen *C. elegans*-Stamm CL4176 wurde mittels des Fluoreszenzmarkers H_2DCF -DA gemessen. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Wirkung der Flavonoide auf die $A\beta_{1-42}$ -induzierte Paralyse mit einer Veränderung im ROS-Spiegel der Nematoden assoziiert war. Um die ROS-Akkumulation in den Nematoden zu induzieren wurde die Tiere thermalem Stress ($37^\circ C$) ausgesetzt.

Aus Abb. 25 wird ersichtlich, dass die DCF-Fluoreszenz der Nematoden bei anhaltendem Hitzestress zunimmt: in den Kontrolltieren stieg der Mittelwert der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) nach 7 h Hitzestress auf das ca. 700-fache des basalen Wertes (0 h) an. Bei der Untersuchung der ROS-Akkumulation im $A\beta_{1-42}$ -exprimierenden Stamm CL4176 wurde im Vergleich zu dem Kontrollstamm CL802 kein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet, obwohl die CL802-Tiere um ca. 40 % niedrigere RFE aufwiesen als die CL4176-Tiere nach 7 h thermalem Stress (Anh. Abb. 60).

Die Gegenüberstellung der unterschiedlichen Flavonole zeigte, dass nur die Behandlung mit Myricetin (50 µM) eine statistisch signifikante ($p = 0,038$) Veränderung in der mittleren ROS-Akkumulation der CL4176-Nematoden im Vergleich zur DMSO-Gruppe bewirkte (Abb. 25A). Die Myricetin-Gruppe wies dabei nach 6 h Hitzestress ca. 15 % niedrigere mittlere RFE auf als die Kontrolle. Tiere, die mit Quercetin, Galangin, Fisetin oder Morin (50 µM) behandelt wurden, zeigten im Mittel ebenfalls geringere relative DCF-Werte als die Kontrollgruppe, jedoch erwiesen sich diese Unterschiede nach statistischer Auswertung als nicht signifikant (Abb. 25A). Die Inkubation der CL4176-Nematoden mit den Flavanone (100 µM) bewirkte keine statistisch signifikante Veränderung der mittleren ROS-Akkumulation im Vergleich zur DMSO-Gruppe. Jedoch war bei der Naringenin-Behandlung ab 3 h thermalem Stress ein prooxidativer Trend ersichtlich und bei dem letzten Messwert (7 h) entsprach der Mittelwert der RFE der Naringenin-Tiere dem fast dem 2-fachen Wert der Kontrolltiere. Im Gegensatz dazu entsprachen die ROS-Konzentrationen der LQ-Gruppe im Mittel denen der Kontrollgruppe (Abb. 25B).

A. CL4176



B. CL4176

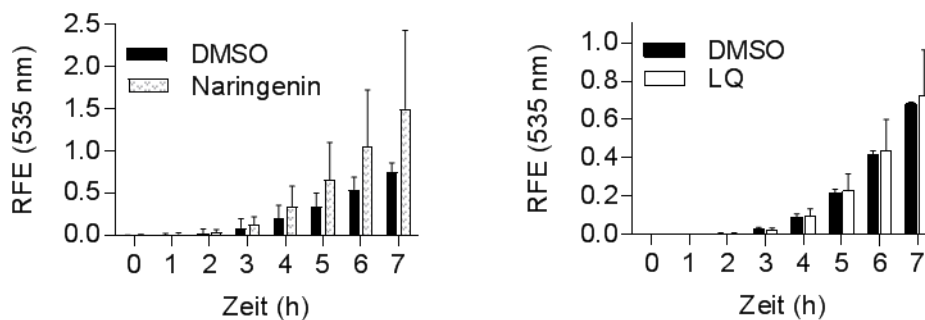


Abbildung 25: Einfluss von Flavonoiden auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im transgenen $A\beta_{1-42}$ -exprimierenden *C. elegans*-Stamm unter thermalem Stress.

A. 50 μ M Flavonole,

B. 100 μ M Flavanone.

Nematoden vom Stamm CL4176 wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit dem Flavonoid bzw. 0,1 % DMSO bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 25°C für 24 h. Nach zwei Waschschritten mit PBST wurden die Tiere in eine 384-Wellplatte pipettiert und mit 50 μ M H_2DCF -DA versetzt. Die Fluoreszenz der Tiere wurde bei 37°C für 12 h im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 485 nm, Em.: 535 nm). Angegeben sind relative Mittelwerte \pm Standardabweichung bezogen auf den 8 h-Wert der Kontrolltiere, $n = 3$ (30 Individuen/Versuch, bis auf Naringenin: 8 Individuen/Versuch), $p \leq 0,05$ (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Naringenin-Daten wurden von Herrn Gabriel Schulz im Rahmen seiner Masterarbeit erstellt. DMSO = Dimethylsulfoxid, LQ = Liquiritigenin, RFE = relative Fluoreszenzeinheiten.

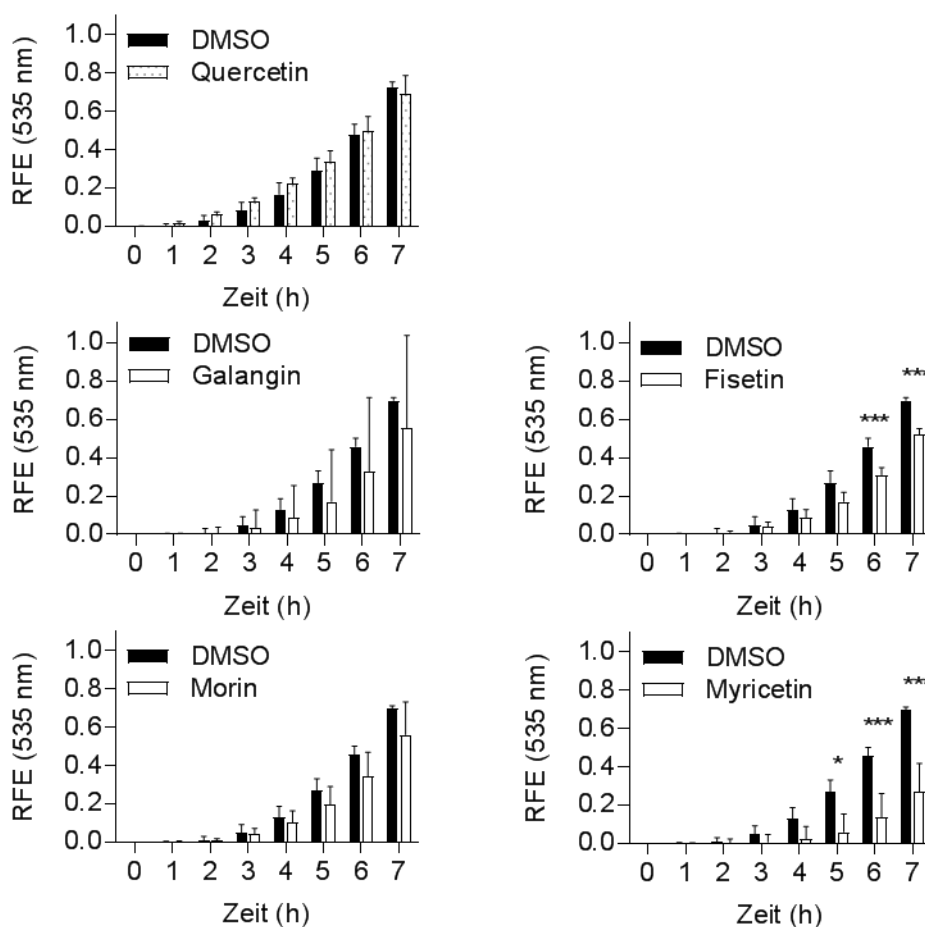
4.2.5 Modulation der ROS-Akkumulation im Wildtypen unter thermalem Stress

Der Einfluss von Flavonoiden auf die ROS-Akkumulation unter thermalem Stress wurde ebenfalls in adulten wildtypischen (N2) *C. elegans* untersucht. Die Messung des ROS-Status erfolgte analog zu 4.2.3 mithilfe des Fluoreszenzmarkers H₂DCF-DA, wobei die ROS-Produktion in *C. elegans* durch thermalen Stress (37°C) induziert wurde.

Die Ergebnisse zu den Untersuchungen der Flavonolen sind in Abb. 26A ersichtlich. Eine Inkubation mit Quercetin, Galangin oder Morin veränderte die mittlere ROS-Konzentration in den Nematoden im Vergleich zur DMSO-Gruppe nicht. Hingegen führte eine Fisetin-Inkubation zu einer statistisch signifikanten ($p = 0,001$) Reduktion der mittleren ROS-Spiegel in *C. elegans* nach 6 h thermalem Stress. Die mittleren Fluoreszenzwerte der Fisetin-Gruppe entsprachen dabei ca. dem 0,7-fachem der Kontrollgruppe. Eine Behandlung mit Myricetin zeigte noch stärkere Wirkung als die Fisetin-Inkubation: Die Myricetin-Gruppe unterschied sich in der mittleren ROS-Akkumulation bereits nach 5 h thermalem Stress statistisch signifikant von der DMSO-Gruppe und reduzierte die mittleren RFE um ca. 70 % nach 5 h ($p = 0,035$) und 6 h ($p \leq 0,001$) und um ca. 60 % nach 7 h ($p \leq 0,001$).

Die Flavanonen-Behandlungen (100 µM) hatten hingegen keine statistisch signifikant Einfluss auf die mittlere ROS-Akkumulation in den Nematoden gegenüber der DMSO-Behandlung (Abb. 26B). Wie in den Morbus Alzheimer-Tieren führte die Naringenin-Inkubation auch im Wildtypen zu einem nicht-signifikanten Anstieg der mittleren ROS-Akkumulation.

A. Wildtyp (N2)



B. Wildtyp (N2)

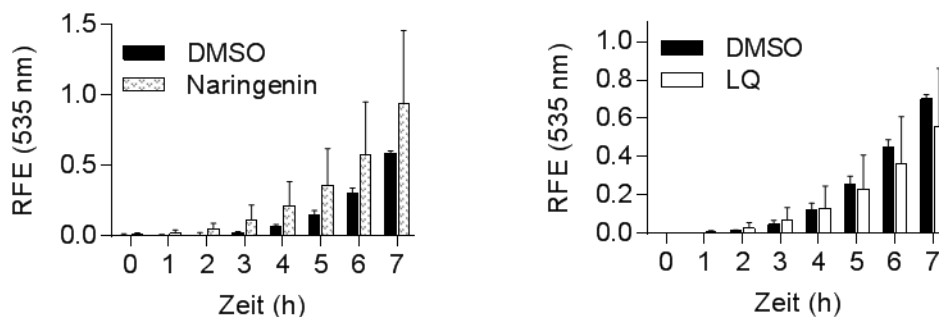


Abbildung 26: Einfluss von Flavonoiden auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im wildtypischen *C. elegans*-Stamm unter thermalem Stress.

- A. 100 μ M Flavonole,
- B. 100 μ M Flavanonen.

Nematoden vom Stamm N2 wurden ab dem L4-Stadium für 48 h mit dem Flavonoid bzw. max. 0,2 % DMSO bei 20°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBST wurden die Tiere in eine 384-Wellplatte pipettiert und mit 50 μ M H₂DCF-DA versetzt. Die Fluoreszenz der Tiere wurde bei 37°C für 12 h im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 485 nm, Em.: 535 nm). Angegeben sind relative Mittelwerte \pm Standardabweichung bezogen auf den 8 h-Wert der Kontrolltiere, n = 3 (8 Individuen/Versuch), *p \leq 0,05, ***p \leq 0,001 (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Naringenin-Daten wurden von Herrn Gabriel Schulz im Rahmen seiner Masterarbeit erstellt. DMSO = Dimethylsulfoxid, LQ = Liquiritigenin, RFE = relative Fluoreszenzeinheiten.

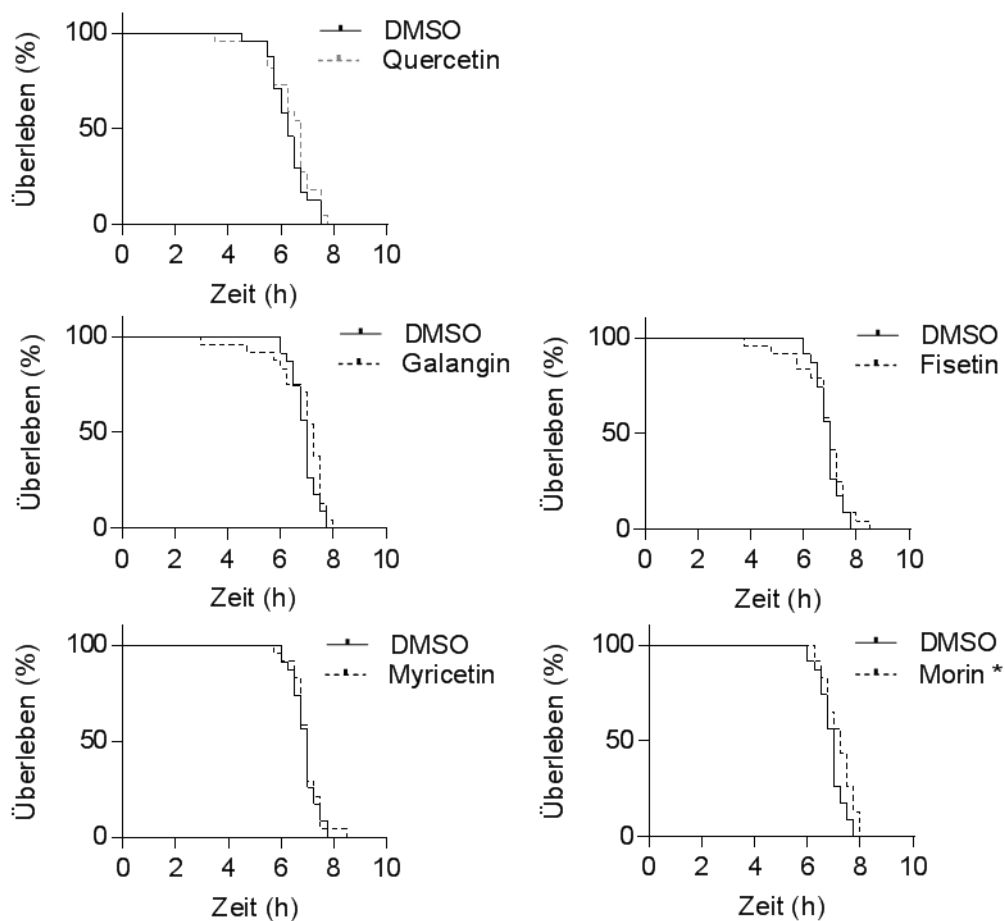
4.2.6 Modulation der thermalen Stressresistenz im Wildtypen

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die Protektion von Flavonoiden gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität mit einer Erhöhung der Stressresistenz in *C. elegans* korreliert. Hierfür wurde die thermale Stresstoleranz von adulten wildtypischen (N2) Nematoden, die mit dem jeweiligen Flavonoid in der Standardkonzentration von 100 μ M behandelt wurden, analysiert. Die Todeszeitpunkte wurden mittels der DNA-interkalierenden Sonde SYTOX Green indirekt gemessen.

Von den untersuchten Flavonolen zeigte nur die Behandlung mit Morin eine statistisch signifikante ($p = 0,04$) Verschiebung der Überlebenskurve von *C. elegans*, wobei der mittlere Überlebenszeit durch die Behandlung um 4,3 % gegenüber der Kontrollgruppe verlängert wurde (Abb. 27A).

Die Untersuchung der Flavanone ergab im Falle einer Naringenin-Behandlung eine statistisch signifikante ($p = 0,016$) Linksverschiebung der Überlebenskurve von *C. elegans* unter thermalem Stress im Vergleich zur DMSO-Gruppe (Abb. 27B). Die Naringenin-Tiere wiesen dabei eine um 5,7 % kürzere mittlere Lebensspanne als die Kontrolltiere auf. Im Gegensatz dazu hatte die LQ-Behandlung keinen Einfluss auf die Thermotoleranz in *C. elegans* (Abb. 27B).

A. Wildtyp (N2)



B. Wildtyp (N2)

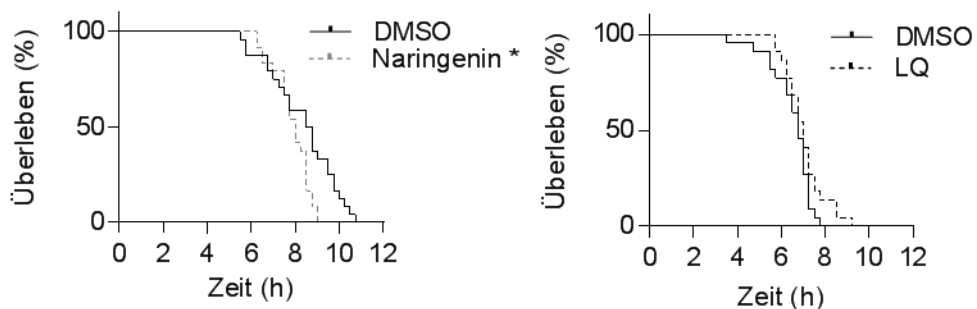


Abbildung 27: Einfluss von Flavonoiden auf das Überleben von wildtypischen *C. elegans* unter thermalem Stress.

- A. Flavonole,
B. Flavanone.

Nematoden vom Stamm N2 wurden ab dem L4-Stadium für 48 h mit 100 μ M des Flavonoids bzw. max. 0,2 % DMSO bei 20°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBST wurden die Tiere einzeln in je eine Kavität mit 9 μ l PBS einer 384-Wellplatte pipettiert. Anschließend wurde die SYTOX Green-Lösung in einer Endkonzentration von 1 μ M hinzugegeben, die Platte versiegelt und die Fluoreszenz bei 37°C für 12 h im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 485 nm, Em.: 535 nm). Aus den individuellen Fluoreszenzkurven wurden durch Festlegen von Schwellenwerten virtuelle Todeszeitpunkte berechnet. Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven, n = 3 (8 Individuen/Versuch), *p \leq 0,05 (Log-rank (Mantel-Cox) Test) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. Die Naringenin-Daten wurden von Herrn Gabriel Schulz im Rahmen seiner Masterarbeit erstellt. DMSO = Dimethylsulfoxid, LQ = Liquiritigenin.

4.2.7 Modulation der zellulären Lokalisation von GFP-gekoppelten Transkriptionsfaktoren

Um den molekularen Wirkmechanismus der Flavonoide gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* zu untersuchen, wurden transgene Stämme, die ein Fusionsprotein aus GFP und den jeweiligen Transkriptionsfaktor exprimieren, verwendet.

4.2.7.1 Modulation der zellulären DAF-16-Lokalisation (Kurzzeitinkubation)

Zur Untersuchung des Einflusses von Flavonoiden auf die Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 wurden Nematoden des transgenen Stammes TJ356 für eine Stunde mit dem jeweiligen Flavonoid inkubiert. Bei der anschließenden Auswertung wurden die Tiere unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und in die Klassen „nukleär“ und „zytosolisch“ eingeteilt (Abb. 28).

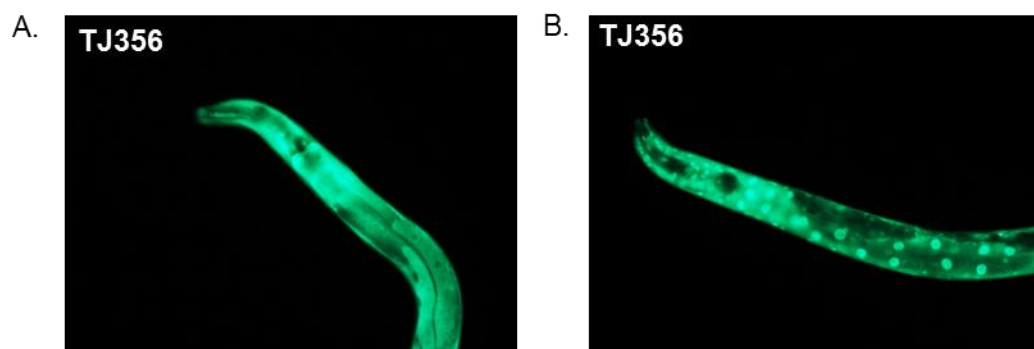
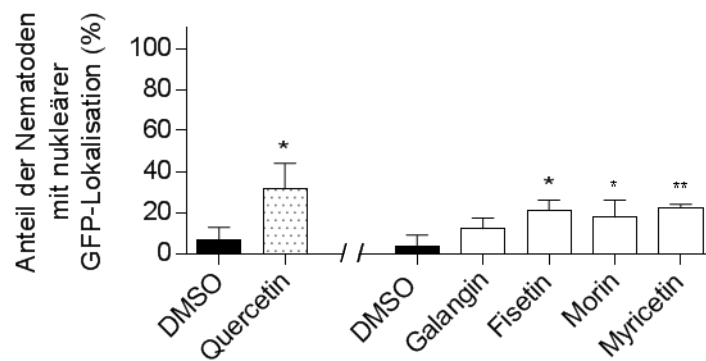


Abbildung 28: Beispielhafte Darstellung zytosolischer und nukleärer DAF-16::GFP-Lokalisation im transgenen *C. elegans*-Stamm TJ356.

- A. Nematoden mit zytosolischer DAF-16::GFP-Lokalisation unter basalen Bedingung bei 20°C.
- B. Nematoden mit nukleärer DAF-16::GFP-Lokalisation nach einem fünfminütigen Hitzestress (37°C).

Aus Voruntersuchungen ist bereits bekannt, dass das flavonolreiche HE die nukleäre DAF-16-Akkumulation in *C. elegans* gegenüber der Kontrolle erhöhte (Anh. Abb. 65A). Die Kurzzeitinkubation mit den unterschiedlichen Flavonolen führte ebenfalls zu einer statistisch signifikanten ($p \leq 0,05$) Steigerung der Translokation von DAF-16::GFP in die Zellkerne der Tiere (Abb. 29A). Hierbei zeigten die Substanzen eine vergleichbare Wirkung: Quercetin, Morin, Fisetin und Myricetin erhöhten den Anteil der „nukleär“ eingeteilten Tiere um den 4,8 ($p = 0,036$), 5,3 ($p = 0,042$), 6,3 ($p = 0,013$) und 6,7 ($p = 0,009$)-fachen Wert der Kontrolltiere. Die Galangin-Behandlung führte zwar ebenfalls zu einer Erhöhung der DAF-16::GFP-Translokation in die Zellkerne (3,7-facher Wert der Kontrolltiere), jedoch war dieser Effekt nicht statistisch signifikant (Abb. 29A). Die Behandlung mit den Flavanonen beeinflusste die zelluläre DAF-16::GFP-Lokalisation in den TJ356-Tieren nicht (Abb. 29B).

A. TJ356 (DAF-16::GFP)



B. TJ356 (DAF-16::GFP)

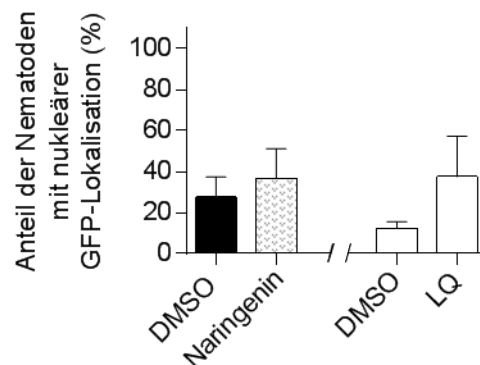


Abbildung 29: Einfluss von Flavonoiden auf die zelluläre DAF-16-Lokalisation in *C. elegans* (Kurzzeitinkubation).

Nematoden vom transgenen Stamm TJ356, die ein Fusionsprotein aus DAF-16 und GFP überexprimieren, wurden ab dem L4-Stadium für 1 h mit dem Flavonoid bzw. 0,1 % DMSO bei 20°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine fluorezenzmikroskopische Auswertung der Tiere.

A. 100 µM Flavonole, außer Quercetin: 50 µM,

B. 100 µM Flavanone.

Angegeben sind die Mittelwerte der Fraktion mit nukleärer GFP-Lokalisation \pm Standardabweichung, $n = 3-4$ (30 Individuen/Versuch), $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. Die Naringenin-Daten wurden von Herrn Gabriel Schulz im Rahmen seiner Masterarbeit erstellt. DMSO = Dimethylsulfoxid, GFP = grün fluoreszierendes Protein, LQ = Liquiritigenin.

4.2.7.2 Modulation der zellulären DAF-16- und SKN-1-Lokalisation (Langzeitinkubation)

Um den zellulären Prozess der nukleären DAF-16-Translokation besser zu untersuchen, wurden die TJ356-Tiere anschließend für einen längeren Zeitraum, analog zu dem $A\beta_{1-42}$ -Toxizitätsversuch (4.2.1), behandelt. Hierbei wurden nur jene Substanzen untersucht, die die $A\beta_{1-42}$ -induzierte Paralyse im *C. elegans*-Stamm CL4176 verzögerten. Zusätzlich wurde der Einfluss dieser Flavonoide auf die Lokalisation des Transkriptionsfaktors SKN-1 mithilfe des Stammes LD001, welcher ein Fusionsprotein aus SKN-1 und GFP exprimiert, untersucht. Die Einteilung der LD001-Tiere erfolgt erneut in „nukleär“ und „zytosolisch“ in Abhängigkeit von der Lokalisation von SKN-1::GFP in den Darmzellen (Abb. 30).

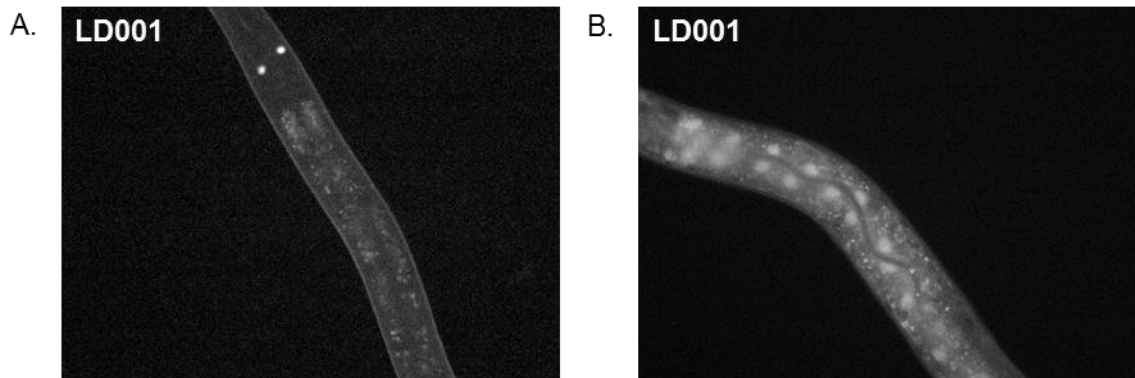


Abbildung 30: Beispielhafte Darstellung zytosolischer und nukleärer SKN-1::GFP-Lokalisation im transgenen *C. elegans*-Stamm LD001.

- A. Nematoden mit zytosolischer SKN-1::GFP-Lokalisation unter basalen Bedingung bei 20°C.
- B. Nematoden mit nukleärer SKN-1::GFP-Lokalisation nach einer einstündigen Behandlung mit 1 mM H₂O₂ als Positivkontrolle.

Die Ergebnisse zum Einfluss der ausgewählten Flavonoide auf die DAF-16- und SKN-1-Lokalisation in den transgenen Stämmen sind in Abb. 31 dargestellt. Die Langzeitinkubationen mit den Flavonolen (50 µM) oder LQ (100 µM) zeigten keinen Einfluss auf die zelluläre DAF-16::GFP-Lokalisation in den TJ356-Nematoden. Die ausgewählten Flavonoide veränderten ebenfalls nicht die zelluläre SKN-1::GFP-Lokalisation im LD001-Stamm. Die Fraktion der „nukleär“-eingestuft Tiere lag bei allen Gruppen zwischen 5 und 20 %. Die Ergebnisse.

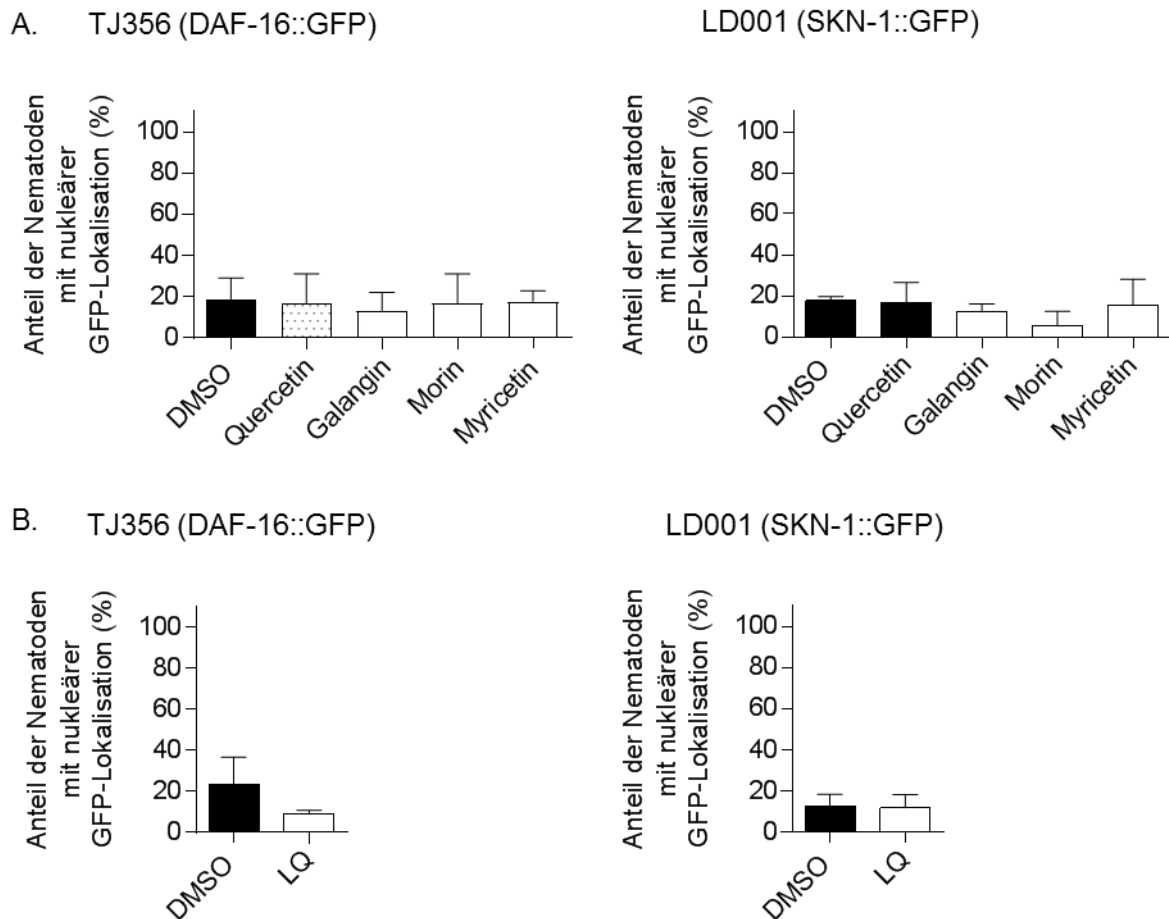


Abbildung 31: Einfluss von Flavonoiden auf die zelluläre DAF-16- und SKN-1-Lokalisation in *C. elegans* (Langzeitinkubation).

Nematoden vom transgenen Stamm TJ356 (links) oder LD001 (rechts), die ein DAF-16::GFP- oder SKN-1::GFP-Fusionsprotein exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit dem Flavonoid bzw. 0,1 % DMSO bei 20°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Tiere.

A. 50 µM Flavonole,

B. 100 µM LQ.

Angegeben sind die Mittelwerte der Fraktion mit nukleärer GFP-Lokalisation \pm Standardabweichung, $n = 3$ (30 Individuen/Versuch), (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. DMSO = Dimethylsulfoxid, GFP = grün fluoreszierendes Protein, LQ = Liquiritigenin.

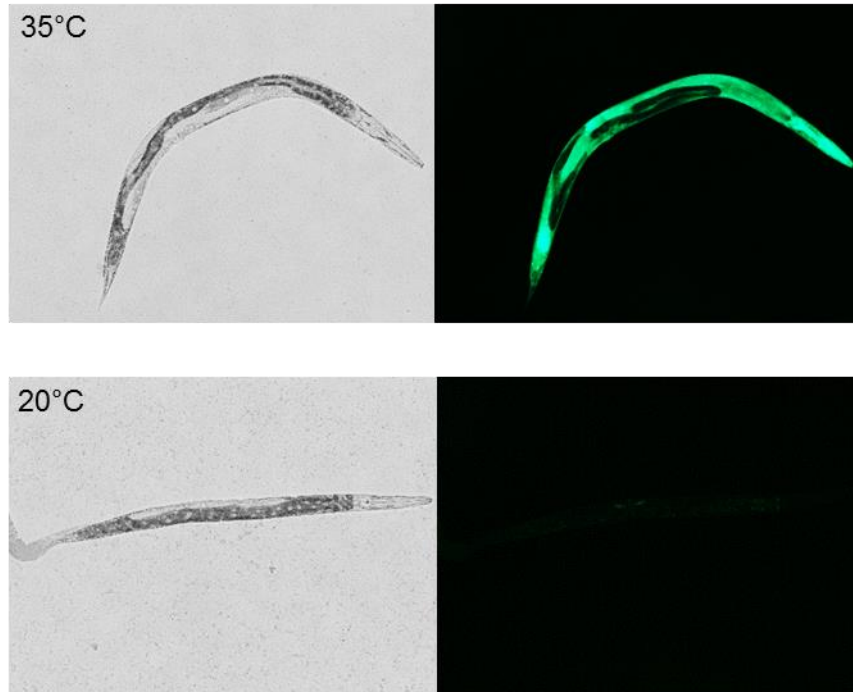
4.2.8 Modulation der HSP-16.2-Expression

Da eine erhöhte HSP-16.2-Proteinexpression mit einer verminderten $A\beta_{1-42}$ -induzierten Paralyserate in *C. elegans* assoziiert ist, wurde ebenfalls überprüft, ob die ausgewählten Naturstoffe die HSP-16.2-Proteinexpression in *C. elegans* modulieren.

Zu diesem Zweck wurde der transgene Stamm CL2070, der ein Fusionsprotein aus HSP-16.2 und GFP exprimiert, verwendet. Die Expression des Fusionsproteins wurde nach einer Langzeitinkubation mit den Pflanzenstoffen durch einen kurzen Hitzeschock (35°C) von 45 min induziert. Zuvor wurde die benötigte Dauer des Hitzestress zur HSP-16.2::GFP-Induktion ermittelt, wobei die GFP-Fluoreszenz zum einen manuell anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen und zum anderen automatisch mittels Plattenlesegerät ermittelt wurde (Anh. Abb. 63). Da die Fluoreszenzmessung im Plattenlesegerät durch die individuelle Größe der Tiere beeinflusst werden kann, wurde außerdem der transgene Stamm

PD4251, welcher ein Fusionsprotein aus MYO-3 und GFP exprimiert, als ein Marker für die Größe der Tiere mitgeführt. In einem Vorversuch wurde die Assoziation zwischen der Fläche der PD4251 Tiere und der Fluoreszenzmessung im Plattenlesegerät (Synergy MX, BioTek Instruments, Inc.) überprüft (Anh. Abb. 64). Abb. 32A und B zeigt repräsentative Aufnahmen von CL2070 und PD4251 Tieren.

A. CL2070 (HSP-16.2::GFP)



B. PD4251 (MYO-3::GFP)

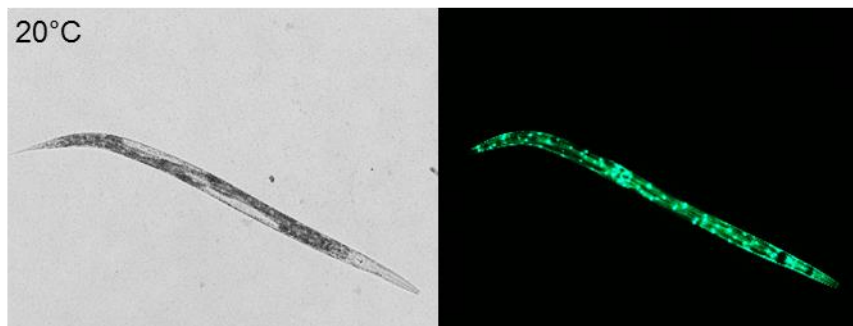


Abbildung 32: Beispielhafte Darstellung der HSP-16.2::GFP- und MYOSIN-3::GFP-Expression in *C. elegans*.

- A. HSP-16.2::GFP-Expression in CL2070-Nematoden nach einem 45-minütigen Hitzeschock bei 35°C (oben) und unter basalen Bedingungen bei 20°C.
- B. MYOSIN-3::GFP-Expression in PD4251-Nematoden unter basalen Bedingungen bei 20°C.

Die Behandlung mit den einzelnen Flavonolen zeigte keinen Einfluss auf die HSP-16.2::GFP-Expression in den CL2070 Tieren unter basalen Bedingungen (20°C) und nach einem Hitzeschock im Vergleich zur DMSO-Behandlung (Abb. 33A links). Auch die MYO-3::GFP-Expression als Marker für die Größe der Tiere wurde nicht durch die Inkubation mit den Flavonolen beeinflusst (Abb. 33A rechts). Bei der Untersuchung einer LQ-Behandlung konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede

in der HSP-16.2- und MYO-3::GFP-Expression im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 33B).

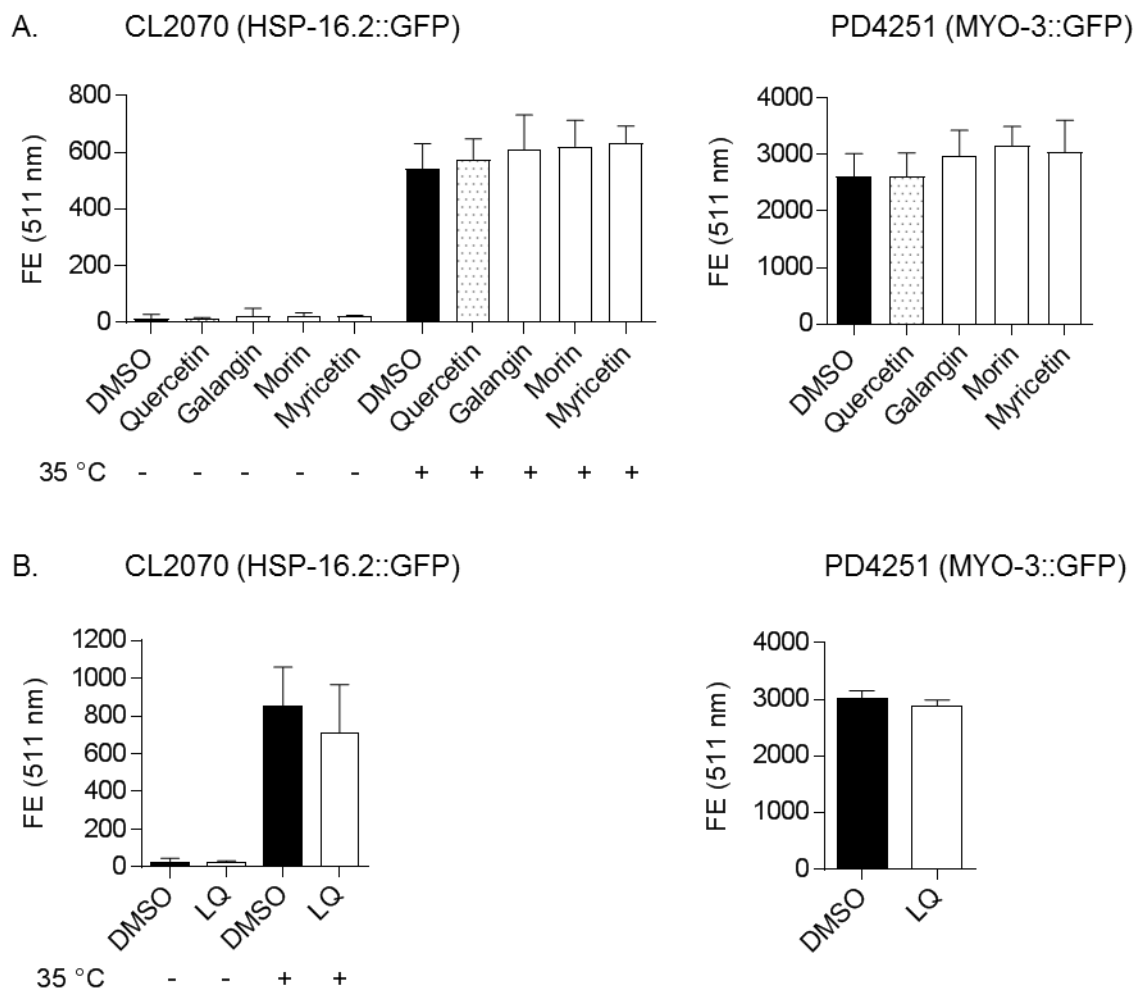


Abbildung 33: Einfluss von Flavonoiden auf die HSP-16.2::GFP-Expression in *C. elegans* (Langzeitinkubation).

Nematoden vom transgenen Stamm CL2070 (links), die ein Fusionsprotein aus HSP-16.2 und GFP exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit dem jeweiligen Flavonoid bzw. 0,1 % DMSO bei 20°C inkubiert. Für die HSP-16.2-Induktion erfolgte ein kurzer Hitzestress bei 35°C. Nematoden vom transgenen Stamm PD4251 (rechts), die ein Fusionsprotein aus MYO-3- und GFP exprimieren, wurden analog zu den CL2070-Tieren behandelt. Nach einer 24-stündigen Erholungsphase wurden die Tiere beider Stämme in eine 384-Wellplatte pipettiert und die Fluoreszenz im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 488 nm, Em.: 511 nm).

- A. 50 µM Flavonole,
- B. 100 µM LQ.

Angegeben sind relative Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 3$ (60 Individuen/Versuch), (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. DMSO = Dimethylsulfoxid, FE = Fluoreszenzeinheiten, LQ = Liquiritigenin.

4.3 Methylierte Flavonoide

4.3.1 Modulation der A β ₁₋₄₂-Toxizität im transgenen *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer

Da Modifikationen im Flavonoid-Grundgerüst die Bioaktivität beeinflussen können, wurde im Folgenden der Einfluss einer Methylierung der Leitsubstanz Quercetin auf die A β ₁₋₄₂-induzierte Paralyse im transgenen *C. elegans*-Stamm CL4176 untersucht. Zu diesem Zweck wurden Substanzen mit einer Methylierung an C3 (Q-3-M), C3' (Isorhamnetin) oder C4' (Tamarixetin) gewählt.

Von den untersuchten methylierten Quercetinderivaten führte nur eine Behandlung mit Q-3-M (50 μ M) zu einer statistisch signifikanten ($p = 0,004$) Protektion gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* (Abb. 34). Die mittlere Zeit bis zum Eintreten der Paralyse der Q-3-M-behandelten Tiere verlängerte sich hierbei um 1 h im Vergleich zur DMSO-Gruppe. Die Quercetin-Behandlung zeigte in diesem Experiment eine vergleichbare Wirkung wie die Q-3-M-Inkubation in den Nematoden (Tabelle 3).

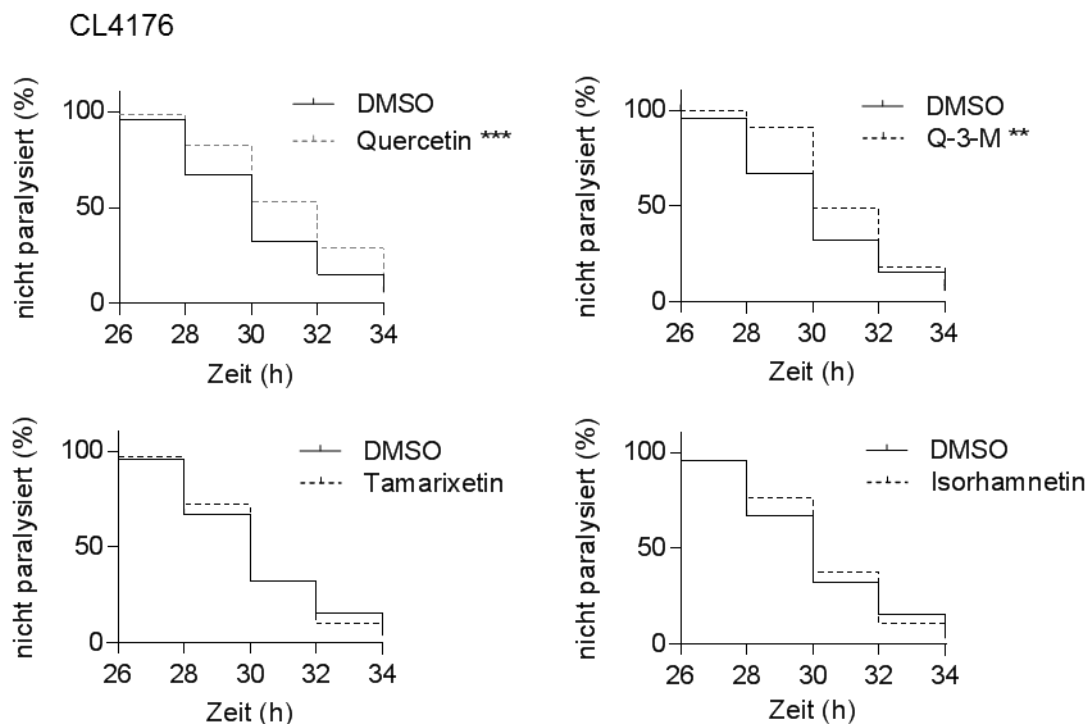


Abbildung 34: Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf die A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans*. Nematoden vom transgenen Stamm CL4176, die das humane A β ₁₋₄₂-Peptid temperaturabhängig in den Körperwandmuskelzellen exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit 50 μ M des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 25°C für 24 h, wobei die Tiere zeitversetzt auf NGM-Platten überführt wurden. Mittels *touch-provoked movement* wurde das Eintreten der Paralyse festgestellt. Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven, $n = 3$ (40 Individuen/Versuch), ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ (Log-rank (Mantel-Cox) Test) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. DMSO = Dimethylsulfoxid, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

Tabelle 3: Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf die Paralyse im transgenen *C. elegans*-Stamm CL4176.

DMSO = Dimethylsulfoxid, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether, SEM = Standardfehler.

Behandlung	mittlere Zeit (h) bis zum Eintreten der Paralyse \pm SEM	mediane Zeit (h) bis zum Eintreten der Paralyse \pm SEM	n	p-Wert (log-Rank)
0,1 % DMSO	30,2 \pm 0,213	30 \pm 0,253	118	
50 μM Quercetin	31,2 \pm 0,206	32 \pm 0,307	121	0,001
50 μM Q-3-M	31,2 \pm 0,160	30 \pm 0,246	124	0,004
50 μM Isorhamnetin	30,9 \pm 0,187	30 \pm 0,187	122	0,810
50 μM Tamarixetin	30,2 \pm 0,246	30 \pm 0,188	122	0,780

4.3.2 Modulation der Aggregation von A β -Plaques im transgenen *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer

Der Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf die Akkumulation von A β -Plaques in *C. elegans* wurde mittels Fluoreszenzfarbstoff ThS im transgenen Stamm CL2006 bestimmt (Siehe 4.2.2, Abb. 21C). Nematoden, die mit Quercetin oder den methylierten Quercetinderivaten (50 μ M) behandelt wurden, zeigten keine statistisch signifikante Veränderung in der Plaque-Anzahl gegenüber der Kontrollgruppe. Jedoch wiesen die mit Quercetin oder Q-3-M inkubierten Nematoden eine um ca. 28 und 51 % geringere mittlere Plaque-Anzahl als die Kontrolle auf (Abb. 35A). Nach Einordnung der Nematoden in Plaque-Klassen wurden ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrolle festgestellt (Abb. 35B). Bei der Quercetin- und Q-3-M-Gruppe war jedoch der Anteil der Nematoden in Klasse A (0-15 Plaques) höher als bei den DMSO-Tieren: Die Q-3-M-Behandlung vergrößerte den Anteil der Nematoden in Klasse A um den 4-fachen Wert der Kontrolle in zwei von drei Experimenten. Des Weiteren wiesen die Quercetin- und Q-3-M-Gruppen keine Tiere in der Klasse D (> 45 Plaques) auf, wohingegen 8 % der Nematoden in der DMSO-Gruppe dieser Klasse zugeordnet wurden. Die Tamarixetin- und Isorhamnetin-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Verteilung der Nematoden in die Plaque-Klassen.

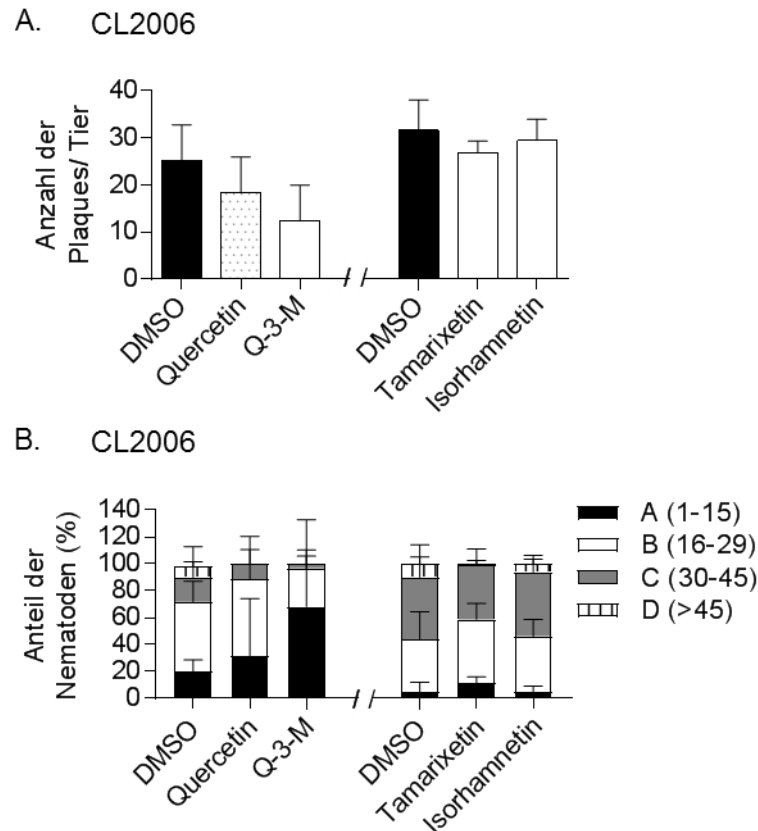


Abbildung 35: Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf die Akkumulation von ThS-positiven A β -Plaques in *C. elegans*.

Nematoden vom transgenen Stamm CL2006, die das humane A β ₁₋₄₂-Peptid konstitutiv in den Körperwandmuskulazellen exprimieren, wurden ab dem L4-Stadium für 48 h mit 50 μ M des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO bei 20°C inkubiert. Anschließend wurden die Tiere fixiert, permeabilisiert und mit ThS gefärbt.

- A. Anzahl der Plaques/ Tier, angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest),
- B. Klassifizierung nach Anzahl der Plaques, angegeben sind Mittelwerte des prozentualen Anteils der Nematoden pro Klasse und Behandlungsgruppe \pm Standardabweichung (*two-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest).

n = 3 für Quercetin und Q-3-M und n = 4 für Isorhamnetin und Tamarixetin (20 Individuen/Versuch und Gruppe). Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

4.3.3 Bestimmung der radikalfangenden Kapazität *in vitro* (TEAC-Assay)

Die *in vitro*-antioxidative Kapazität von methylierten Quercetinderivaten wurde mittels der TEAC-Methode untersucht. Hierbei zeigten alle Substanzen ab einer Konzentration von 10 μ M potente radikalfangende Eigenschaften: Die mittlere Absorption der ABTS-Radikallösung wurde durch alle untersuchten Substanzen statistisch signifikant ($p \leq 0,001$) gegenüber der DMSO-Kontrolle reduziert (Abb. 376). Des Weiteren zeigten Q-3-M und Tamarixetin in einer Konzentration von 10 μ M eine statistisch signifikant schwächere ($p \leq 0,001$) Kapazität als Quercetin und waren daher vergleichbar mit der Referenzsubstanz Trolox (Abb. 36B). Hingegen wies Isorhamnetin in allen Konzentrationsbereichen eine statistisch signifikant ($p \leq 0,001$) niedrigere antioxidative Potenz als Quercetin auf. Methylierungen an C3 und C4' bewirkten somit eine 7-fach und eine Methylierung an C3' eine 10-fach geringere antioxidative Kapazität als Quercetin (Abb. 36B). Die Reihenfolge der antioxidativen Kapazität von

methylierten Quercetinderivaten *in vitro* ergibt sich demnach wie folgt: Isorhamnetin < Q-3-M = Tamarixetin < (Quercetin).

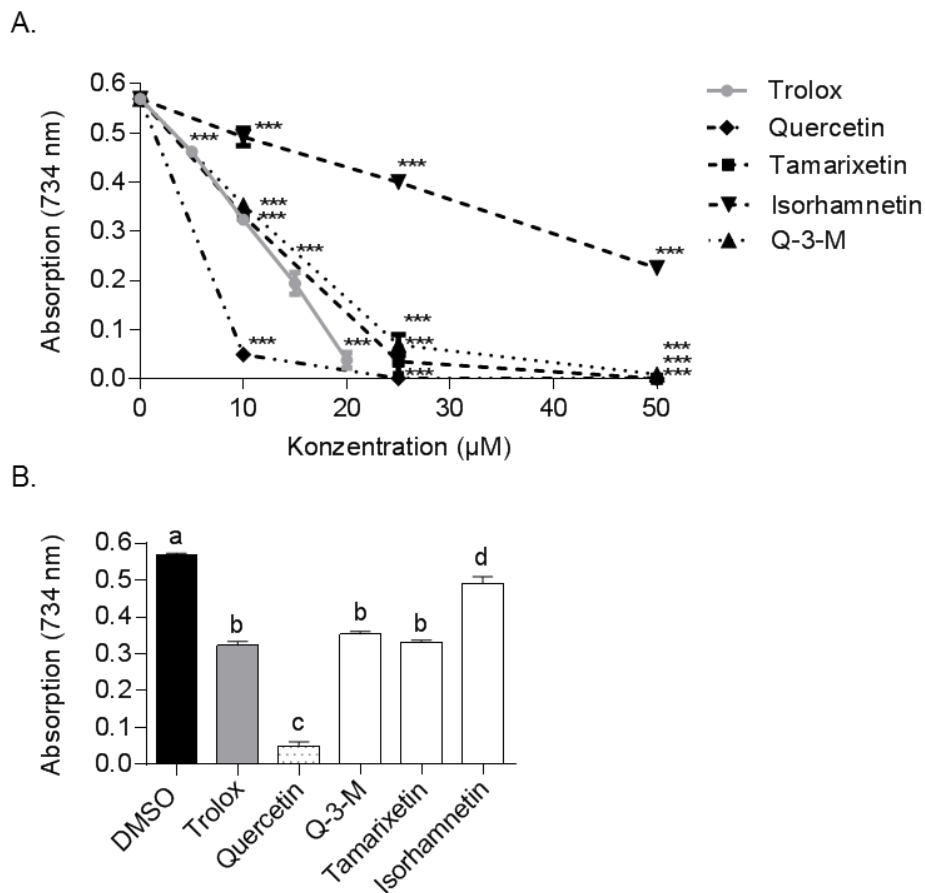


Abbildung 36: Antioxidative Kapazität von methylierten Quercetinderivaten *in vitro* in einem zellfreien System.

Photometrische Bestimmung der Absorption des blau-grün gefärbten ABTS-Radikals nach sechsminütiger Inkubation mit der jeweiligen Substanz in der angegebenen Konzentration. Die Abnahme der Absorption korreliert mit der antioxidativen Kapazität des Flavonoids. Für die Standardreihe wurde das synthetische Vitamin E-Derivat TROLOX verwendet.

A. Konzentrationen: 10-50 µM,

B. Konzentration: 10 µM.

Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$, $***p \leq 0,001$ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, $_{a,b,c,d} p \leq 0,05$ Gruppen mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest). DMSO = Dimethylsulfoxid, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

4.3.4 Modulation der ROS-Akkumulation im transgenen *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer unter thermalem Stress

Die Behandlung der transgenen Nematoden (CL4176) mit den methylierten Quercetinderivaten führte zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der ROS-Spiegel unter thermalem Stress im Vergleich mit der DMSO-Inkubation (Abb. 37). Tiere, die mit Quercetin, Q-3-M oder Isorhamnetin (50 µM) behandelt wurden, wiesen jedoch im Durchschnitt niedrigere relative Fluoreszenzwerte als die Kontrolle auf und entsprachen damit der Quercetin-Gruppe. Die Tamarixetin (50 µM)-behandelten Nematoden zeigten im Gegensatz dazu geringfügig höhere ROS-Spiegel als die DMSO-Tiere.

CL4176

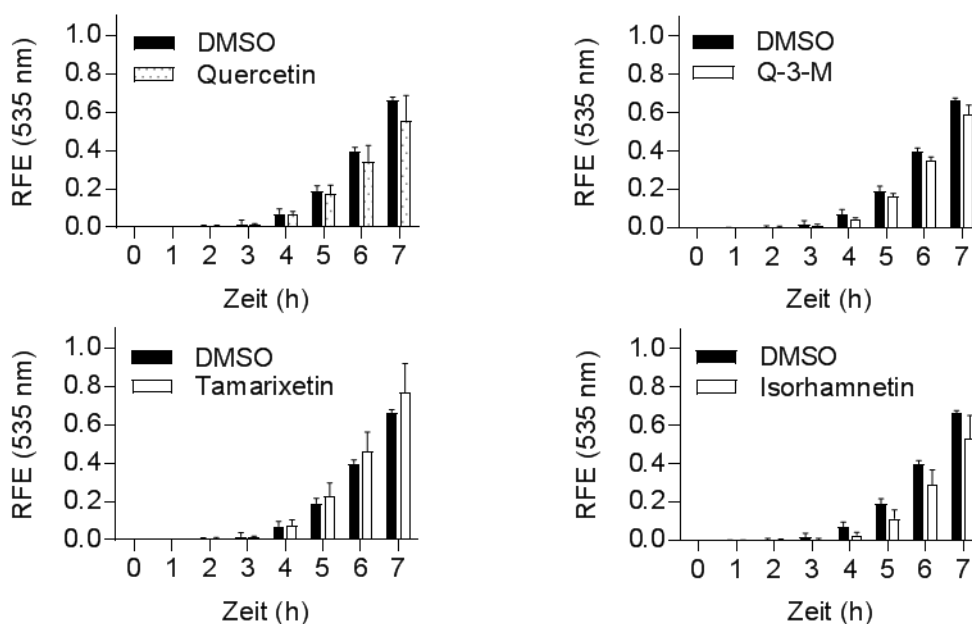


Abbildung 37: Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im transgenen $\text{A}\beta_{1-42}$ -exprimierenden *C. elegans*-Stamm unter thermalem Stress. Nematoden vom Stamm CL4176 wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit 50 μM des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 25 °C für 24 h. Nach einem Waschschrift (PBST) wurden die Tiere in eine 384-Wellplatte pipettiert und mit 50 μM $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ versetzt. Die Fluoreszenz der Tiere wurde bei 37°C für 12 h im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 485 nm, Em.: 535 nm). Angegeben sind relative Mittelwerte \pm Standardabweichung bezogen auf den 8 h-Wert der Kontrolltiere, $n = 3$ (30 Individuen/Versuch), (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. RFE = relative Fluoreszenzeinheiten, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

4.3.5 Modulation der ROS-Akkumulation im Wildtypen unter thermalem Stress

Die Ergebnisse zum Einfluss der methylierten Quercetinderivate auf die Hitzestress-induzierten ROS-Akkumulation in wildtypischen *C. elegans* (N2) sind in Abb. 38 ersichtlich. Eine Behandlung mit Q-3-M, Tamarixetin oder Isorhamnetin (100 μM) zeigte keine statistisch signifikante Wirkung auf die mittlere ROS-Konzentration in den Nematoden im Vergleich zur DMSO-Gruppe. Wie in den CL4176-Tieren führte die Tamarixetin-Behandlung jedoch im Durchschnitt zu einer Erhöhung der ROS-Akkumulation in den N2-Tieren gegenüber der Kontrolle.

Wildtyp (N2)

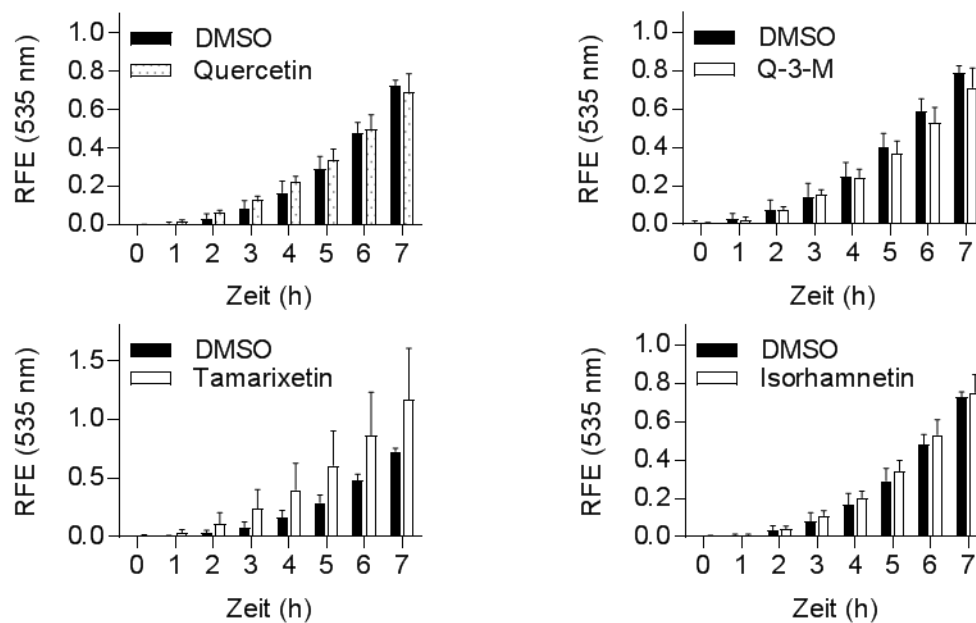


Abbildung 38: Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im wildtypischen *C. elegans*-Stamm unter thermalem Stress.

Nematoden vom Stamm N2 wurden ab dem L4-Stadium für 48 h mit 100 μ M des Flavonoids bzw. 0,2 % DMSO bei 20°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBST wurden die Tiere in eine 384-Wellplatte pipettiert und mit 50 μ M H₂DCF-DA versetzt. Die Fluoreszenz der Tiere wurde bei 37°C für 12 h im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 485 nm, Em.: 535nm). Angegeben sind relative Mittelwerte \pm Standardabweichung bezogen auf den 8 h-Wert der Kontrolltiere, n = 3 (8 Individuen/Versuch), (one-way ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. DMSO = Dimethylsulfoxid, RFE = relative Fluoreszenzeinheiten, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

4.3.6 Modulation der thermalen Stressresistenz im Wildtypen

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine Behandlung mit methylierten Quercetinderivaten die thermale Stressresistenz in wildtypischen Nematoden (N2) moduliert. Tiere, die mit Quercetin oder den methylierten Derivaten (100 μ M) behandelt wurden zeigten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede in der mittleren Überlebenszeit gegenüber den DMSO-Tieren (Abb. 39).

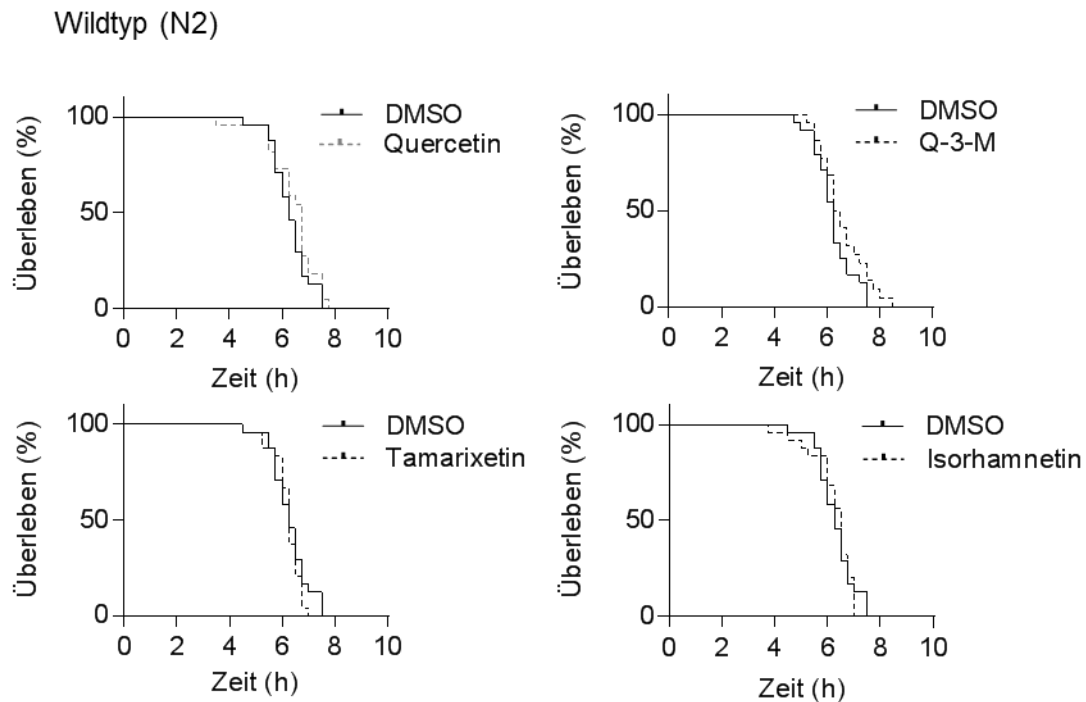


Abbildung 39: Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf das Überleben von wildtypischen *C. elegans* unter thermalem Stress.

Nematoden vom Stamm N2 wurden ab dem L4-Stadium für 48 h mit 100 μM des Flavonoids bzw. 0,2 % DMSO bei 20°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBST wurden die Tiere einzeln in je eine Kavität mit 9 μl PBS einer 384-Wellplatte pipettiert. Anschließend wurde die SYTOX Green-Lösung in einer Endkonzentration von 1 μM hinzugegeben, die Platte versiegelt und die Fluoreszenz bei 37°C für 12 h im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 485 nm, Em.: 535 nm). Aus den individuellen Fluoreszenzkurven wurden durch Festlegen von Schwellenwerten virtuelle Todeszeitpunkte berechnet. Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven, $n = 3$ (8 Individuen/Versuch), * $p \leq 0,05$ (Log-rank (Mantel-Cox) Test)) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. DMSO = Dimethylsulfoxid, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

4.3.7 Modulation der zellulären Lokalisation von GFP-gekoppelten Transkriptionsfaktoren

4.3.7.1 Modulation der zellulären DAF-16-Lokalisation (Kurzzeitinkubation)

Um einen möglichen Wirkmechanismus der methylierten Quercetinderivate zu identifizieren, wurde die zelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16 im transgenen Stamm TJ356 nach einer einstündigen Inkubation mit den Substanzen analysiert (Siehe 4.2.7.1, Abb. 28). Alle untersuchten Naturstoffe (50 μM) erhöhten die nukleäre Translokation von DAF-16::GFP in einem vergleichbaren Maße: In den Behandlungsgruppen entsprach der Anteil der Tiere mit nukleärem DAF-16::GFP ca. dem 4 bis 5-fachen Wert der Kontrolltiere. Jedoch waren nur die Werte der Quercetin- und Isorhamnetin-Gruppe statistisch signifikant ($p = 0,036$ und $0,016$) unterschiedlich von der DMSO-Gruppe (Abb. 40).

TJ356 (DAF-16::GFP)

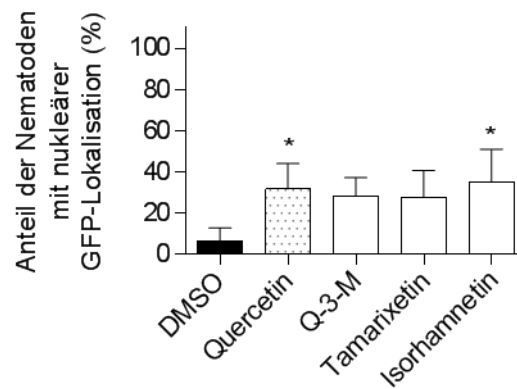


Abbildung 40: Einfluss von methylierten Quercetinderivaten auf die zelluläre DAF-16-Lokalisation in *C. elegans* (Kurzzeitinkubation).

Nematoden vom transgenen Stamm TJ356, die ein Fusionsprotein aus DAF-16 und GFP überexprimieren, wurden ab dem L4-Stadium für 1 h mit 50 μM des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO bei 20°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Tiere. Angegeben sind die Mittelwerte der Fraktion mit nukleärer GFP-Lokalisation \pm Standardabweichung, $n = 4$ (30 Individuen/Versuch), * $p \leq 0,05$ (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. DMSO = Dimethylsulfoxid, GFP = grün fluoreszierendes Protein, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

4.3.7.2 Modulation der zellulären DAF-16- und SKN-1-Lokalisation (Langzeitinkubation)

Anschließend wurde untersucht, ob eine Langzeitinkubation mit den Flavonoiden (entsprechend dem Behandlungsschema des $\text{A}\beta$ -Paralyseversuches) die nukleäre Akkumulation von DAF-16- und SKN-1 in den transgenen *C. elegans*-Stämmen TJ356 und LD001 erhöht. Für dieses Experiment wurden nur Substanzen, die sich im $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizitätassay als protektiv erwiesen, eingesetzt. Die Behandlung mit Q-3-M (50 μM) zeigte, genauso wie die Behandlung mit der Leitsubstanz Quercetin (50 μM), keinen Einfluss auf die zelluläre DAF-16::GFP-Lokalisation in den TJ356-Nematoden (Abb. 41 links). Die Inkubationen mit den untersuchten Substanzen zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Translokation von SKN-1::GFP in die Darmzellkerne der LD001-Tiere (Abb. 41 rechts).

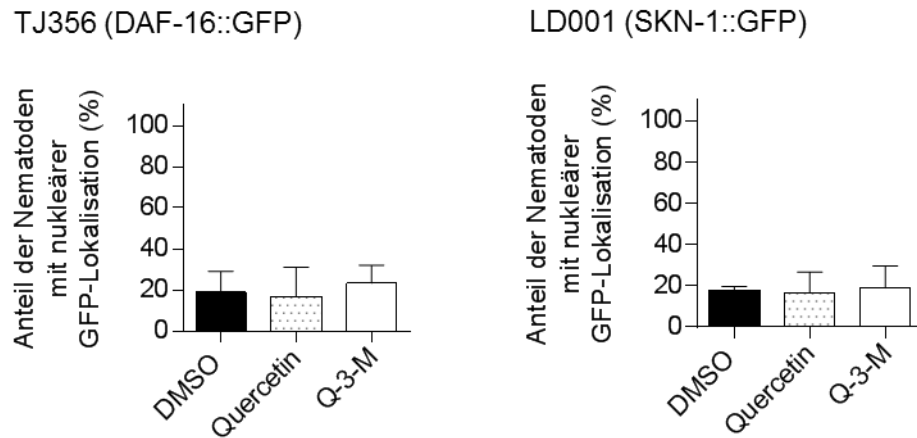


Abbildung 41: Einfluss von Quercetin und Q-3-M auf die zelluläre DAF-16- und SKN-1-Lokalisation in *C. elegans* (Langzeitinkubation).

Nematoden vom transgenen Stamm TJ356 (links) oder LD001 (rechts), die ein DAF-16::GFP- oder SKN-1::GFP-Fusionsprotein exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit 50 μ M des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO bei 20°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Tiere auf dem Objektträger. Angegeben sind die Mittelwerte der Fraktion mit nukleärer GFP-Lokalisation \pm Standardabweichung, $n = 3$ (30 Individuen/Versuch), (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. DMSO = Dimethylsulfoxid, GFP = grün fluoreszierendes Protein, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

4.3.8 Modulation der HSP-16.2::GFP-Proteinexpression

Der Einfluss von Quercetin und Q-3-M auf die HSP-16.2-Proteinexpression in *C. elegans* wurde mittels Fluoreszenzmessung von transgenen Tieren (CL2070), die ein Fusionsprotein aus HSP-16.2 und GFP exprimieren, untersucht. Als Kontrolle für die Größe der Tiere wurde der transgene Stamm PD4251 mitgeführt (Siehe 4.2.8, Abb. 32).

Weder die Quercetin- noch die Q-3-M-Behandlung veränderte die HSP-16.2- oder MYO-3::GFP-Expression in den transgenen Nematoden im Vergleich zur DMSO-Gruppe (Abb. 42).

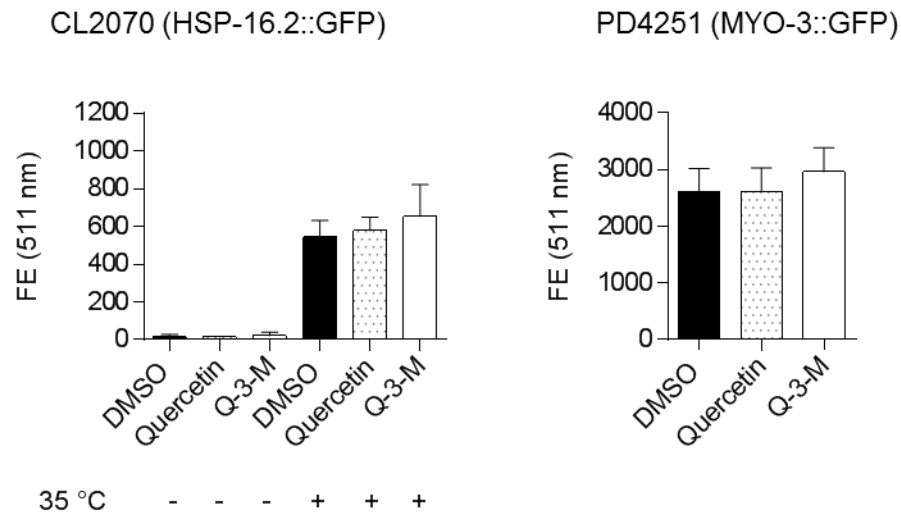


Abbildung 42: Einfluss von Quercetin und Q-3-M auf die HSP-16.2::GFP-Expression in *C. elegans* (Langzeitinkubation).

Nematoden vom transgenen Stamm CL2070 (links), die ein Fusionsprotein aus HSP-16.2 und GFP exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit 50 μ M des Flavonols bzw. 0,1 % DMSO inkubiert. Für die HSP-16.2-Induktion erfolgte ein kurzer Hitzestress bei 35°C. Nematoden vom transgenen Stamm PD4251 (rechts), die ein Fusionsprotein aus MYO-3- und GFP exprimieren wurden analog zu den CL2070 Tieren behandelt. Nach einer 24-stündigen Erholungsphase wurden die Tiere beider Stämme in eine 384-Wellplate pipettiert und die Fluoreszenz im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 488 nm, Em.: 511 nm). Angegeben sind relative Mittelwerte \pm Standardabweichung, n = 3 (60 Individuen/Versuch), (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. DMSO = Dimethylsulfoxid, FE = Fluoreszenzeinheiten, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

4.4 Prenylierte Flavonoide

4.4.1 Modulation der A β ₁₋₄₂-Toxizität im transgenen *C.elegans*-Modell für Morbus Alzheimer

In diesem Abschnitt der Arbeit soll der Einfluss einer Prenylierung von Flavonoiden auf die A β ₁₋₄₂-induzierte Paralyse im transgenen *C. elegans*-Stamm CL4176 untersucht werden. Hierfür wurden die zwei prenylierten Naringeninderivate 8-PN und 6-PN, welche Inhaltsstoffe von HOE sind, ausgewählt. Vergleichend dazu wurde auch das methylierte Naringeninderivat ISK (Methylierung an C4') mitgeführt. Die ISK-Behandlung (100 μ M) hatte keinen Einfluss auf das Paralyseverhalten der CL4176-Nematoden und entsprach damit der Naringenin-Inkubation (Abb. 43). Im Gegensatz dazu führte eine Behandlung mit den prenylierten Naringeninverbindungen zu einer Rechtsverschiebung der Paralysekurve: Die 8-PN- und 6-PN-Inkubation (100 μ M) verlängerten die mittlere Zeitspanne bis zum Eintritt der Paralyse von *C. elegans* um 1,1 h ($p < 0,001$) und 0,8 h ($p = 0,010$) gegenüber den DMSO-behandelten Tieren (Abb. 43, Tabelle 4). Bei der Untersuchung einer geringeren Konzentration (50 μ M) zeigte nur die 8-PN-Behandlung eine statistisch signifikante ($p = 0,004$) Protektion gegenüber der A β ₁₋₄₂-induzierten Paralyse in *C. elegans* (Anh. Abb. 64).

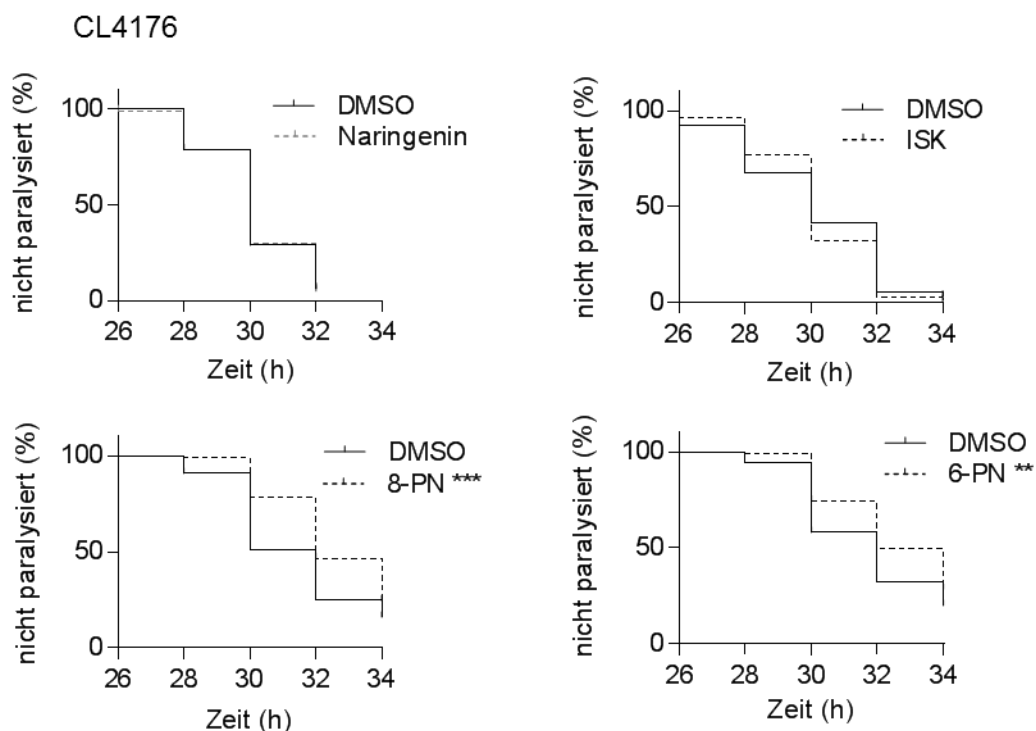


Abbildung 43: Einfluss einer Prenylierung und Methylierung von Naringenin auf die A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans*.

Nematoden vom transgenen Stamm CL4176, die das humane A β ₁₋₄₂-Peptid temperaturabhängig in den Körperwandmuskelzellen exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit 100 μ M des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 25°C für 24 h, wobei die Tiere zeitversetzt auf NGM-Platten überführt wurden. Mittels *touch-provoked movement* wurde das Eintreten der Paralyse festgestellt. Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven, $n = 3$ (40 Individuen/Versuch), ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ (Log-rank (Mantel-Cox) Test) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. Die Naringenin-, 8-PN- und 6-PN-Daten wurden von Herrn Gabriel Schulz im Rahmen seiner Masterarbeit erstellt. DMSO = Dimethylsulfoxid, ISK = Isosakuranetin, PN = Prenylnaringenin.

Tabelle 4: Einfluss einer Prenylierung und Methylierung von Naringenin auf die Paralyse im transgenen *C. elegans*-Stamm CL4176.

DMSO = Dimethylsulfoxid, ISK = Isosakuranetin, PN = Prenylnaringenin, SEM = Standardfehler.

Behandlung	mittlere Zeit (h) bis zum Eintreten der Paralyse \pm SEM	mediane Zeit (h) bis zum Eintreten der Paralyse \pm SEM	n	p-Wert (log-Rank)
0,1 % DMSO	30,2 \pm 0,131	30 \pm 0,169	117	
100 μM Naringenin	30,2 \pm 0,135	30 \pm 0,174	119	0,953
0,1 % DMSO	30,2 \pm 0,184	30 \pm 0,339	121	
100 μM ISK	30,2 \pm 0,156	30 \pm 0,194	120	0,443
0,1 % DMSO	31,4 \pm 0,175	32 \pm 0,243	120	
100 μM 8-PN	32,5 \pm 0,148	32 \pm 0,339	120	<0,001
0, 1% DMSO	31,7 \pm 0,174	32 \pm 0,333	119	
100 μM 6-PN	32,5 \pm 0,156	32 \pm 0,397	121	0,010

4.4.2 Modulation der Aggregation von A β -Plaques im transgenen *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer

Um zu untersuchen ob die Protektion gegenüber der A β_{1-42} -Toxizität durch die Naturstoffe mit einer veränderten A β -Peptidablagerung assoziiert ist, wurde die Akkumulation von A β -Plaques in CL2006-Nematoden mittels ThS-Färbung analysiert (Siehe 4.2.2, Abb. 21C).

Die Behandlungen mit Naringenin oder den prenylierten Derivaten (100 μ M) zeigten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die mittlere Anzahl der A β -Plaques in den transgenen Tieren gegenüber der Kontrolle. Nematoden, die mit 8-PN oder 6-PN behandelt wurden, zeigten jedoch niedrigere Werte, wobei die mittlere Anzahl der A β -Plaques um ca. 52 und 35 % geringer war als bei den Kontrolltieren (Abb. 44A). Durch die Klassifizierung der Nematoden nach der Anzahl der Plaques wurden statistisch signifikante ($p = 0,001$) Unterschiede zwischen der 8-PN und der DMSO-Gruppe innerhalb der Klasse A festgestellt (Abb. 44B). Hierbei erhöhte die 8-PN-Behandlung den prozentualen Anteil der Tiere in Klasse A auf den 7-fachen Wert der DMSO-Gruppe. Die 6-PN-Gruppe wies ebenfalls statistisch signifikant ($p = 0,037$) mehr Tiere in Klasse A auf als die Kontrollgruppe, wobei der prozentuale Anteil der Tiere in dieser Kategorie um das 4-fache anstieg. Die Naringenin- und ISK-Behandlung beeinflusste die Verteilung der Nematoden in die A β -Plaques-Klassen nicht.

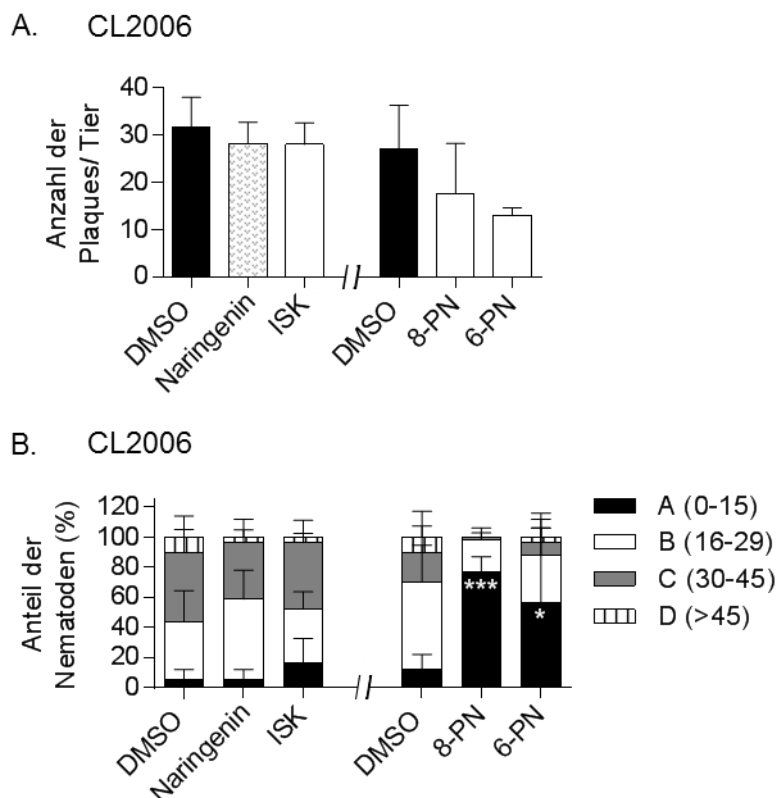


Abbildung 44: Einfluss einer Prenylierungen und Methylierung von Naringenin auf die Akkumulation von ThS-positiven A β -Plaques in *C. elegans*.

Nematoden vom transgenen Stamm CL2006, die das humane A β ₁₋₄₂-Peptid konstitutiv in den Körperwandmuskelzellen exprimieren, wurden ab dem L4-Stadium für 48 h mit 100 μ M des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO bei 20°C inkubiert. Anschließend wurden die Tiere fixiert, permeabilisiert und mit ThS gefärbt.

- A. Anzahl der Plaques/Tier, angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest).
- B. Klassifizierung nach Anzahl der Plaques, angegeben sind Mittelwerte des prozentualen Anteils der Nematoden pro Klasse und Behandlungsgruppe \pm Standardabweichung, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ (*two-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Gruppe.

n = 4 (für Naringenin und ISK) und n = 3 für 8-PN und 6-PN (20 Individuen/Versuch und Gruppe).
DMSO = Dimethylsulfoxid, ISK = Isosakuranetin, PN = Prenylnaringenin.

4.4.3 Bestimmung der radikalfangenden Kapazität *in vitro* (TEAC-Assay)

Bei der Untersuchung der radikalfangenden Eigenschaften *in vitro* zeigten nur die prenylierten Verbindungen (100 μ M) eine statistisch signifikante ($p \leq 0,05$) antioxidative Aktivität im TEAC-Assay (Abb. 45). 8-PN und 6-PN reduzierten dabei die ABTS-Absorption gleichermaßen um ca. 23 % gegenüber der DMSO-Kontrolle und entsprachen damit etwa der antioxidativen Aktivität von 5 μ M Trolox. Im Gegensatz dazu wies das methylierte Derivate ISK (100 μ M) keine radikalfangenden Eigenschaften auf und entsprach damit der Wirkung von Naringenin (Abb. 45).

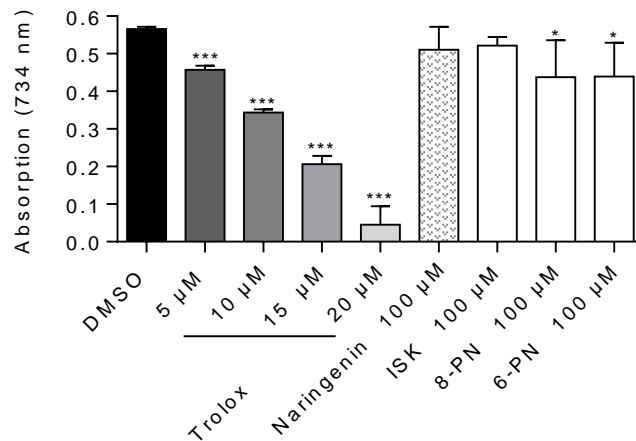


Abbildung 45: Antioxidative Kapazität von prenylierten und methylierten Naringeninderivaten *in vitro* in einem zellfreien System.

Photometrische Bestimmung der Absorption des blau-grün gefärbten ABTS-Radikals nach sechsminütiger Inkubation mit 100 µM Substanz. Die Abnahme der Absorption korreliert mit der antioxidativen Kapazität des Flavonoids. Für die Standardreihe wurde das synthetische Vitamin E-Derivat TROLOX verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 3$, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest). DMSO = Dimethylsulfoxid, ISK = Isosakuranetin, PN = Prenylnaringenin.

4.4.4 Modulation der ROS-Akkumulation im transgenen *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer unter thermalem Stress

Die Behandlung mit dem methylierten Naringeninderivat ISK (100 µM) führte zu einer statistisch signifikanten ($p = 0,004$) Abnahme der mittleren ROS-Akkumulation nach 5 h thermalem Stress im Vergleich zur DMSO-Gruppe (Abb. 46). Dabei entsprachen die mittleren RFE der ISK-Tiere die Hälfte der RFE der DMSO-Gruppe. Nach 6 und 7 h thermalem Stress führte die ISK-Behandlung weiterhin zu einer statistisch signifikanten ($p \leq 0,001$) antioxidativen Wirkung in den transgenen Alzheimer-Tieren. Im Gegensatz dazu resultierte eine Behandlung mit den prenylierten Naringeninderivaten (100 µM) in einer Erhöhung der mittleren ROS-Akkumulation in den CL4176-Nematoden und entsprachen damit der Wirkung von Naringenin (Abb. 46). Nach 6 h Hitzestress lag der mittlere Wert der relativen DCF-Fluoreszenz der 8-PN und 6-PN-Gruppe bei ca. dem 1,7- und 2-fachen Wert der Kontrolltiere. Zu demselben Zeitpunkt zeigten die Naringenin-Tiere ebenfalls eine fast 2-fache Erhöhung der mittleren DCF-Fluoreszenz der DMSO-Tiere. Die Unterschiede erwiesen sich jedoch nicht als statistisch signifikant.

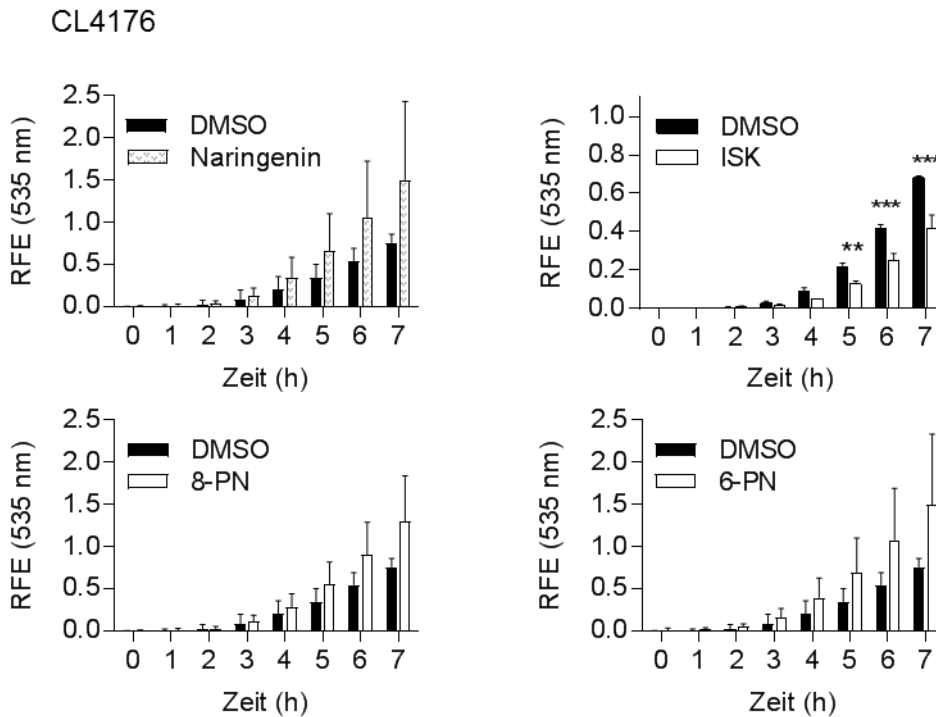


Abbildung 46: Einfluss einer Prenylierung und Methylierung von Naringenin auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im transgenen $A\beta_{1-42}$ -exprimierenden *C. elegans*-Stamm unter thermalem Stress.

Nematoden vom Stamm CL4176 wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit 100 μ M des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 25°C für 24 h. Nach einem Waschschrift (PBST) wurden die Tiere in eine 384-Wellplatte pipettiert und mit 50 μ M H_2DCF -DA versetzt. Die Fluoreszenz der Tiere wurde bei 37°C für 12 h im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 485 nm, Em.: 535 nm). Angegeben sind relative Mittelwerte \pm Standardabweichung bezogen auf den 8 h-Wert der Kontrolltiere, $n = 3$ (Naringenin: 8 Individuen/Versuch, ISK: 30 Individuen/Versuch), $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$ (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Naringenin-, 8-PN- und 6-PN-Daten wurden von Herrn Gabriel Schulz im Rahmen seiner Masterarbeit erstellt. DMSO = Dimethylsulfoxid, ISK = I Isosakuranetin, PN = Prenylnaringenin, RFE = relative Fluoreszenzeinheiten.

4.4.5 Modulation der ROS-Akkumulation im Wildtypen unter thermalem Stress

Die Wirkung einer Methylierung oder Prenylierung von Naringenin auf die ROS-Akkumulation im Wildtypen (N2) sind in Abb. 47 dargestellt. Die Behandlungen mit den Naringeninderivaten (100 μ M) führten, im Vergleich zur Kontrolle, zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der mittleren ROS-Konzentrationen in thermal gestressten *C. elegans*. Tiere, die mit ISK inkubiert wurden, zeigten jedoch niedrigere Mittelwerte der RFE ab 5 h, wohingegen die 8-PN- und 6-PN-Gruppe zu allen Zeitpunkten höhere mittlere RFE aufwiesen als die Kontrolltiere. Die Wirkung der prenylierten Derivate auf die ROS-Akkumulation in *C. elegans* entsprach damit der von Naringenin.

Wildtyp (N2)

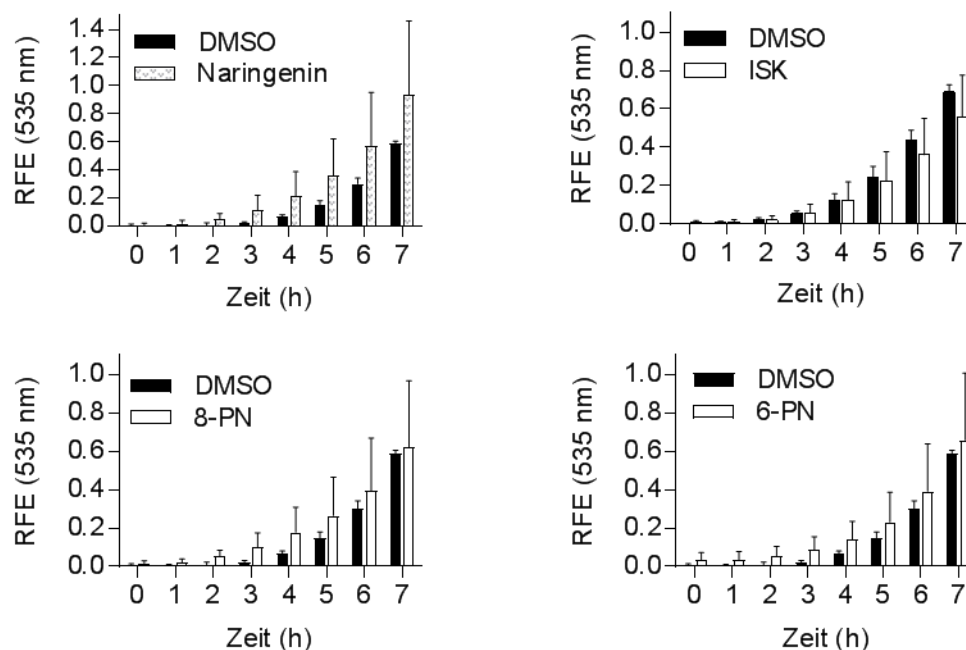


Abbildung 47: Einfluss einer Prenylierung und Methylierung von Naringenin auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im wildtypischen *C. elegans*-Stamm unter thermalem Stress.

Nematoden vom Stamm N2 wurden ab dem L4-Stadium für 48 h mit 100 μM des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO bei 20°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBST wurden die Tiere in eine 384-Wellplatte pipettiert und mit 50 μM $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ versetzt. Die Fluoreszenz der Tiere wurde bei 37°C für 12 h im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 485 nm, Em.: 535 nm). Angegeben sind relative Mittelwerte \pm Standardabweichung bezogen auf den 8 h-Wert der Kontrolltiere, $n = 3$ (8 Individuen/Versuch), (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Naringenin-, 8-PN- und 6-PN-Daten wurden von Herrn Gabriel Schulz im Rahmen seiner Masterarbeit erstellt. DMSO = Dimethylsulfoxid, ISK = Isosakuranetin, PN = Prenylnaringenin, RFE = relative Fluoreszenzeinheiten.

4.4.6 Modulation der thermale Stressresistenz im Wildtypen

Die Untersuchung der thermalen Stressresistenz in wildtypischen (N2) *C. elegans* soll Aufschluss über eine mögliche Assoziation zwischen der Toleranz gegenüber der $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität und der Stressantwort im Nematoden geben.

Die Behandlung mit Naringenin (100 μM) reduzierte, wie bereits in 4.2.6 gezeigt, statistisch signifikant ($p = 0,016$) die mittlere Überlebenszeit der Tiere unter thermalem Stress. Im Gegensatz dazu verlängerte die ISK-Inkubation (100 μM) die Lebensspanne in den Nematoden statistisch signifikant ($p = 0,024$) im Vergleich zur DMSO-Gruppe, wobei die mittlere Überlebenszeit um 10 % erhöht wurde. Die Behandlungen mit den prenylierten Naringeninderivaten (100 μM) hatten keinen Einfluss auf die Thermotoleranz in *C. elegans*. Die Ergebnisse sind in Abb. 48 zusammengefasst.

Wildtyp (N2)

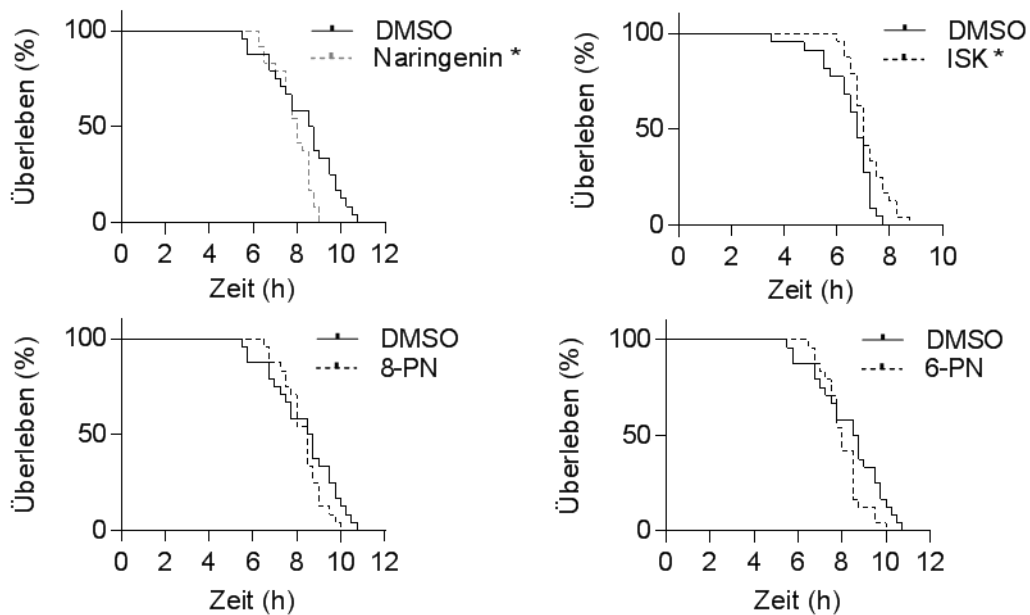


Abbildung 48: Einfluss einer Prenylierung und Methylierung von Naringenin auf das Überleben von wildtypischen *C. elegans* unter thermalem Stress.

Nematoden vom Stamm N2 wurden ab dem L4-Stadium für 48 h mit 100 μ M des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO bei 20°C inkubiert. Nach einem Waschschrift (PBST) wurden die Tiere einzeln in je eine Kavität mit 9 μ l PBS einer 384-Wellplatte pipettiert. Anschließend wurde die SYTOX Green-Lösung in einer Endkonzentration von 1 μ M hinzugegeben, die Platte versiegelt und die Fluoreszenz bei 37°C für 12 h im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 485 nm, Em.: 535nm). Aus den individuellen Fluoreszenzkurven wurden durch Festlegen von Schwellenwerten virtuelle Todeszeitpunkte berechnet. Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven, $n = 3$ (8 Individuen/Versuch), * $p \leq 0,05$ (Log-rank (Mantel-Cox) Test)) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. Die Naringenin-, 8-PN- und 6-PN-Daten wurden von Herrn Gabriel Schulz im Rahmen seiner Masterarbeit erstellt. DMSO = Dimethylsulfoxid, ISK = Isosakuranetin, PN = Prenylnaringenin.

4.4.7 Modulation der zellulären Lokalisation von GFP-gekoppelten Transkriptionsfaktoren

4.4.7.1 Modulation der zellulären DAF-16-Lokalisation (Kurzzeitinkubation)

Aus Vorversuchen ist bereits bekannt, dass eine Inkubation mit dem HOE (0,5 mg/ml), welches 8-PN und 6-PN enthält, die nukleäre Akkumulation von DAF-16 in *C. elegans* erhöhen kann (Anh. Abb. 65B). Daher wurde ebenfalls der Einfluss der Naringenin-derivate auf die zelluläre Lokalisation von DAF-16 mittels des transgenen Stammes TJ356 untersucht (Siehe 4.2.7.1, Abb. 28). Die einstündige Inkubationen mit Naringenin oder den Naringeninderivaten zeigten keinen Einfluss auf die DAF-16::GFP-Lokalisation in den transgenen Tieren (Abb. 49).

TJ356 (DAF-16::GFP)

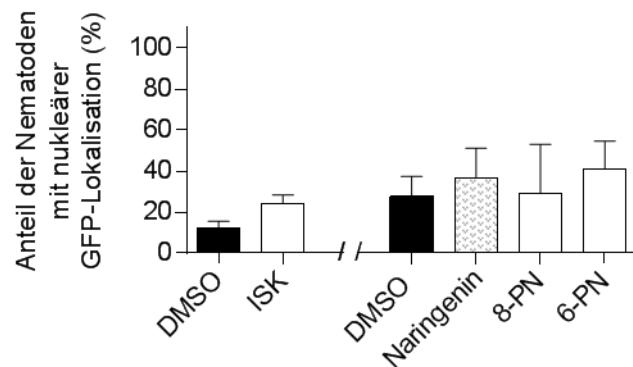


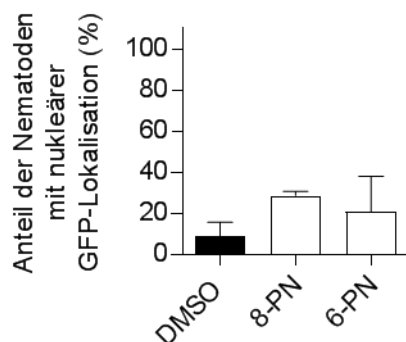
Abbildung 49: Einfluss einer Prenylierung und Methylierung von Naringenin auf die zelluläre DAF-16-Lokalisation in *C. elegans* (Kurzzeitinkubation).

Nematoden vom transgenen Stamm TJ356, die ein Fusionsprotein aus DAF-16 und GFP überexprimieren, wurden ab dem L4-Stadium für 1 h mit 100 μ M des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO inkubiert. Anschließend erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Tiere. Angegeben sind die Mittelwerte der Fraktion mit nukleärer GFP-Lokalisation \pm Standardabweichung, $n = 3-4$ (30 Individuen/Versuch), (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. Die Naringenin-, 8-PN- und 6-PN-Daten wurden von Herrn Gabriel Schulz im Rahmen seiner Masterarbeit erstellt. DMSO = Dimethylsulfoxid, GFP = grün fluoreszierendes Protein, ISK = Isosakuranetin, PN = Prenylnaringenin.

4.4.7.2 Modulation der zellulären DAF-16- und SKN-1-Lokalisation (Langzeitinkubation)

Da 8-PN und 6-PN eine protektive Wirkung gegenüber der $A\beta_{1-42}$ -Toxizität in *C. elegans* (CL4176) zeigten, wurde auch die zelluläre DAF-16- und SKN-1-Lokalisation in den transgenen Nematoden nach einer Langzeitinkubation mit den Naturstoffen, entsprechend dem $A\beta_{1-42}$ -Paralyseversuch, analysiert. Die Behandlung mit 8-PN oder 6-PN (100 μ M) zeigte hierbei keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation der Transkriptionsfaktoren in *C. elegans* (Abb. 50).

TJ356 (DAF-16::GFP)



LD001 (SKN-1::GFP)

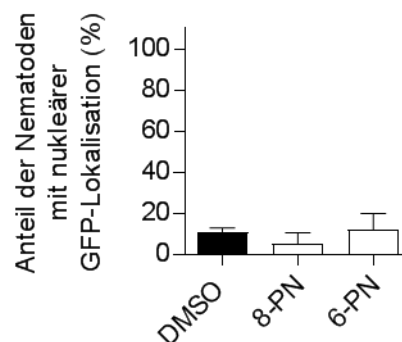


Abbildung 50: Einfluss einer Prenylierung von Naringenin auf die zelluläre DAF-16- und SKN-1-Lokalisation in *C. elegans* (Langzeitinkubation).

Nematoden vom transgenen Stamm TJ356 (links) oder LD001 (rechts), die ein DAF-16::GFP- oder SKN-1::GFP-Fusionsprotein exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit 100 μ M des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO bei 20°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Tiere. Angegeben sind die Mittelwerte der Fraktion mit nukleärer GFP-Lokalisation \pm Standardabweichung, $n = 3$ (30 Individuen/Versuch), (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. DMSO = Dimethylsulfoxid, GFP = grün fluoreszierendes Protein, PN = Prenylnaringenin.

4.4.8 Modulation der HSP-16.2::GFP-Expression

Um zu überprüfen, ob die prenylierten Naringeninderivate die A β ₁₋₄₂-induzierte Paralyse in *C. elegans* über eine Modulation der HSP-16.2-Expression verzögern, wurde die HSP-16.2::GFP-Expression in transgenen *C. elegans* nach einer Langzeitinkubation mit den Pflanzenstoffen untersucht. Die HSP-16.2::GFP- und die MYO-3::GFP-Expression der CL2070- bzw. PD4152-Tiere wurde im Fluoreszenzmessung im Plattenlesegerät bestimmt (Siehe 4.2.8, Abb. 32).

Die Behandlung mit 8-PN oder 6-PN (100 μ M) zeigte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die HSP-16.2::GFP-Expression in den CL2070-Nematoden unter basalen Bedingungen und unter Hitzestress (Abb. 51 links). Die MYO-3::GFP-Expression wurde ebenfalls nicht durch die Behandlung mit den prenylierten Naringeninderivaten in den PD4251-Nematoden beeinflusst (Abb. 51 rechts).

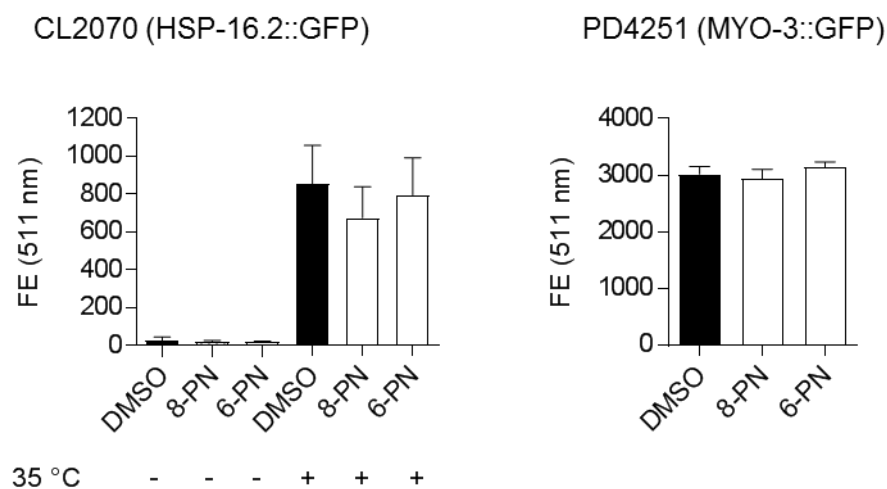


Abbildung 51: Einfluss einer Prenylierung von Naringenin auf die HSP-16.2::GFP-Expression in *C. elegans* (Langzeitinkubation).

Nematoden vom transgenen Stamm CL2070 (links), die ein Fusionsprotein aus HSP-16.2 und GFP exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit 100 μ M des Flavonols bzw. 0,1 % DMSO inkubiert. Für die HSP-16.2-Induktion erfolgte ein kurzer Hitzestress bei 35°C. Nematoden vom Stamm PD4251 (rechts), die ein Fusionsprotein aus MYO-3 und GFP exprimieren wurden analog zu den CL2070 Tieren behandelt. Nach einer 24-stündigen Erholungsphase wurden die Tiere beider Stämme in eine 384-Wellplate pipettiert und die Fluoreszenz im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 488 nm, Em.: 511 nm). Angegeben sind relative Mittelwerte \pm Standardabweichung, n = 3 (60 Individuen/Versuch), (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. DMSO = Dimethylsulfoxid, PN = Prenylnaringenin.

4.5 Modulation der A β -Toxizität durch Flavonoide in transgenen *C. elegans* unter *daf-16* RNAi-Bedingungen

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Protektion der Flavonoide gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* von der Aktivität des Transkriptionsfaktors DAF-16 abhängig ist. Ziel dabei war es herauszufinden, ob das methylierte Flavonoidderivat Q-3-M über den gleichen Signalweg wirkt wie die unsubstituierte Leitsubstanz Quercetin, da beide Naturstoffe zumindest tendenziell die nukleäre Akkumulation von DAF-16 in *C. elegans* induzierten. Da die zwei prenylierten Naringeninderivate eine potente Wirkungen in dem Morbus Alzheimer-Stamm zeigten und somit die Bioaktivität des unwirksamen Naringenin deutlich erhöhten, sollte außerdem untersucht werden, ob die Position der Prenyleinheit am A-Ring für den Wirkmechanismus entscheiden ist.

Folglich wurde der A β ₁₋₄₂-Toxizitätsversuch mit dem Morbus Alzheimer-Stamm CL4176 erneut unter *daf-16* RNAi-Bedingungen analysiert. Die Effizienz der Herunterregulation von *daf-16* mittels RNAi exprimierenden *E. coli*s (HT115) wurde zuvor am DAF-16::GFP-exprimierenden *C. elegans*-Stamm TJ356 analysiert. Die Behandlung der TJ356-Nematoden mit den *daf-16* RNAi-Bakterien führte zu einer 83%igen Reduktion der GFP-Fluoreszenz gegenüber den Tieren, die mit Leervektor-Bakterien gefüttert wurden (Anh. Abb. 58). Das Paralyseverhalten der CL4176-Nematoden wurde durch die Herunterregulation von *daf-16* nicht beeinflusst (Anh. Abb. 59).

4.5.1 Modulation der A β ₁₋₄₂-Toxizität durch Quercetin und Q-3-M unter *daf-16* RNAi-Bedingungen

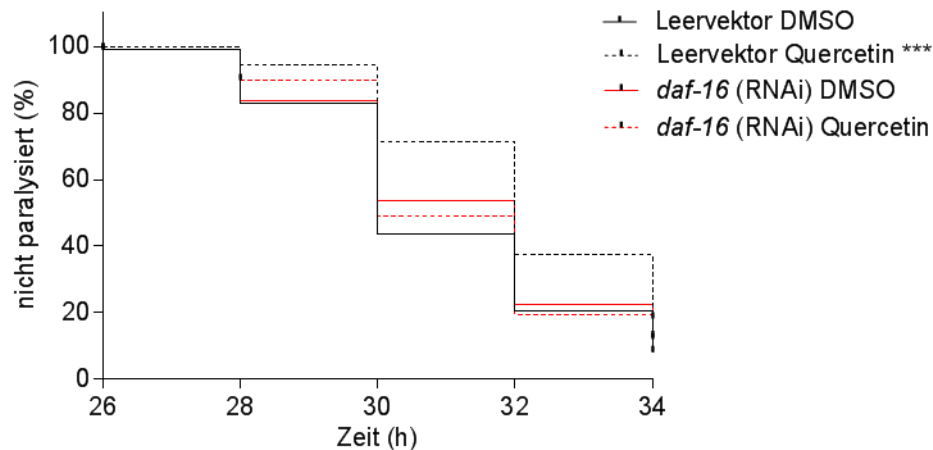
Die Paralysekurven der Behandlungsgruppen unter Leervektor- und *daf-16* RNAi-Bedingungen sind in Abb. 52 dargestellt. Die Quercetin- und Q-3-M-inkubierten Nematoden sind unter Leervektor-Bedingungen statistisch signifikant ($p < 0,001$ und $0,022$) längere beweglich als die DMSO-Tiere. Dabei verlängerte die Quercetin- und Q-3-M-Behandlung die mittlere Zeitspanne bis zum Eintritt der Paralyse um 1,2 und 0,5 Stunden gegenüber der Kontrolle (Tabelle 5). Unter *daf-16* RNAi-Bedingungen wurde zwischen den Behandlungsgruppen und der DMSO-Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied im Paralyseverhalten festgestellt.

Tabelle 5: Einfluss von Quercetin und Q-3-M auf die Paralyse im transgenen *C. elegans*-Stamm CL4176 unter *daf-16* RNAi Bedingungen.

Daf = Dauergen (*abnormal DAuer Formation*), DMSO = Dimethylsulfoxid, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether, SEM = Standardfehler.

Behandlung	mittlere Zeit (h) bis zum Eintreten der Paralyse \pm SEM	mediane Zeit (h) bis zum Eintreten der Paralyse \pm SEM	n	p-Wert (log-Rank)
leer 0,1 % DMSO	30,9 \pm 0,185	30 \pm 0,228	123	
leer 50 μ M Quercetin	32,1 \pm 0,163	32 \pm 0,252	126	<0,001
<i>daf-16</i> 0,1 % DMSO	31,2 \pm 0,191	32 \pm 0,253	119	
<i>daf-16</i> 50 μ M Quercetin	31,2 \pm 0,168	30 \pm 0,261	119	0,971
leer 0,1 % DMSO	31,1 \pm 0,162	30 \pm 0,225	164	
leer 50 μ M Q-3-M	31,6 \pm 0,161	32 \pm 0,240	161	0,022
<i>daf-16</i> 0,1 % DMSO	31,3 \pm 0,161	32 \pm 0,226	160	
<i>daf-16</i> 50 μ M Q-3-M	31,3 \pm 0,152	32 \pm 0,199	159	0,800

A.



B.

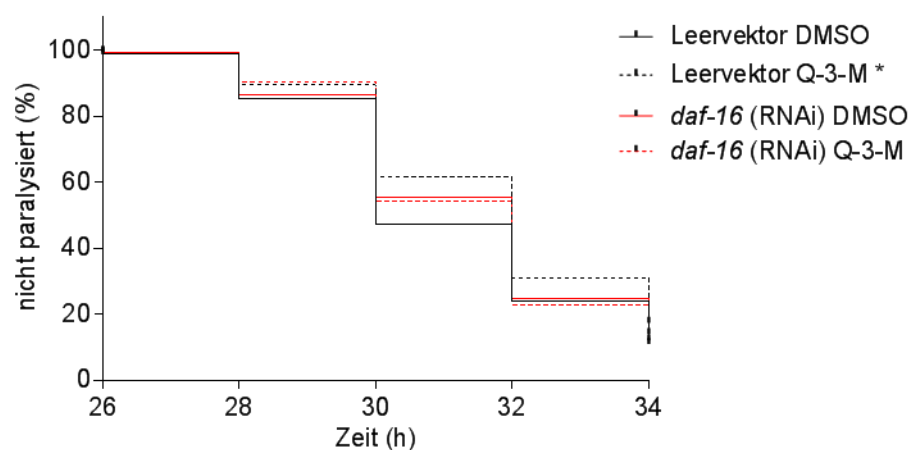


Abbildung 52: Einfluss von Quercetin und Q-3-M auf die A β ₁₋₄₂-induzierte Toxizität in *C. elegans* unter *daf-16* RNAi Bedingungen.

Nematoden vom transgenen Stamm CL4176, die das humane A β ₁₋₄₂-Peptid temperaturabhängig in den Körperwandmuskelzellen exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit 50 μ M des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO und IPTG-induzierten *daf-16*- oder leer-Vektor RNAi HT115 *E. coli*s (hitzeinaktiviert) bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 25°C für 24 h, wobei die Tiere zeitversetzt auf NGM-Platten überführt wurden. Mittels *touch-provoked movement* wurde das Eintreten der Paralyse festgestellt. Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven,

- A. Quercetin, n = 3 (40 Individuen/Versuch), ***p \leq 0,001 (Log-rank (Mantel-Cox) Test) im Vergleich zur Leervektor-DMSO-Gruppe,
 B. Q-3-M, n = 4 (40 Individuen/Versuch), *p \leq 0,05 (Log-rank (Mantel-Cox) Test) im Vergleich zur Leervektor-DMSO-Gruppe.

Daf = Dauergen (*abnormal DAuer Formation*), DMSO = Dimethylsulfoxid, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether, RNAi = Ribonukleinsäureinterferenz.

4.5.2 Modulation der A β ₁₋₄₂-Toxizität durch prenylierte Flavonoide unter *daf-16* RNAi-Bedingungen

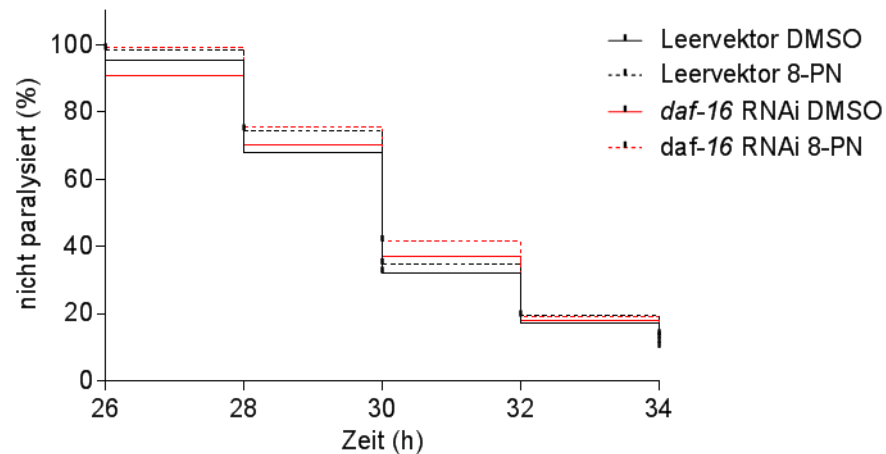
Bei der Untersuchung der prenylierten Naringeninderivaten zeigte sich, dass die 8-PN-Inkubation sowohl unter Leervektor- als auch unter *daf-16*-RNAi-Bedingungen die A β ₁₋₄₂-induzierten Paralyse in den transgenen Tieren nicht beeinflusste. Im Gegensatz dazu verzögert die 6-PN-Behandlung den Eintritt der Paralyse im CL4176-Stamm statistisch signifikant ($p = 0,027$) gegenüber DMSO-Inkubation unter Leervektor-Bedingungen. Im Vergleich zur Kontrolle, wurde die mittlere Zeitspanne bis zum Eintritt der Paralyse um 0,5 h durch die 6-PN-Inkubation verlängert (Tabelle 6). Unter *daf-16* RNAi-Bedingungen gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied im Paralyseverhalten zwischen der 6-PN und DMSO-Gruppe. Die Paralysekurven aller Behandlungsgruppen sind in Abb. 53 dargestellt.

Tabelle 6: Einfluss von prenylierten Naringeninderivaten auf die Paralyse im transgenen *C. elegans*-Stamm CL4176 unter *daf-16* RNAi Bedingungen.

Daf = Dauergen (*abnormal DAuer Formation*), DMSO = Dimethylsulfoxid, PN = Prenylnaringenin SEM = Standardfehler.

Behandlung	mittlere Zeit (h) bis zum Eintreten der Paralyse \pm SEM	mediane Zeit (h) bis zum Eintreten der Paralyse \pm SEM	n	p-Wert (log-Rank)
leer 0,1 % DMSO	30,3 \pm 0,179	30 \pm 0,207	159	
leer 100 μ M 8-PN	30,5 \pm 0,172	30 \pm 0,191	158	0,256
leer 100 μ M 6-PN	30,8 \pm 0,170	30 \pm 0,187	165	0,027
<i>daf-16</i> 0,1 % DMSO	30,3 \pm 0,190	30 \pm 0,228	162	
<i>daf-16</i> 100 μ M 8-PN	30,7 \pm 0,169	30 \pm 0,230	159	0,552
<i>daf-16</i> 100 μ M 6-PN	30,5 \pm 0,164	30 \pm 0,125	152	0,804

A.



B.

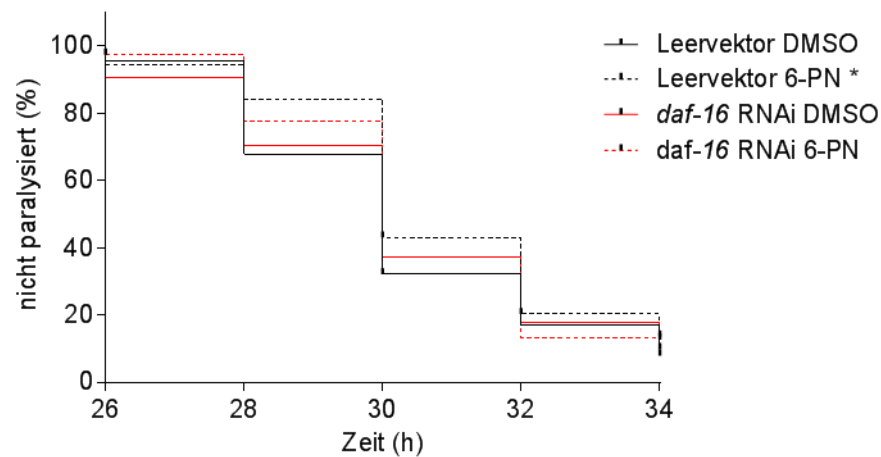


Abbildung 53: Einfluss von prenylierten Naringeninderivaten auf die A β ₁₋₄₂-induzierte Toxizität in *C. elegans* unter *daf-16* RNAi Bedingungen.

Nematoden vom transgenen Stamm CL4176, die das humane A β ₁₋₄₂-Peptid temperaturabhängig in den Körperwandmuskulazellen exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit 100 μ M des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO und IPTG-induzierten *daf-16*- oder leer-Vektor RNAi HT115 *E. coli*s (hitzeinaktiviert) bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 25°C für 24 h, wobei die Tiere zeitversetzt auf NGM-Platten überführt wurden. Mittels *touch-provoked movement* wurde das Eintreten der Paralyse festgestellt.

A. 8-PN,

B. 6-PN.

Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven, n = 4 (40 Individuen/Versuch), *p \leq 0,05 (Log-rank (Mantel-Cox) Test) im Vergleich zur Leervektor-DMSO-Gruppe. Die Daten wurden von Herrn Gabriel Schulz im Rahmen seiner Masterarbeit erstellt. *Daf* = Dauergen (*abnormal DAuer Formation*), DMSO = Dimethylsulfoxid, PN = Prenylnaringenin, RNAi = Ribonukleinsäureinterferenz.

4.6 Ergebnisübersicht

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche dieser Arbeit sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Ergebnisübersicht aller Experimente.

Experiment	AP ¹⁻⁴² Toxizität (CL4176)	AP-Plaques (CL2006)	ROS-Akkumulation (CL4176)	ROS-Akkumulation (N2)	antioxidative Kapazität <i>in vitro</i> - TEAC	thermale Stressresistenz (N2)	nukleäre DAF-16 Lokalisation (TJ356)	nukleäre SKN-1 Lokalisation (LD001)	HSP-16.2-Expression (C12070)	AP ¹⁻⁴² -Toxizität (RNAi) (CL4176)	
	64 h	48 h	64 h	48 h	<i>in vitro</i>	48 h	1 h	64 h	64 h	Leervektor	daf-16 (RNAi)
Substanz											
Inkubationsdauer											
Extrakte											
Hibiskus	↓↓↓										
Hopfen	↓↓↓										
Flavonole											
Quercetin	↓↓↓	↔	↔	↔	↑↑↑	↔	↑	↔	↔	↔	↓↓↓
Galangin	↓	↔	↔	↔	↑↑↑	↔	↔	↔	↔	↔	
Fisetin	↔	↔	↔	↓↓↓	↑↑↑	↔	↑	↔	↔	↔	
Morin	↓↓↓	↔	↔	↔	↑↑↑	↑	↑	↔	↔	↔	
Myricetin	↓	↔	↓	↓↓↓	↑↑↑	↔	↑↑	↔	↔	↔	
Flavanone											
Naringenin	↔	↔	↔	↔	↔	↓	↔	↔	↔	↔	
LQ	↓	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	
methylierte Quercetinderivate											
Q-3-M	↓↓	↔	↔	↔	↑↑↑	↔	↔	↔	↔	↔	↓
Tamarixetin	↔	↔	↔	↔	↑↑↑	↔	↔	↔	↔	↔	
Isorhamnetin	↔	↔	↔	↔	↑↑↑	↔	↑	↔	↔	↔	
methylierte und prenylierte Naringenderivate											
ISK	↔	↔	↓↓↓	↔	↔	↑	↔	↔	↔	↔	↔
8-FN	↓↓↓	↓↓↓	↔	↔	↑	↔	↔	↔	↔	↔	↔
6-FN	↓↓↓	↓	↔	↔	↑	↔	↔	↔	↔	↔	↓

* p ≤ 0,05

** p ≤ 0,01

*** p ≤ 0,001

n.s.

↔

↓ / ↑

↓↓ / ↑↑

↓↓↓ / ↑↑↑

↔

gegen die jeweilige Lösungsmittelkontrolle
 DAF = Dauergen (abnormal DAUER Formation), ISK = Isosakuranetin, LQ = Liquiritigenin, PN = Prenylnaringenin, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether, ROS = reaktive Sauerstoffspezien, SKN = SKIN/head, TEAC = Trolox Equivalent Antioxidative Capacity

5 Diskussion

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, bei der eine Akkumulation von A β -Peptiden im Gehirn eine Rolle. Der genaue molekulare Pathomechanismus ist nicht vollständig aufgeklärt, jedoch werden altersassoziierte Veränderungen, wie die Erhöhung des oxidativen Stress-Status und die Störung der Proteinhomöostase, als wichtige Risikofaktoren gesehen. Die Identifikation neuer Wirkstoffe, die die A β -Toxizität verringern, ist ein wichtiger Ansatz bei der Suche nach Präventions- und Behandlungsstrategien für Morbus Alzheimer. Aus verschiedenen Tiermodellen gibt es Hinweise darauf, dass sekundäre Pflanzenstoffe protektive Effekte gegenüber Morbus Alzheimer erzielen können. Der Nematode *C. elegans* stellt ein geeignetes Modellsystem dar, um die molekulare Wirkungsweise dieser Pflanzenstoffe zu untersuchen, da zum einen zentrale Signalwege, die an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sind, konserviert sind und zum anderen transgene Stämme zur Verfügung stehen, mit deren Hilfe es möglich ist zelluläre Prozesse auf molekularer Ebene zu untersuchen. Das Ziel der Arbeit war folglich das protektive Potential von zwei Pflanzenextrakten und den darin enthaltenen Flavonoiden gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* zu untersuchen. Neben Struktur-Wirkungsbeziehungen der Flavonoide sollte auch der zugrunde liegende molekulare Mechanismus in *C. elegans* erforscht werden.

5.1 Modulation der A β ₁₋₄₂-Toxizität und A β -Aggregation durch Flavonoide in *C. elegans*

Die A β ₁₋₄₂-Toxizität und A β -Aggregation wurde mittels der transgenen *C. elegans*-Stämme CL4176 und CL2006 untersucht. Nematoden vom CL4176-Stamm exprimieren das humane A β ₁₋₄₂-Peptid temperaturabhängig in den Körperwandmuskelzellen, wodurch es zu einer progressiven Paralyse des Körpers innerhalb von 24 bis 34 h kommt. Hingegen exprimieren die CL2006-Nematoden das A β ₁₋₄₂-Peptid konstitutiv in den Körperwandmuskelzellen und weisen folglich eine altersabhängige Paralyse und A β -Plaques-Ablagerung auf (Link 1995).

Extrakte

Die Behandlungen mit HE und HOE verzögerten den Eintritt der Paralyse in *C. elegans* (CL4176) in allen untersuchten Konzentrationen. In dieser Arbeit wurde erstmalig ein Hopfenextrakt in *C. elegans* untersucht. Interventionsstudien zeigen jedoch, dass eine orale Applikation von *Humulus lupulus*- oder *Humulus japonicus*-Extrakten die kognitiven Symptome in einem murinen Modell für Morbus Alzheimer reduzieren kann (Sasaoka *et al.* 2014, Park *et al.* 2017). Über die Wirkung von Hibiskus-Extrakten gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen sind bisher keine Studien bekannt. Wegen Schwankungen in der Extraktzusammensetzung, wurde in den anschließenden Versuchen die Wirkung von isolierten Naturstoffe in *C. elegans* untersucht. In den Extrakten sind zahlreiche Flavonoide enthalten, welchen zum Teil methyliert und prenyliert vorliegen. Daher wurden zuerst unsubstituierte Flavonoide und anschließend methylierte und prenylierte Flavonoidderivate untersucht.

Flavonoide

Zur Untersuchung der unsubstituierten Verbindungen wurden die zwei Flavonoidklassen Flavonole und Flavanone ausgewählt. Die Flavonole Fisetin, Galangin, Morin und Myricetin unterscheiden sich in Anzahl und Stellung der OH-Gruppen voneinander. Aus der Literatur ist bekannt, dass Quercetin in einer Konzentration von 100 μM die Stressresistenz und Lebensspanne von *C. elegans* erhöhen kann (Kampkötter *et al.* 2007b, Kampkötter *et al.* 2008, Saul *et al.* 2008, Saul *et al.* 2008, Pietsch *et al.* 2011). Daher wurde zuerst die Wirkung dieses Flavonols in unterschiedlichen Konzentrationen auf den Morbus Alzheimer-Stamm untersucht. Da eine 50 μM Quercetin-Inkubation die größte Protektion im $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizitätsassay zeigte, wurde diese Konzentration als Standard für die Flavonol-Inkubation der CL4176-Nematoden festgelegt. Bis auf Fisetin, zeigten alle untersuchten Flavonole eine Protektion gegenüber der $\text{A}\beta_{1-42}$ -induzierten Paralyse in *C. elegans*. Folglich lässt sich vermuten, dass Anzahl und Stellung der OH-Gruppen im B-Ring der Flavonole keinen Einfluss auf die Protektion gegenüber der $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität in *C. elegans* haben: Morin besitzt zwar die gleiche Anzahl an OH-Gruppen wie Quercetin, weist aber im Gegensatz dazu keine Catecholgruppe (3,4-Dihydroxyphenol) im B-Ring auf. Die Behandlung mit diesem Flavonol verlängerte die mittlere Paralysezeit der Nematoden gegenüber der Kontrollbehandlung in einem vergleichbaren Maße wie Quercetin. Die Galangin-Behandlung war genauso protektiv wie die Myricetin-Behandlung im CL4176-Stamm, obwohl große strukturelle Unterschiede im B-Ring bestehen: Galangin besitzt keine und Myricetin drei OH-Gruppen im B-Ring. Nur das Fehlen der OH-Gruppe an C5 im A-Ring bei Fisetin scheint die schützende Wirkung der Flavonole gegenüber der $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität in *C. elegans* aufzuheben (Abb. 54). Die Inkubationen mit den Flavonolen (50 μM) beeinflusste die $\text{A}\beta$ -Plaques-Anzahl in den CL2006-Nematoden im Vergleich mit der DMSO-Inkubation nicht. Bei der Quercetin-Gruppe war eine nichtsignifikante Reduktion von 28 % in der mittleren Plaques-Anzahl gegenüber der Kontrolle erkennbar. Aufgrund großer Schwankungen zwischen den Experimenten konnte jedoch keine statistisch signifikante Wirkung von Quercetin festgestellt werden. Eine Korrelation zwischen der Protektion gegenüber $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität durch die Flavonole und der Akkumulation von $\text{A}\beta$ -Ablagerungen in den Nematoden lässt sich daher nicht ableiten.

Aus der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass eine Quercetin-Gabe die $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität in *C. elegans* reduzieren kann: Jagota & Rajadas (2012) zeigten, dass eine Behandlung mit 73 μM Quercetin das prozentuale Überleben transgener Alzheimer-Tiere im Vergleich zur Kontrolle erhöhte. Eine ähnliche Wirkung wurde durch eine Behandlung mit 82 μM Morin erreicht (Jagota & Rajadas 2012). Des Weiteren schützte eine Inkubation mit 10 und 100 μM Quercetin vor der Hitzeschock (35°C)-induzierten Paralyse in diesen Nematoden (Regitz *et al.* 2014). Aufgrund erheblicher Unterschiede in den experimentellen Bedingungen lassen sich diese Studien jedoch nur eingeschränkt mit der vorliegenden Arbeit vergleichen. Die Autoren haben z. B. anstatt den hier verwendeten CL4176- den CL2006-Stamm, welcher eine altersabhängige $\text{A}\beta_{1-42}$ -Expression aufweist, ausgewählt. Eine Untersuchung der Wirkung von Naturstoffen auf die $\text{A}\beta_{1-42}$ -induzierte Paralyse unabhängig vom Alterungsprozess ist daher kaum möglich. In wildtypischen *C. elegans* wurde bereits gezeigt, dass eine Inkubation mit Quercetin verschiedenen Alterungsmarker reduzieren kann (Kampkötter *et al.* 2007b, Kampkötter *et al.* 2008, Saul *et al.* 2008, Saul *et al.* 2008, Pietsch *et al.* 2011). Zwar ist die Progression von Morbus Alzheimer auch im Menschen altersabhängig, jedoch ist es bei der Vielzahl von zellulären Prozessen, die während der Alterung stattfinden, kompliziert jene Mechanismen zu identifizieren, die das Fortschreiten der Erkrankung begünstigen. Daher bietet der CL4176-Stamm die Möglichkeit, die Toxizität der $\text{A}\beta_{1-42}$ -Peptide isoliert vom Alterungsprozess zu betrachten. Zudem könnte die von Regitz *et al.* (2014)

beschriebene Reduktion der Hitzeschock-induzierten Paralyserate durch die Quercetin-Behandlung auf eine erhöhte Stressresistenz der Tiere, welche ebenfalls durch das Flavonol beeinflusst werden kann, zurückzuführen zu sein (Kampkötter *et al.* 2007b). Andere Tiermodellstudien weisen jedoch ebenfalls auf ein protektives Potential des Naturstoffes hin: Eine dreimonatige intraperitoneale Quercetin-Injektion (25 mg/kg alle 48 h) erhöhte Lern- und Gedächtnisleistung von transgenen Alzheimer-Mäusen (3xTgAD) und senkte die A β -Plaque-Anzahl im Gehirn der Tiere gegenüber einer Kontroll-Injektion (Sabogal-Guáqueta *et al.* 2015). Des Weiteren verminderte eine Quercetin-Behandlung (1,31 mM) die neurotoxische Wirkung von A β ₁₋₄₂-Peptiden in transgenen *Drosophila melanogaster*-Männchen (Kong *et al.* 2016). In der Literatur existieren bisher keine Angaben über die Wirkung von Galangin in Tiermodellen für Morbus-Alzheimer. Im Fall von Myricetin weisen verschiedene Zellversuchen darauf hin, dass das Flavonol die A β -induzierte Zytotoxizität reduzieren kann (Shimmyo *et al.* 2008, Ono *et al.* 2012). Eine 10-monatige Myricetin-Gabe beeinflusste jedoch nicht die A β -Plaque-Anzahl im murinen Alzheimermodell (Tg2576) (Hamaguchi *et al.* 2009). Im Gegensatz dazu wurden für Morin und Fisetin bereits protektive Wirkungen in Nagermodellen für Morbus Alzheimer beobachtet: Du *et al.* (2016) zeigten, dass eine intraperitoneale Morin-Injektion (20 mg/kg Tag für zwölf Wochen) das räumliche Lern- und Erinnerungsvermögen von transgenen Mäusen (APPSwe/PS1dE9) gegenüber einer Kontrolllösung steigerte. Zudem reduzierte die Morin-Behandlung die Anzahl der A β -Plaque-Ablagerungen im Gehirn der Tiere. Die Fisetin-Fütterung senkte Defizite in Langzeitgedächtnis und Lernverhalten in zwei murinen Modellen für Morbus Alzheimer (APPSwe/PS1dE9 transgene Mäuse bzw. intracerebroventrikuläre Injektion von A β ₁₋₄₂ in C57BL/6N-Mäuse) und erhöhte die Leistung des Langzeitgedächtnisses von gesunden Mäusen (C57BL/6) (Maher *et al.* 2006, Currais *et al.* 2014, Ahmad *et al.* 2016). Jedoch wurde die A β -Aggregation im Gehirn der Alzheimer-Tieren nicht durch die Gabe des Flavonols beeinflusst (Currais *et al.* 2014). Im Gegensatz zu den Daten aus der Literatur schützte die Fisetin-Inkubation in der vorliegenden Arbeit nicht vor der A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans*. Dies könnte z. B. auf genetischen Unterschieden zwischen *C. elegans* und den Säugermodellen beruhen: In der Studie von Ahmad *et al.* (2016) inhibierte die Fisetin-Fütterung die BACE-Proteinexpression und die Tau-Hyperphosphorylierung in den Alzheimer-Mäusen (intracerebroventrikuläre Injektion von A β ₁₋₄₂ in C57BL/6N-Mäuse). Das BACE-Enzym spielt bei der Prozessierung von A β ₁₋₄₂-Peptiden aus dem APP eine Schlüsselrolle, wobei *C. elegans* kein entsprechendes Homolog für dieses Enzym besitzt. Eine Reduktion der A β ₁₋₄₂-Freisetzung aus dem Vorläuferpeptid durch Fisetin kann daher in dem *C. elegans*-Modell nicht nachgewiesen werden. Die Senkung der A β -Plaque-Anzahl im Gehirn der transgenen Mäuse durch die Quercetin- oder Morin-Behandlung scheint ebenfalls auf einer veränderten APP-Prozessierung zurückzuführen zu sein (Vepsäläinen *et al.* 2013, Sabogal-Guáqueta *et al.* 2015, Du *et al.* 2016). Des Weiteren kann die Tau-Pathologie mit dem *C. elegans* Stamm CL4176 nicht nachgewiesen werden, da der Nematode nur das *protein with tau-like repeats 1* (PTL-1) exprimiert, welches keine toxischen Fibrillen bildet (Alexander *et al.* 2014). Die Arbeit von Currais *et al.* (2014) weist darauf hin, dass Fisetin die neuroprotektive Wirkung in den Mäusen über die Aktivierung der extrazelluläres Signal-regulierten Kinase (ERK) und antioxidative Eigenschaften vermittelt. Beides stellen Mechanismen dar, die aufgrund evolutionärer Konservierung auch in *C. elegans* denkbar wären. Die ERK-Aktivierung trägt im Menschen zur synaptischen Plastizität im Hippocampus bei (Übersichtsartikel von Sweatt 2004). Dabei induziert der ERK-Signalweg die Expression eines Neuronen-spezifischen Aktivators der Cyclin-abhängigen Kinase 5 (Cdk5), welche bei der Entwicklung

des Zentralen Nervensystems eine Rolle spielt. Eine Dysregulation dieser Kinase im Gehirn ist mit dem Auftreten von Morbus Alzheimer assoziiert. Dabei wird diskutiert, dass eine Cdk5-Hyperaktivierung die Tau-Phosphorylierung vermittelt (Übersichtsartikel von Cruz & Tsai 2004). Die spezifische Wirkung von Fisetin im zentralen Nervensystem kann jedoch mit dem *C. elegans* Stamm CL4176, welcher die A β ₁₋₄₂-Peptide in den Körperwandmuskelzellen exprimiert, nicht nachgewiesen werden. Um dennoch eine neuronenspezifische Wirkung von Fisetin in *C. elegans* zu untersuchen, müssen in weitergehenden Versuchen Stämme mit entsprechender gewebespezifischen A β ₁₋₄₂-Expression analysiert werden.

Neben den Flavonolen wurden zwei Vertreter der Flavanone untersucht, die sich durch eine gesättigte C2-3-Verbindung und der fehlenden C3-OH-Gruppe im C-Ring von den Flavonolen unterscheiden. Eine Behandlung mit 50 oder 100 μ M Naringenin beeinflusste weder die A β ₁₋₄₂-induzierte Paralyse in den CL4176-Nematoden noch die Anzahl der A β -Plaques in den CL2006-Tieren. Im Gegensatz dazu verlängerte eine Inkubation mit 100 μ M LQ, nicht jedoch 50 μ M LQ, die mittlere Paralysezeit gegenüber der Kontrollgruppe, was auf eine Konzentrationsabhängigkeit schließen lässt. LQ unterscheidet sich von Naringenin durch das Fehlen der C5-OH-Gruppe. Interessanterweise bewirkte die Abwesenheit jener OH-Gruppe eine Aufhebung der protektiven Wirkung von Flavonolen (Fisetin) in den transgenen Nematoden. Die Sättigung der C2-3-Verbindung bewirkt demnach eine veränderte Reaktivität der Flavonoide in diesem Modell. Die LQ-Inkubationen veränderte jedoch nicht die mittlere Anzahl der ThS-positiven Ablagerungen in *C. elegans* (CL2006).

Über die Wirkung von Naringenin in *C. elegans*-Modellen für Morbus Alzheimer sind keine Daten aus der Literatur bekannt. Der Pflanzenstoff scheint jedoch die A β -Toxizität in Ratten zu reduzieren: Hierbei vermindert eine Fütterung mit dem Flavanon die kognitiven Symptome, die durch eine A β -Peptid-Injektion in den Hippocampus der Tiere verursacht wurden (Ghofrani *et al.* 2015). Bei dieser Untersuchung wurde jedoch eine andere A β -Peptide-Variante (40) als in dieser Arbeit verwendet. Das Flavanon LQ wurde bereits in *C. elegans* hinsichtlich der A β ₁₋₄₂-Toxizität untersucht, wobei die Behandlung mit dem Pflanzenstoff (50 μ g/ml bzw. 195 μ M) die Paralyse im CL4176-Stamm nicht beeinflusste (Link *et al.* 2015). Die Autoren zeigen außerdem, dass der Naturstoff in der hier eingesetzte Konzentration von 100 μ M (ca. 25 μ g/ml) die mittlere A β -Plaque-Anzahl in den CL2006-Nematoden nicht verändert. Erst ab einer höheren Konzentration von 195 μ M (50 μ g/ml) senkte LQ die ThS-positiven Ablagerung in den Nematoden (Link *et al.* 2015). Unterschiede zwischen dieser Untersuchung und den hier gefunden Ergebnissen sind möglicherweise auf die verschiedenen Behandlungsbedingungen zurückzuführen: Zum einen wurden lebende *E. coli*s als Nahrungsquelle und zum anderen eine kürzer Inkubationsdauer (36 h) und andere Synchronisationsmethode (Bleiche-Synchronisation) angewandt. Ergebnisse aus Zellkultur- und Tierstudien weisen jedoch auch auf eine Protektion von LQ gegenüber Morbus Alzheimer hin, z. B. erhöht eine Fütterung mit dem Naturstoff (zehn und 30 mg/kg pro Tag) die Gedächtnisleistung und senkte die die A β -Peptidablagerung in Hippocampus, Cortex und Amygdala der transgenen Alzheimer-Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe (Liu *et al.* 2009)

Methylierte Flavonoide

Methylierungen und Prenylierungen können die Bioverfügbarkeit und folglich die Bioaktivität von Flavonoiden verändern. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der methylierten Quercetinderivate

Q-3-M, Isorhamnetin (3'-O-Methylquercetin) und Tamarixetin (4'-O-Methylquercetin) in einer Konzentration von 50 μM auf die $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität in *C. elegans* (CL4176) untersucht. Während die Q-3-M- und Quercetin-Gruppen eine vergleichbare protektive Wirkung aufwiesen, beeinflusste die Isorhamnetin- und Tamarixetin-Behandlungen die $\text{A}\beta$ -Paralyse in *C. elegans* nicht. Hingegen ist aus der Literatur bekannt, dass Isorhamnetin (25 μM) die $\text{A}\beta$ -induzierter Zytotoxizität in SH-SY5Y Zellen reduzieren kann (Iida *et al.* 2015). Ein möglicher Grund für die Unterschiede zur vorliegenden Arbeit könnte darin bestehen, dass die Aufnahme in Zellkulturstudien weniger komplex sind als in einem Organismus, wodurch höhere intrazelluläre Substanzkonzentration erreicht werden können. Folglich lässt sich ableiten, dass eine Blockierung der freien OH-Gruppen an C3' und C4' die protektive Wirkung von Quercetin gegenüber $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität in *C. elegans* aufhebt. Die Behandlungen mit den methylierten Quercetinderivaten (50 μM) zeigte keinen Einfluss auf die $\text{A}\beta$ -Plaques-Ablagerungen im Nematoden. Die Q-3-M-Inkubation reduzierte zwar die mittlere Plaque-Anzahl pro Tier um 51 % im Vergleich zu den DMSO-Tiere, jedoch erwies sich der Unterscheid nach der statistisch Auswertung als nicht signifikant. Folglich besteht keine Assoziation zwischen der Protektion gegenüber der $\text{A}\beta_{1-42}$ -Paralyse durch die Q-3-M-Behandlung und der $\text{A}\beta$ -Plaques-Anzahl in den Nematoden.

Die abgeleiteten wirkungsbestimmenden Strukturmerkmale von Quercetin sind in Abb. 54 dargestellt.

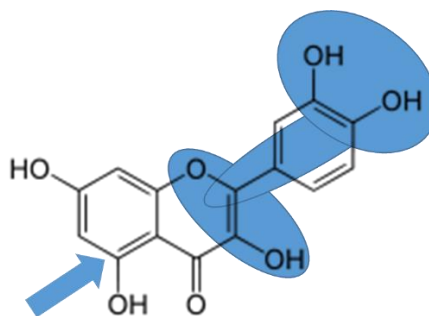


Abbildung 54: Modifikationen an der Struktur von Quercetin beeinflussen die Bioaktivität im Morbus Alzheimer-Stamm CL4176.

Für die protektive Wirkung von Flavonoiden gegenüber der $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität in *C. elegans* sind die C2-3-Doppelbindung und C3-OH-Gruppe wichtig, da Flavanone eine geringere Bioaktivität als Flavonole besitzen. Das Fehlen der C5-OH-Gruppe und eine Methylierung an C3' und C4' hebt die schützende Wirkung von Quercetin auf.

Prenylierte Flavonoide

Zur Untersuchung von prenylierten Flavonoidderivaten wurden die im HOE enthaltenden Naringeninderivate 8-PN und 6-PN untersucht. Die Behandlung mit 8-PN oder 6-PN (100 μM) reduzierte die $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität in den CL4176-Nematoden statistisch signifikant im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Zudem zeigten die beiden Naturstoffe bei einer Konzentration von 50 μM eine reduziert bzw. keine Protektion, was auf einen konzentrationsabhängigen Effekt vermuten lässt. Die prenylierten Naringeninderivaten verringerte auch die $\text{A}\beta$ -Aggregation in *C. elegans*: Die 8-PN- und 6-PN-Inkubation (100 μM) erhöhte den Anteil an Nematoden mit der geringsten Plaque-Anzahl (Klasse A: 0-15 Plaques/Tier) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. In diesem Fall korreliert die Schutzwirkung gegenüber der $\text{A}\beta_{1-42}$ -induzierten Paralyse mit einer reduzierten Plaque-Ablagerung in den Nematoden. Zum Vergleich wurde auch der Einfluss einer Methylierung von Naringenin in den Alzheimer-Stämmen untersucht. Die Behandlung mit ISK (50 und 100 μM), welches eine C4'-Methoxygruppe besitzt, beeinflusst weder die

A β_{1-42} -Toxizität in den CL4176-Tieren noch die A β -Aggregation in den CL2006-Nematoden. Folglich weisen die Ergebnisse darauf hin, dass eine Prenylierung, nicht jedoch eine Methylierung, die Bioaktivität von Naringenin in *C. elegans* erhöht (Abb. 55). Die Naringenin-derivate wurden erstmalig in einem *in vivo*-System für Morbus Alzheimer untersucht.

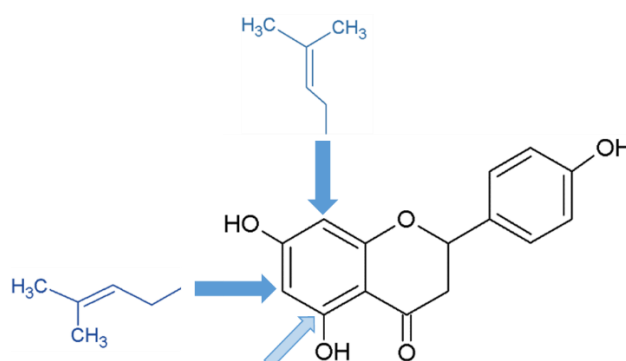


Abbildung 55: Modifizierungen von Naringenin erhöhen die protektive Wirkung gegenüber der A β_{1-42} -Toxizität in *C. elegans*.

Naringenin beeinflusste die A β_{1-42} -Toxizität in *C. elegans* nicht. Eine Prenylierung an C6 oder C8 erhöht die Bioaktivität des Flavanons. Das Fehlen der C5-OH-Gruppe von Naringenin bewirkt ebenfalls eine Reduktion der A β_{1-42} -induzierten Paralyse in *C. elegans*.

In der Gesamtbetrachtung zeigt sich somit, dass Flavonole *in vivo* ein hohes protektives Potential gegenüber A β_{1-42} -Toxizität aufweisen. Da bis auf Fisetin alle untersuchten Verbindungen das Einsetzen der Paralyse in den CL4176-Nematoden verzögerten, kann darauf geschlossen werden, dass weniger die Anzahl sondern vielmehr bestimmte Konstellationen der OH-Gruppen im Flavonolgerüst für diesen Effekt notwendig sind. Die protektive Wirkung der Flavonole im A β_{1-42} -Toxizitätsassay war jedoch nicht mit einer veränderten Plaque-Anzahl in *C. elegans* assoziiert. Am Beispiel der methylierten Quercetin-derivate wird deutlich, dass sterische Hinderungen die Wirkung von Flavonolen gegenüber der A β_{1-42} -Toxizität beeinträchtigen können. Bei den Flavanonen zeigte die Leitsubstanz Naringenin keinen Einfluss auf die A β_{1-42} -Toxizität in *C. elegans*. Auch hier können Veränderungen an der Grundstruktur, insbesondere durch Prenylierungen, die Bioaktivität von Naringenin maßgeblich beeinflussen. Prenylierungen an C6 und C8 von Naringenin führten nicht nur zu einer Protektion gegenüber der A β_{1-42} -induzierten Paralyse, sondern reduzierten auch die A β -Aggregation. Demnach lässt sich vermuten, dass 8-PN- und 6-PN über eine Interaktion mit der A β_{1-42} -Fibrillierung oder zellulären Degradationsmechanismen die A β_{1-42} -Toxizität in *C. elegans* verringern. Folglich stellen Flavonole und prenylierte Naringenin-derivate bioaktive Inhaltsstoffe der untersuchten Pflanzenextrakte HSE und HOE in *C. elegans* dar.

5.2 antioxidative Eigenschaften von Flavonoiden *in vitro* und *in vivo*

Die Pathogenese von Morbus Alzheimer ist mit dem vermehrten Auftreten von oxidativem Stress assoziiert, wobei dieser nicht nur an der Initiation der Erkrankung beteiligt ist, sondern auch deren Progression fördert (Übersichtartikel von Bhat *et al.* 2015). Bei Morbus Alzheimer-Patienten liegen gegenüber gleichaltrigen gesunden Probanden erhöhte Serumkonzentration von oxidativen Stress-Markern wie Malondialdehyd (MDA) und Carbonylproteinen vor (Greilberger *et al.* 2008). Des Weiteren zeigen *in vitro*-Studien, dass eine A β_{1-42} -Inkubation die ROS-Produktion in verschiedenen Zelllinien

erhöhen kann (Yatin *et al.* 1999, Abramov 2004). In dem *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer (CL4176) wurden nach A β ₁₋₄₂-Transgeninduktion erhöhte Carbonylproteinkonzentrationen gegenüber dem entsprechenden Kontrollstamm ohne A β ₁₋₄₂-Expression festgestellt (Drake 2003). Ähnliche Ergebnisse wurden in einem transgenen *C. elegans*-Stamm, welcher die A β ₁₋₄₂-Peptide in Neuronen exprimiert, gefunden (Yatin *et al.* 1999). Eine Reduktion von oxidativem Stress durch Flavonoide könnte daher die Protektion gegenüber der A β ₁₋₄₂-induzierten Paralyse vermitteln. Aus diesem Grund wurde das antioxidative Potential der ausgewählten Pflanzenstoffe *in vitro* mittels TEAC-Assay und *in vivo* mittels DCF-Assay untersucht. Ein kurzer Hitzestress dient zur Induktion der ROS-Bildung im Morbus Alzheimer-Stamm (CL4176) und im Wildtypen (N2). Die Behandlung der CL4176-Nematoden wurde wie in dem Paralyse-Versuch ab dem Ei-Stadium durchgeführt, während die Inkubation der N2-Tiere ab dem L4-Stadium erfolgte. Letzteres gilt als adäquates Behandlungsschema, um die antioxidative Wirkung von Polyphenole im Wildtypen zu untersuchen (Kampkötter *et al.* 2007a und b, Büchter *et al.* 2013). Aufgrund der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen ist die Effektstärke der Flavonoide im CL4176- und im N2-Stamm nicht direkt miteinander vergleichbar, sollte aber über das generelle antioxidative Potential der Flavonole in beiden Stämmen Aufschluss geben.

Flavonoide

Die radikalfangende Kapazität von Flavonolen *in vitro* steigt zum einen mit zunehmender Anzahl der OH-Gruppen am Phenylring und ist zum anderen von der Stellung der OH-Gruppen abhängig. Eine 3',4'-Catecholgruppe im B-Ring erhöht dabei die radikalfangenden Eigenschaften (Übersichtsartikel von Heim *et al.* 2002). Die hier erhobenen Daten mittels der TEAC-Methode stehen im Einklang mit dieser Theorie: Alle untersuchten Flavonole zeigten ab einer Konzentration von 10 μ M potente antioxidative Eigenschaften *in vitro*. Quercetin und Myricetin besitzen je eine vicinales Diol im B-Ring und unterscheiden sich nur in der Anzahl der OH-Gruppen voneinander. Folglich wies Myricetin mit den meisten OH-Gruppen im B-Ring (Pyrogallol-Gruppe) die stärkste antioxidative Kapazität auf, gefolgt von Quercetin und Fisetin. Morin zeigte eine statistisch signifikant schwächere Aktivität als Fisetin, was auf die Stellung der OH-Gruppen im B-Ring zurückzuführen ist. Galangin, welches keine OH-Gruppen im B-Ring besitzt, zeigt bei einer Konzentration von 10 μ M eine vergleichbare radikalfangende Wirkung wie Morin. Dies spricht gegen die Annahme, dass mit zunehmenden OH-Gruppen im B-Ring die antioxidative Kapazität der Flavonole zunimmt. Da das hier verwendete Produkt eine Reinheit von ≥ 95 % (HPLC) besitzt, könnte auch eine Verunreinigung durch andere Substanzen, wie Quercetin, zu der antioxidativen Kapazität von Galangin beigetragen haben. Zur Einschätzung der Effektstärke der Flavonole wurde das synthetische Vitamin E-Derivat Trolox als Referenz mitgeführt. Hierbei zeigte sich, dass 10 μ M Morin und Galangin die gleiche radikalfangende Aktivität wie Trolox besaßen, während Fisetin, Quercetin und Myricetin eine etwa 1,2- bis 6-fach höhere Potenz aufwiesen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Myricetin die 3-fache Effektstärke von dem Vitamin E-Derivat besitzt (Rice-Evans *et al.* 1996). In einer weiteren quantitativen Studie zur Struktur-Wirkungsbeziehung von Flavonoiden konnte gezeigt werden, dass Quercetin, Morin, Galangin und Flavonol die 4,4-, 2,6-, 1,2 bzw. 0,7-fache antioxidative Kapazität von Trolox aufweisen (Fatemi & Gholami Rostami 2013). Demzufolge bestätigen die Daten aus der Literatur den hier gefundenen Trend, dass mit steigender Anzahl der OH-Gruppen im B-Ring die antioxidative Kapazität der Flavonole zunimmt.

Die Untersuchung der Flavanone zeigte, dass Naringenin in einer Konzentration von 100 μM keine statistisch signifikante radikalfangende Kapazität aufwies. Im Gegensatz dazu reduzierte das Flavonol Galangin, welches keine OH-Gruppen im B-Ring besitzt, die ABTS-Absorption bereits ab einer Konzentration von 10 μM statistisch signifikant. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die C2-3-ungesättigten Verbindung und die benachbarte C3-OH-Gruppe für die basale radikalfangende Kapazität von Flavonoiden essentiell sind und OH-Gruppen im B-Ring diese Aktivität verstärken können (Rice-Evans *et al.* 1996). Die ausführliche Studie von Fatemi & Gholami Rostami (2013) bestätigt das: Die Flavanon-Grundstruktur wies keine und Naringenin die 0,2-fache antioxidative Aktivität von Trolox auf. Rafat *et al.* (1987) zeigten ebenfalls, dass Naringenin in einer Konzentration von 1 mM schwache $\cdot\text{OH}$ -fangende Eigenschaften besitzt. Differenzen in der antioxidativen Aktivität von Naringenin können sich aufgrund unterschiedlicher Inkubationsdauer und Substanzkonzentration zwischen den Studien ergeben. Das Flavonol LQ unterscheidet sich von Naringenin durch das Fehlen der OH-Gruppe an C5 im A-Ring. Dieser strukturelle Unterschied hatte keinen Einfluss auf die antioxidative Kapazität im TEAC Assay. Alrushaid *et al.* (2016) konnten zudem bestätigen, dass LQ keine antioxidativen Eigenschaften *in vitro* besitzt.

In der vorliegenden Arbeit spiegelte sich die potenten *in vitro*-Wirkungen der Flavonole nicht in *C. elegans* wider: Von den untersuchten Substanzen resultierte nur die Myricetin-Behandlung (50 μM) in einer geringfügigen Reduktion der intrazellulären ROS-Akkumulation im CL4176-Stamm gegenüber der DMSO-Inkubation. Eine Behandlung mit den anderen Flavonole (50 μM) beeinflusste die DCF-Fluoreszenz in den Alzheimer-Tieren nicht. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Behandlung mit Quercetin die ROS-Akkumulation in dem CL2006-Stamm gegenüber der Kontrolle um die Hälfte reduzieren kann (Smith & Luo 2003). Das Flavonol wurde jedoch in einer 6-fach höheren Konzentration (ca. 300 μM) eingesetzt, was die Vergleichbarkeit zur vorliegenden Arbeit limitiert. Demnach lässt sich schlussfolgern, dass die protektiven Wirkungen der Flavonole gegenüber der $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität wahrscheinlich nicht auf einer Reduktion der intrazellulären ROS-Konzentration in *C. elegans* basieren. Des Weiteren ist bekannt, dass eine 6-wöchige Quercetin-Fütterung die mRNA-Expression der Enzyme Hämoxygenase (HO)-1 und γ -Glutamacysteinligase (GCS) im Gehirn von Mäusen (C57BL/6) nicht beeinflusst, was ebenfalls darauf schließen lässt, dass das Flavonol die Protektion gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen wahrscheinlich nicht über antioxidative Mechanismen vermittelt (Huebbe *et al.* 2010).

Im Wildtypen (N2) führte die Myricetin-Behandlung (100 μM) im Vergleich zur DMSO-Inkubation ebenfalls zu einer Reduktion der intrazellulären ROS-Akkumulation. Dieses Ergebnis lässt auf eine generelle antioxidative Wirkung von Myricetin in *C. elegans* schließen, welche sowohl von Grünz *et al.* (2012) als auch von Büchter *et al.* (2013) bereits gezeigt wurde. Die Fisetin-behandelten (100 μM) Tiere (N2) wiesen ebenfalls geringere ROS-Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe auf. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Daten von Kampkötter *et al.* (2007a). Die Quercetin-, Galangin- und Morin-Inkubationen (100 μM) beeinflussten die ROS-Akkumulation im Wildtypen nicht. Während bisher keine Daten zur antioxidative Wirkung von Galangin und Morin in *C. elegans* publiziert sind, berichten zwei Autoren von einer Reduktion der intrazellulären ROS-Konzentration durch eine Quercetin-Behandlung in den Nematoden (Kampkötter *et al.* 2007b, Grünz *et al.* 2012). Die Studien aus Literatur sind jedoch aufgrund unterschiedlicher Inkubationsbedingungen nur bedingt mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar; z.B. wurde ein festes anstatt flüssiges Behandlungsmediums bei Grünz *et al.* (2012) und

lebender anstatt hitzeinaktivierter *E. coli*s als Nahrungsquelle bei Kampkötter *et al.* (2007b) verwendet. Die Verwendung von lebenden Bakterien kann z.B. die Wirkung von Quercetin im Nematoden maßgeblich beeinflussen, da zum einen bioaktive Bakterienmetaboliten und zum anderen die inherente antimikrobielle Aktivität des Naturstoffes protektive Wirkungen in *C. elegans* erzielen könnten (Rauha *et al.* 2000, Konishi 2005, Zhou & Sadik 2008, Win *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014). Die hier gefundenen Differenz zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-Daten könnte ebenfalls auf veränderte Eigenschaften von Flavonolen in unterschiedlichen Lösungssystemen zurückzuführen sein: Während die *in vitro*-antioxidative Kapazität der Flavonole mittels TEAC-Assay in einer ethanolischen Lösung gemessen wurde, wurde die ROS-Akkumulation im Intrazellularraum der Tiere analysiert. Folglich deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die antioxidative Kapazität von Flavonolen *in vivo* wesentlich komplexer ist als *in vitro*. Aufgrund der engen Strukturverwandtschaft von Fisetin, Myricetin und Quercetin (Catechol-Gruppe im B-Ring) ist es verwunderlich, dass Quercetin als einzige der drei Substanzen keine antioxidative Wirkung im Nematoden zeigt. Die lässt darauf schließen, dass selbst kleinste Veränderungen in der Struktur von Flavonolen die antioxidative Wirkung in *C. elegans* maßgeblich beeinflussen können. Dabei scheinen Flavonole im Organismus wahrscheinlich weniger über radikalfangende sondern mehr über indirekte antioxidative Mechanismen, wie die Induktion von antioxidativen Enzymen, Adduktbildung mit Proteinen (Chinon-GSH) oder Hemmung von Enzymen (z. B. Xanthinoxidase), zu wirken (Hanasaki *et al.* 1994, Pereira *et al.* 2013).

Die Behandlung mit den Flavanonen (100 µM) beeinflusste nicht die intrazelluläre ROS-Konzentration in den CL4176-Nematoden. Daher ist zu vermuten, dass die Reduktion der Aβ₁₋₄₂-Toxizität durch LQ nicht auf einer antioxidativen Wirkung in *C. elegans* zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu senkte eine Vorinkubation mit LQ (0,2-2 µM) die Aβ₂₅₋₃₅-induzierte ROS-Akkumulation in hippocampalen Neuronen von Ratten (Liu *et al.* 2009). In dieser Studie verhinderte die LQ-Inkubation ebenfalls den Aβ₂₅₋₃₅-induzierte intrazellulären Ca²⁺-Einstrom. Jedoch ist einerseits bekannt, dass eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration die ROS-Bildung fördert und andererseits, dass eine Erhöhung der ROS-Akkumulation einen Ca²⁺-Einstrom in die Zelle induzieren kann (Ekinci *et al.* 2000, Übersichtartikel von Barnham *et al.* 2004). Aus diesem Grund kann nicht klar differenziert werden, ob die Reduktion der ROS-Akkumulation in den hippocampalen Neuronen ein sekundärer Effekt war oder tatsächlich auf der antioxidativen Aktivität von LQ beruhte (Liu *et al.* 2009). Ein vergleichbarer Effekt wurde auch bei einer LQ-Inkubation (50 µM) von Glutamat-gestressten murinen Hippocampuszellen gefunden (HT22): Die LQ-Vorinkubation reduzierte den Glutamat-induzierten Ca²⁺-Einstrom und die ROS-Akkumulation in den Zellen (Yang *et al.* 2013). In der vorliegenden Arbeit beeinflusste die Inkubation mit den Flavanonen (100 µM) die intrazelluläre ROS-Konzentration in wildtypischen Nematoden nicht. In den Versuchen von Grünz *et al.* (2012) zeigte die Naringenin-Behandlung (100 µM) ebenfalls keine signifikante Wirkung auf die mitochondriale ROS-Akkumulation in *C. elegans*. Daher ist anzunehmen, dass die untersuchten Flavanone keine antioxidative Wirkung in *C. elegans* aufweisen.

Aus Versuchen mit Nagermodellen sind für alle hier untersuchten Flavonole antioxidative Wirkungen bekannt (Sahu *et al.* 2014, Shu *et al.* 2014, Li *et al.* 2016, Kaltalioglu & Coskun-Cevher 2016, Wu *et al.* 2016). Zwei Studien mit Ratten-Modellen für Morbus Alzheimer zeigten ebenfalls, dass eine Naringenin-Behandlung die Lipidperoxidation im Hippocampus der Tiere im Vergleich zu einer Kontrollbehandlung senken kann (Khan *et al.* 2012, Ghofrani *et al.* 2015). Da Tierversuche mit großem

zeitlichem und monetärem Aufwand verbunden sind, wird der Vergleich von mehreren Testsubstanzen in einer Studie rar. Jedoch unterscheiden sich die Einzeluntersuchungen stark in Applikationsart und Behandlungsdauer der Pflanzenstoffe. Deshalb wurden in dieser Arbeit alle Naturstoffe unter standardisierten Bedingungen in *C. elegans* untersucht. Weiterhin wurde in den hier angegebenen Tierversuchen die Interaktion von Mikrobioms und Flavonoiden nicht beachtet. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit hitzeinaktivierte Bakterien verwendet. Nicht zuletzt kann auch die Art des induzierten oxidativen Stresses für die Wirksamkeit der Flavonole entscheidend sein. In der vorliegenden Arbeit wurde thermaler Stress appliziert, wobei die ROS-Spiegel unter basalen Bedingungen unter der Nachweisgrenze lagen. Die Etablierung einer Methode zur Messung der basalen ROS-Konzentration in *C. elegans* zur besseren Einschätzung der antioxidativen Kapazität von Naturstoffen ist daher wichtig.

Methylierte Flavonoide

Methylierungen von Quercetin stellen sterische Behinderungen bei der Hydrogen- und Elektronen-Übertragung auf Radikale dar. Die methylierten Quercetinderivaten sollten daher *in vitro* eine geringere antioxidative Kapazität aufweisen als die Leitsubstanz (Heim *et al.* 2002). Die Analyse mittels TEAC-Assays bestätigt dies: Die untersuchten Verbindungen wiesen ab einer Konzentration von 10 μM statistisch signifikante radikalfangende Wirkungen auf, jedoch zeigten Q-3-M und Tamarixetin eine sechs- und Isorhamnetin zehnfach geringere Effektstärke als Quercetin. Folglich ergibt sich, dass sowohl die C3'-OH als auch die C4'-OH-Gruppe für die starke radikalfangende Kapazität von Quercetin essentiell sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass Tamarixetin und Isorhamnetin eine zwei bis drei Mal geringere antioxidative Kapazität gegenüber ABTS-Radikalen aufweisen Quercetin (Lemańska *et al.* 2004, Dueñas *et al.* 2010, Dueñas *et al.* 2011). Die antioxidative Kapazität von Q-3-M gegenüber DPPH• (2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) war ca. 0,4-fach niedriger als die von Quercetin (Dok-Go *et al.* 2003). Hingegen zeigte jenes methylierte Quercetinderivate im Vergleich zu Quercetin eine viermal schwächere Potenz gegenüber $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Hu *et al.* 1995).

Die Inkubation mit Quercetin oder den methylierten Derivaten beeinflusste die ROS-Akkumulation weder in dem Alzheimer-Nematoden (CL4176) noch in den wildtypischen Tieren. Dies lässt vermuten, dass die Quercetin- und Q-3-M-induzierte Protektion gegenüber der $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität nicht über antioxidative Mechanismen vermittelt wird. 3'-O- und 4'-O-Methylquercetin wurden bereits vergleichend in wildtypischen *C. elegans* untersucht. Hierbei steigerten die Naturstoffe nicht nur die oxidative Stressresistenz der Tiere, sondern reduzierten auch die Konzentration von Carbonylproteinen. Die methylierten Derivate zeigten jedoch eine geringere biologische Aktivität als Quercetin (Surco-Laos *et al.* 2011). Im Unterscheid zu der Studien von Surco-Laos *et al.* (2011) wurde in der vorliegenden Arbeit zwei- bis viermal geringere Konzentrationen der Naturstoffe eingesetzt. Wie bereits in anderen *C. elegans*-Studien mit Quercetin, bestehen auch hier grundlegende experimentelle Unterschiede in der Haltung der Tiere und Substanzapplikation gegenüber der vorliegenden Arbeit.

Prenylierte Flavonoide

Die Leitsubstanz Naringenin und das methylierte Derivat ISK zeigten selbst bei einer Konzentration von 100 μM keine antioxidativen Eigenschaften *in vitro*. Im Gegensatz dazu erhöhte eine Prenylierung an Position C6 oder C8 die radikalfangende Kapazität von Naringenin. Die antioxidative Wirkung von 100

μM 8-PN und 6-PN war jedoch relativ niedrig, da Trolox bereits ab einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ einen vergleichbaren Effekt zeigte. Im *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC)-Assay wurden ebenfalls radikalfangende Eigenschaften der prenylierten Naringeninverbindungen festgestellt (van Hoyweghen *et al.* 2010). Zudem reduzierten $25 \mu\text{M}$ 8-PN und 6-PN die Cu^{2+} -induzierte LDL-Oxidation, währen Naringenin einen prooxidativen Trend zeigte (Miranda *et al.* 2000).

Im *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer (CL4176) zeigte die Behandlungen mit Naringenin oder den prenylierten Derivaten ($100 \mu\text{M}$) keinen Einfluss auf die intrazelluläre ROS-Akkumulation. Hingegen reduzierte das methylierte Derivat ISK ($100 \mu\text{M}$) die ROS-Akkumulation statistisch signifikant ab 4 h. Die Behandlung der wildtypischen Tiere mit den Naturstoffen resultierte in keiner statistisch signifikanten Veränderung der DCF-Fluoreszenz gegenüber der Kontrolle. Dies lässt erkennen, dass die antioxidative Wirkung von ISK spezifisch in den $\text{A}\beta_{1-42}$ -exprimierenden Nematoden auftrat. Interessanterweise beeinflusste die Behandlung mit dem methylierten Naringeninderivat nicht den Paralyseeintritt im CL4176-Stamm. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die antioxidative Wirkung von Substanzen nicht *per se* vor der $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität in *C. elegans* schützt. Aus Zellkulturstudien sind antioxidative Wirkungen von zwei Naringeninderivaten bekannt: Zum einen reduzierte eine ISK-Vorinkubation ($0,8$ und $50 \mu\text{M}$) die H_2O_2 -induzierten ROS-Spiegel in PC12-Zellen (Hwang & Yen 2009) und zum anderen senkte eine Inkubation mit 8-PN ($0,01$ bis $20 \mu\text{M}$) die ROS-Konzentration in MCF-7-Zellen (Blanquer-Rossello *et al.* 2013). Dies zeigt im Fall von 8-PN, dass die Wirkung von Naturstoffen in einer Zelllinie nicht unbedingt die Wirkung in einem Modellorganismus widerspiegelt.

In der Gesamtbetrachtung zeigt sich, dass die Protektion gegenüber der $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität durch die ausgewählten Flavonoide nicht mit einer antioxidativen Wirkung in *C. elegans* korrelierte. Des Weiteren wurde kein Unterschied in der DCF-Fluoreszenz zwischen dem $\text{A}\beta_{1-42}$ -exprimierenden Stamm CL4176 und dem Kontrollstamm CL802, welcher keine $\text{A}\beta_{1-42}$ -Peptide exprimiert, festgestellt. Smith & Luo (2003) zeigten zuvor, dass die $\text{A}\beta_{1-42}$ -Expression in *C. elegans* die intrazelluläre ROS-Akkumulation erhöhen kann. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit, wurde jedoch der konstitutiv $\text{A}\beta_{1-42}$ -exprimierende Stamm CL2006 mit dem Wildtypen (N2) verglichen. Diese beiden Stämme unterscheiden sich jedoch nicht nur in der $\text{A}\beta_{1-42}$ -Expression, sondern auch in anderen genetischen Merkmalen, wie dem *rol-6*-Gen, was u. a. zu einer ungleichen Entwicklungsdauer führt. Unterschiede in der DCF-Fluoreszenz zwischen dem Wildtypen und dem CL2006-Stamm sind daher nicht zwingendermaaen auf die $\text{A}\beta_{1-42}$ -Expression zurückzuführen.

Eine Limitation der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass die ROS-Akkumulation im gesamten Körper der Nematoden gemessen wurde. Es erscheint jedoch möglich, dass oxidativer Stress nur vermehrt in den Zellen auftritt, in denen die $\text{A}\beta$ -Peptide exprimiert werden. Smith *et al.* (1991) zeigten z. B. dass Morbus Alzheimer-Patienten *post mortem* höhere Carbonyl-Proteinkonzentrationen im Frontallappen aufwiesen als gesunde gleichaltrige Probanden. Zwischen den Untersuchungsgruppen wurden jedoch keine Unterschiede im oxidativen Status des Occipitallappens, welcher weniger von der Neurodegeneration betroffen war, festgestellt. Ähnliche Ergebnisse fanden Hensley *et al.* (1995): Hierbei wiesen Gehirnareale mit einer großen $\text{A}\beta$ -Peptiddichte die höchsten oxidativen Stress-Spiegel auf. Die lokale ROS-Induktion durch die $\text{A}\beta_{1-42}$ -Peptide könnten folglich durch die Messung der gesamten ROS-Spiegel von *C. elegans* verdeckt werden. Mittels Carbonylproteinbestimmung konnte

Drake (2003) jedoch zeigen, dass der CL4176-Stamm einen erhöhten oxidativen Stress-Status nach der A β ₁₋₄₂-Induktion aufwies als ein entsprechender Kontrollstamm. Da der Antikörper-basierter Nachweis von Carbonylproteinen über eine höhere Sensitivität als der ROS-Nachweis mittels DCF-Sonde verfügt, ist es möglich, dass kleine Unterschiede im ROS-Status in der vorliegenden Arbeit nicht detektiert werden konnten.

Zwei der untersuchte Flavonoide zeigten dennoch ein antioxidatives Potential in dem Alzheimer-Stamm: Myricetin, welches die ROS-Spiegel generell in *C. elegans* senkte, und ISK, welches die DCF-Fluoreszenz spezifisch im Alzheimer-Stamm reduzierte. Trotz des starken antioxidativen Potentials von ISK, schützte die Substanz nicht vor der A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans*. Dies verdeutlicht, dass eine Reduktion von oxidativem Stress in *C. elegans* nicht notwendigerweise mit einem Schutz gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität assoziiert ist. Ein ähnliches Phänomen wurde in dem transgenen *C. elegans*-Modell für Chorea Huntington beobachtet. Die neurodegenerative Erkrankung ist in vielen Aspekten ähnlich zu Morbus Alzheimer: in dem Gehirn von Chorea Huntington-Patienten kommt es zu Amyloid-ähnlichen Ablagerungen, die durch eine Mutation des Huntington-Proteins verursacht werden. Des Weiteren sind diese Ablagerungen mit erhöhten Spiegeln von oxidativen Stress-Markern in den betroffenen Zellen assoziiert (Browne *et al.* 1997). Auch die transgenen Huntington-Nematoden zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress als der Wildtyp. Eine zusätzliche Steigerung des oxidativen Stresses durch eine *sod-2*-Mutation oder eine Behandlung mit dem Antioxidans Vitamin C beeinflusste jedoch nicht die Toxizität des Huntington-ähnlichen Proteins in *C. elegans* (Machiela *et al.* 2016). Des Weiteren zeigen auch Humanstudien, dass das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken nicht durch die Einnahme von Vitamin C- oder E-Supplementen reduziert werden kann (Morris *et al.* 2002, Luchsinger *et al.* 2003). Schließlich weisen die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit und der Literatur darauf hin, dass die A β ₁₋₄₂-Toxizität wahrscheinlich nicht alleine durch oxidativen Stress verursacht wird und dass eine Reduktion von oxidativem Stress nicht notwendigerweise vor der Erkrankung schützt.

5.3 Einfluss von Flavonoiden auf die Stressresistenz in *C. elegans*

Aus der Literatur geht hervor, dass zelluläre Mechanismen der Stressantwort vor der A β ₁₋₄₂-induzierten Paralyse in *C. elegans* schützen können (Link 2006, Wu *et al.* 2010). Aus diesem Grund wurde der Einfluss der ausgewählten Flavonoide auf die thermale Stressresistenz im Nematoden (N2) untersucht.

Flavonoide

Drei von den hier analysierten Flavonolen wurden bereits in *C. elegans* hinsichtlich der Modulation der Thermotoleranz untersucht: Eine Behandlung mit Quercetin und Fisetin (100 μ M) verlängerte das Überleben unter thermalem Stress im Wildtypen um ca. 12 und 6 % gegenüber der Kontrolle, wohingegen die 100 μ M Myricetin-Inkubation ineffektiv war (Kampkötter *et al.* 2007a und b, Büchter *et al.* 2013). Die Versuche von Pietsch *et al.* (2009) und Surco-Laos *et al.* (2011) zeigen ebenfalls, dass eine 200 μ M Quercetin-Behandlung die Überlebensrate der N2-Tiere unter thermalem Stress erhöhte. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden. Von den untersuchten Flavonolen resultierte nur die Inkubation mit 100 μ M Morin in einer erhöhten thermalen Stresstoleranz in *C. elegans*. Eine mögliche Ursache für die ausbleibende protektive Wirkung von Quercetin und Fisetin könnten Unterschiede in den Inkubationsbedingungen sein. Die größte Differenz ergibt sich in der Verwendung zwischen lebenden und hitzeinaktivierten OP50-1 *E.colis*. In *C. elegans* führt eine

Fütterung mit nicht proliferierenden *E. colis* zu einer Erhöhung der thermalen Stressresistenz und Lebensspanne (Garing *et al.* 2002, Gomez *et al.* 2012). Dies weist darauf hin, dass die protektive Wirkung von Flavonolen in *C. elegans* auch über eine Inhibition des Bakterienwachstums- bzw. -Metabolismus vermittelt werden können.

Die Inkubation mit der Leitsubstanz Naringenin (100 μ M) führte zu einer statistisch signifikanten Verkürzung der mittleren Überlebenszeit von *C. elegans* unter thermalem Stress. Interessanterweise normalisierte das Fehlen der C5-OH-Gruppe im Fall von LQ die thermale Stresstoleranz der Tiere auf das Niveau der DMSO-Kontrollgruppe. Wie bereits im A β ₁₋₄₂-Toxizitätsassay wird deutlich, dass bereits eine kleinste strukturelle Veränderung am A-Ring die Bioaktivität von Flavanonen verändern kann. Aus der Literatur sind keine Daten über die Modulation der Thermotoleranz in *C. elegans* durch die beiden Naturstoffe bekannt.

Methylierte Flavonoide

Eine Methylierung an der Grundstruktur von Quercetin hatte keinen Einfluss auf die thermale Stressresistenz von *C. elegans*: Die Inkubationen mit den Derivaten (100 μ M) veränderten die Überlebenskurve der Nematoden im Vergleich zur Kontrolle nicht. Im Gegensatz dazu konnten Surco-Laos *et al.* (2011) zeigen, eine Kurzzeit- und Langezeitinkubation mit 200 μ M Isorhamnetin oder Tamarixetin die Überlebensrate der Nematoden nach 8 h thermalem Stress erhöhte. Die Effektstärke der methylierten Derivate war dabei geringer als die von Quercetin. Im Vergleich mit der vorliegenden Arbeit haben die Autoren jedoch nicht nur eine zweifach höhere Substanzkonzentration sondern auch lebende OP50 *E. colis* benutzt, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte.

Prenylierte Flavonoide

Methylierungen und Prenylierungen von Naringenin hatten einen grundlegenden Einfluss auf die thermale Stressresistenz der N2-Tiere: Während eine Naringenin-Inkubation (100 μ M) die Überlebenszeit von *C. elegans* im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle verkürzte, erhöhte die ISK-Behandlung (100 μ M) die Thermotoleranz der Tiere. Dies zeigt, dass die Methylierung an der C4'-OH-Gruppe nicht nur die Toxizität von Naringenin reduziert, sondern vielmehr eine Protektion gegenüber thermalem Stress vermittelte. Prenylierungen an C8 und C6 normalisierten ebenfalls die toxische Wirkung von Naringenin auf das Niveau der DMSO-Kontrolle.

In der Gesamtbetrachtung wurde keine Korrelation zwischen der Protektion gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität durch die Naturstoffe und einer erhöhten thermalen Stressresistenz in *C. elegans* gefunden. Zwar steigerten die Flavonoide Morin und ISK die Thermotoleranz in den N2-Tieren, jedoch verzögerte nur Morin die A β ₁₋₄₂-Paralyse in den transgenen *C. elegans* (CL4176). Des Weiteren führen Modifikationen an der Grundstruktur von Naringenin zu einer veränderten Bioaktivität der Ausgangssubstanz, wohingegen Methylierungen von Quercetin keinen Einfluss zeigten.

5.4 Modulation des ILS durch Flavonoide in *C. elegans*

Flavonoiden besitzen neben antioxidativen Eigenschaften auch die Fähigkeit mit zellulären Signalwegen zu interagieren (Übersichtsartikel von Williams & Spencer 2012). Um den protektiven

Wirkmechanismus gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* aufzuklären, wurde deshalb der Einfluss der ausgewählten Flavonoide auf den ILS untersucht. In *C. elegans* führt die Reduktion des ILS u. a. zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren DAF-16, HSF-1 und SKN-1, was mit einer Verringerung der A β ₁₋₄₂-induzierten Paralyserate in den transgenen Alzheimer-Nematoden assoziiert ist (Hsu *et al.* 2003, Cohen *et al.* 2006, Tullet *et al.* 2008, Dostal *et al.* 2010).

5.4.1 Einfluss von Flavonoiden auf die nukleäre Translokation von GFP-gekoppelten Transkriptionsfaktoren

Da bereits in Vorversuchen gezeigt wurde, dass sowohl das HOE als auch das HE die nukleärer Akkumulation von DAF-16 in *C. elegans* erhöhen, sollte anschließend untersucht werden, ob die isolierten Naturstoffe eine ähnliche Wirkung zeigen. Hierzu wurden GFP-Reporterstämme benutzt, durch die es möglich ist die zelluläre Lokalisation der Transkriptionsfaktoren fluoreszenzmikroskopisch zu analysieren. Neben DAF-16, wurde auch die zelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktor SKN-1 untersucht. Anschließend wurde die Proteinexpression des DAF-16-Zielgens HSP-16.2 analysiert, welches an der Beseitigung von aggregierten A β ₁₋₄₂-Peptiden in *C. elegans* beteiligt ist (Link 2006, Wu *et al.* 2010).

Flavonoide

Bis auf Galangin führten alle Flavonole (50-100 μ M) nach einer einstündigen Inkubation zu einer erhöhten nukleären DAF-16-Translokation in *C. elegans* gegenüber der DMSO-Kontrolle. Dies zeigt, dass bereits eine relativ kurze Behandlungsdauer mit den Flavonolen molekulare Effekte in *C. elegans* induzieren kann. Dabei war die Effektstärke der Substanzen vergleichbar, stieg dennoch mit zunehmender Anzahl der OH-Gruppen im B-Ring der Flavonole geringfügig an: Galangin < Fisetin < Myricetin. Zudem schien die Catechol-Gruppe die Wirkung zu steigern, da Morin den Anteil „nukleär“ eingestufte Nematoden um den 5,3-fachen Wert und Fisetin um den 6,3-fachen Wert gegenüber der Kontrolle erhöhte. Außerdem zeigte Quercetin in einer Konzentration von 50 μ M eine vergleichbare Wirkung wie 100 μ M Morin. Im Gegensatz dazu beeinflussten die Langzeitinkubationen mit den Flavonolen die zelluläre DAF-16-Lokalisation in *C. elegans* nicht, was auf einer Abnahme der Substanzkonzentration im Medium zurückzuführen sein könnte, da zum einen geringere Flavonolkonzentrationen (50 μ M) als bei der Kurzzeitinkubation eingesetzt wurden und zum anderen keine Erneuerung des Inkubationsmedium stattfand. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei der Untersuchung der zellulären SKN-1-Lokalisation in den Nematoden gemacht: Die Langzeitinkubationen mit den Naturstoffen zeigten keine Einfluss auf die zelluläre Verteilung des Transkriptionsfaktors. Bis auf Myricetin, welches bei Büchter *et al.* (2013) ebenfalls keine SKN-1-Aktivierung in *C. elegans* induzierte, liegen für die Flavonole keine vergleichbaren Studien hinsichtlich der SKN-1-Modulation im Nematoden vor. Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise darauf, dass ein ähnliches Inkubationsschema (für 72 h nach dem Schlüpfen) mit 100 μ M Quercetin, Fisetin oder Myricetin die nukleäre Translokation von DAF-16 in *C. elegans* induzieren kann (Kampkötter *et al.* 2007a, Kampkötter *et al.* 2008, Büchter *et al.* 2013). Der primäre Unterschied zur vorliegenden Arbeit besteht neben der höheren Flavonoidkonzentration in der Verwendung von lebenden anstatt hitzeinaktivierten OP50-1 *E. colis* als Nahrungsquelle. Kampkötter *et al.* (2008) konnten jedoch zeigen, dass Quercetin zumindest nach einer 20-stündigen Inkubation mit den OP50-1 *E. colis* im flüssigen Nematoden-Medium stabil ist. Zudem

zeigten Grünz *et al.* (2012), dass eine 48-stündige Inkubation mit 100 µM Quercetin oder Myricetin für 48 h die nukleäre DAF-16-Translokation in *C. elegans* erhöhte, obwohl hitzeinaktivierte OP50 *E. coli*s verwendet wurden. Des Weiteren war zu beobachten, dass die nukleäre Translokation von DAF-16 tendenziell mit einer höheren Anzahl an OH-Gruppen im B-Ring der Flavonoide assoziiert war, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nach einer Kurzzeitinkubation mit den Flavonolen widerspiegelt (Grünz *et al.* 2012).

Eine Erklärung für die Wirkungsweise der Flavonole wäre, dass die Substanzen kurzzeitig prooxidativ im Nematoden wirken. Bei der Oxidation der Polyphenole können bei Vorliegen bestimmter struktureller Bedingungen Chinonstrukturen entstehen, die zu einer weiteren Polymerisierung führen (Metodiewa *et al.* 1999, Zhou & Sadik 2008, Ebermann & Elmadfa 2011). Bei der Regeneration des Chinons zu der phenolische Verbindung (Hydrochinon) im sogenannten *redox cycling* entstehen ROS (Cohen & Doherty 1987). Es wird vermutet, dass die entstandenen ROS und die hochreaktiven Phenoxyradikale u. a. die indirekte antioxidative Aktivität der Polyphenole vermitteln (Übersichtsartikel von Surh *et al.* 2008, Dinkova-Kostova & Talalay 2008). Die einstündige Flavonol-Inkubation könnte demnach zu einer kurzfristigen Induktion des redox-sensitiven Transkriptionsfaktors DAF-16 in *C. elegans* geführt haben, wohingegen bei der 72-stündigen Inkubation entweder eine Adaptation der Nematoden an die Stressbedingungen stattfand oder die verbleibende Substanzkonzentration zu gering war um langfristig molekulare Effekte zu erzielen. Dies würde einem Hormesiseffekt entsprechen, bei dem niedrige Substanzkonzentrationen milden Stress und dadurch adaptive Zellmechanismen induzieren, während höhere Konzentrationen schädlich sind (Le Bourg 2009). Es ist z. B. bekannt, dass Quercetin, Fisetin und Myricetin in höheren Konzentrationen (halbmaximalen effektiven Konzentrationen (EC₅₀) von 35, 40 und 72 µM) in H4IIE-Zellen zytotoxisch wirken (Wätjen *et al.* 2005). Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass Quercetin die Apoptose in Zellen über eine Inhibition von Chaperonen vermittelt (Übersichtsartikel von Vargas & Burd 2010). Wang *et al.* (2010) zeigten beispielsweise, dass eine Quercetin-Inkubation (150 µM) von Jurkat-Zellen die Hitze-induzierte HSP70-Proteinexpression unterdrückt, wohingegen HSP27 phosphoryliert und damit aktiviert wird. Interessanterweise bewirkte eine Behandlung Quercetin (200 µM) ebenfalls eine Herunterregulierten der *hsp70*-Genexpression in *C. elegans*, während die *hsp-16.1*- und *hsp-12.6*-Gene tendenziell induziert wurden (Pietsch *et al.* 2011). Die Autoren verzeichneten ebenfalls einen Hormesis-Effekte von Quercetin in Bezug auf die Lebensspannenverlängerung. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Effekt der Flavonole auf die HSP-16.2-Proteinexpression festgestellt werden.

Auch in einer Zellkulturstudie modulierte Quercetin die Aktivität des DAF-16-Homologs FOXO3A: Hierbei induzierte eine Inkubation mit dem Flavonol die nukleäre Translokation von FOXO3A in primär isolierten Epithelzellen von COPD (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)-Patienten (Ganesan *et al.* 2013). In Krebszelllinien ist die Datenlage hingegen kontrovers: Die FOXO3A-Aktivität wird durch eine Quercetin-Inkubation inhibiert oder nicht beeinflusst wird (Huang *et al.* 2013, Roshanzamir & Yazdanparast 2014). Nach aktuellem Kenntnisstand liegen keine Daten zur Modulation von FOXO durch andere Flavonole in Zell- oder Tiermodellen vor. Im Gegensatz dazu, gibt es umfassende Evidenz dafür, dass alle der hier untersuchten Flavonole die transkriptionelle Aktivität von Nrf2 zumindest im Zellmodell induzieren (Lee *et al.* 2011, Park *et al.* 2013, Qin *et al.* 2013, Ajit *et al.* 2016, Madduma Hewage *et al.* 2016). In Zellkulturstudien spielen jedoch Aufnahme und Biotransformation weniger eine Rolle als bei

Modellorganismen, was zu abweichenden physiologischen und molekularen Effekten der Naturstoffe führen kann.

Die Kurzzeitinkubation mit den Flavanonen Naringenin und LQ (100 μ M) beeinflusste die zelluläre DAF-16-Lokalisation in *C. elegans* gegenüber der DMSO-Kontrolle nicht. Die Langzeitinkubation mit LQ, welches ein protektives Potential gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* aufwies, zeigte weder eine Wirkung auf die nukleäre DAF-16- und SKN-1-Translokation noch auf die HSP-16.2-Proteinexpression in den Nematoden. Im Gegensatz dazu zeigten Grünz *et al.* (2012), dass eine 48-stündige Inkubation mit Naringenin ab dem L4-Stadium die nukleäre Translokation von DAF-16 erhöhte, wobei die Effektstärke geringer war als bei den Flavonolen Quercetin und Myricetin. Dabei muss in Betracht gezogen werden, dass die stimulatorische Wirkung der Flavonoide auf die nukleäre DAF-16-Translokation in dieser Arbeit insgesamt geringer ausgefallen ist als bei Grünz *et al.* (2012). Im Vergleich zu Flavonolen sollten die Flavanone auf Basis ihrer Struktur eine geringere Fähigkeit besitzen antioxidative Enzyme über die Regulation von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren zu induzieren. Das prooxidative Potential von Flavonoiden, welcher zur Aktivierung von antioxidativen und Phase-II-Enzymen beiträgt, hängt von der C3-OH-Gruppe ab und steigt mit Anzahl der OH-Gruppen (Lee-Hilz *et al.* 2006). In verschiedenen Zellmodellen wurde jedoch bereits eine Aktivierung von Nrf2 durch die hier untersuchten Flavanone festgestellt (Podder *et al.* 2014, Hajirahimkhan *et al.* 2015, Gong *et al.* 2015), wohingegen keine Daten zur FOXO3A-Aktivierung zur Verfügung stehen.

Methylierte Flavonoide

Über die molekulare Wirkung von methylierten Quercetinderivaten in *C. elegans* liegen bisher keine Daten aus der Literatur vor. Zellversuche weisen jedoch darauf hin, dass Q-3-M und Isorhamnetin mit zellulären Signalwegen interagieren können: In FL83B-Zellen erhöhte eine Q-3-M-Inkubation (60 μ M) die FOXO3A-Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle (Tseng *et al.* 2012). Hingegen schützt eine Isorhamnetin-Inkubation (10-50 μ M) HepG2-Zellen vor oxidativem Stress durch die Aktivierung von Nrf2 (Yang *et al.* 2014). In der vorliegenden Arbeit induzierte die Kurzzeitinkubationen mit den methylierten Derivate (50 μ M) die nukleäre DAF-16-Translokation in *C. elegans* in einem vergleichbaren Maße wie die Quercetin-Behandlung, jedoch zeigte nur die Isorhamnetin-Gruppe einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Die Langzeitinkubation mit Q-3-M, welche zuvor protektiv gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* war, beeinflusste die nukleäre DAF-16- und SKN-1-Lokalisation im Nematoden nicht. Des Weiteren zeigte die Q-3-M-Behandlung keine Wirkung auf die HSP-16.2-Proteinexpression in *C. elegans*.

Prenylierte Flavonoide

Weder die Behandlung mit den prenylierten Verbindungen 8-PN und 6-PN (100 μ M) noch mit dem methylierten Naringeninderivat ISK (100 μ M), beeinflusste die nukleäre DAF-16- und SKN-1-Translokation in *C. elegans*. Des Weiteren zeigten sich kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen und der DMSO-Gruppe in der HSP-16.2-Proteinexpression. Aus der Literatur ist bekannt, dass 8-PN (0,1 bis 10 μ M) die Aktivität von Nrf2-abhängige Enzymen in Hepa 1c1c7-Zellen und HepG2-Zellen hochregulieren kann (Miranda *et al.* 2000, Dietz *et al.* 2013). Des Weiteren zeigte 6-PN eine vergleichbare Wirkung wie 8-PN in Hepa 1c1c7-Zellen (Miranda *et al.* 2000). Im Vergleich zu den Effekten in Leberkrebszellen resultierte die 8-PN-Inkubation der Brustkrebszelllinie MCF-7 in zum

Teil gegensätzlichen Ergebnisse, was vermutlich auf der östrogenen Wirkung von 8-PN beruht. Hierbei inhibierte 8-PN (3 μM) die Nrf2-abhängige NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase-Aktivität (Dietz *et al.* 2013). Des Weiteren interferierte 8-PN (20 μM) mit der Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-induzierten Zellproliferation über die Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges in MCF-7-Zellen (Brunelli *et al.* 2009). Dies zeigt, dass die spezifische Bioaktivität von prenylierten Naringeninderivaten vom Gewebetyp abhängig ist. In den Versuchen mit *C. elegans* wurde die zelluläre DAF-16-Lokalisation im gesamten Körper und die SKN-1-Lokalisation in den Darmzellen der Tiere bestimmt. Eine gewebespezifische Wirkung der Substanzen könnte daher unentdeckt geblieben sein.

5.4.2 Modulation der $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität durch Flavonoide in *C. elegans* unter *daf-16* RNAi-Bedingungen

Um zu überprüfen, ob die untersuchten Flavonoide die $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität über die Modulation des ILS reduzieren, wurde der $\text{A}\beta_{1-42}$ -Paralyseversuch unter *daf-16* RNAi-Bedingungen wiederholt. Hierbei sollte untersucht werden, ob spezifische Methylierungen und Prenylierungen von Flavonoiden den molekularen Wirkmechanismus der Naturstoffe beeinflussen. Die *daf-16* RNAi-Bedingungen wurden durch die Fütterung von *C. elegans* mit dem *E. coli*-Stamm HT115 generiert, welcher doppelsträngige RNAs des gewünschten Gens exprimiert.

Methylierte Flavonoide

Bei der Untersuchung von Quercetin und dem methylierten Derivat Q-3-M (50 μM) zeigte sich, dass beide Naturstoffe die $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität in Abhängigkeit von DAF-16 in den CL4176-Nematoden senkten. Daher lässt sich vermuten, dass Quercetin und Q-3-M über den gleichen molekularen Mechanismus wirken. Eine Modulation des ILS durch Quercetin scheint außerdem für die Lebensspannenverlängerung in *C. elegans* essentiell zu sein; die Notwendigkeit von DAF-16 wird jedoch kontrovers diskutiert (Saul *et al.* 2008, Pietsch *et al.* 2009, Grünz *et al.* 2012).

Prenylierte Flavonoide

Da die prenylierten Naringeninderivate eine potente Schutzwirkung im $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizitätsassay zeigten, wurde auch hier eine Abhängigkeit von DAF-16 überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Inkubation mit 6-PN (100 μM) die $\text{A}\beta_{1-42}$ -induzierte Paralyse unter Leervektor-Bedingungen statistisch signifikant gegenüber der DMSO-Behandlung verzögerte. Unter *daf-16* RNAi-Bedingungen zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen der 6-PN- und der Kontrollgruppe, was auf eine DAF-16-abhängige Modulation der $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität hinweist. Im Fall der 8-PN-Behandlung (100 μM) wurde jedoch weder unter Leervektor- noch unter *daf-16* RNAi-Bedingungen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe im Paralyseverhalten der CL4176-Nematoden festgestellt. Unterschiedliche Nahrung in Form eines anderen Bakterienstammes kann den Metabolismus und damit z. B. den oxidativen Stress-Status der Tiere verändern, wodurch Testsubstanzen eine unterschiedliche Wirkung je nach Bedingung aufweisen können (Lynn & Curran 2015). Die zwei eingesetzten *E. coli*-Stämme unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung, z. B. besitzen der HT115-Stamm einen höheren Kohlehydratgehalt als der OP50-Stamm (Brooks *et al.* 2009). Des Weiteren weisen die Bakterienstämme eine unterschiedliche Lipopolysaccharidstruktur auf, welche von den Rezeptoren in den sensorischen Neuronen von *C. elegans* unterschiedlich erkannt werden und somit die Lebensspanne

der Nematoden modulieren (Maier *et al.* 2010). Zwei Studien zeigen außerdem, dass *C. elegans*, die mit HT115 *E.colis* gefüttert werden, einen niedrigeren Triglycerid-Spiegel und eine längere Lebensspanne aufwiesen, als *C. elegans*, die OP50 *E. coli*s als Nahrungsquelle erhalten (Brooks *et al.* 2009, Reinke *et al.* 2010). Des Weiteren konnten Reinke *et al.* (2010) nachweisen, dass sich das metabolische Profil von *C. elegans* verändert, wenn eine Nahrungsumstellung von OP50 auf HT115 *E.colis* stattfindet. Veränderungen im Stoffwechsel von *C. elegans* durch die Fütterung von HT115 *E. coli*s könnten folglich zu dem Ausbleiben der 8-PN-Wirkung geführt haben. Gleichzeitig zeigen diese Ergebnisse, dass es einen Unterschied in der Wirkungsweise zwischen 6-PN und 8-PN im Nematoden gibt.

In der Gesamtbetrachtung ergibt sich, dass Flavonole das Potential besitzen die nukleäre Akkumulation des Transkriptionsfaktors DAF-16 zu erhöhen. Eine Methylierung von Quercetin zeigte keinen oder nur einen geringfügigen Einfluss auf diese Aktivität. Hingegen hatte die Inkubation mit den Flavanonen und die methylierten und prenylierten Derivate keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation der redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren. Diese Untersuchungen weisen auch darauf hin, dass die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in *C. elegans* durch Flavonoide von den Inkubationsbedingungen abhängig ist. Kritische Aspekte sind hierbei die kinetische Betrachtung von zellulären Prozessen sowie die Substanzkonzentration als auch die Verwendung von lebenden gegenüber inaktivierten Bakterien. Die Paralyse-Versuche mit den *daf-16* RNAi exprimierenden *E. coli*s deuten außerdem darauf hin, dass die DAF-16-Aktivität für die protektive Wirkung von Quercetin, Q-3-M und 6-PN gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* notwendig ist. Schließlich stellt sich die Frage, welche Zielgene von DAF-16 diese Schutzwirkung vermitteln. Da die A β ₁₋₄₂-induzierte Paralyse nicht mit einem geringeren ROS-Status der Tiere im DCF-Assay korrelierte, stehen wahrscheinlich andere als antioxidative Prozesse im Vordergrund. Eine Möglichkeit hierfür wäre die Aktivierung von Mechanismen, die die Proteinhomeostase aufrechterhalten. Hierbei könnte die Untersuchung der Autophagozytose in den Alzheimer-Nematoden ein vielversprechender Ansatzpunkt zu sein. Dieser evolutionär konservierte Prozess dient zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, wobei geschädigte Organellen, Proteine und intrazelluläre Giftstoffe beseitigt werden (Übersichtsartikel von Li *et al.* 2016). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Inhibierung des ILS-Signalweges in *C. elegans* nicht nur die Lebensspanne verlängert, sondern auch die Autophagozytose-vermittelte Degradation von A β -Peptiden induziert und folglich die A β -Toxizität reduziert (Florez-McClure *et al.* 2007). Ähnliche Ergebnisse wurden in *Drosophila melanogaster* gefunden, wobei die Erhöhung der Expression eines Autophagozytose-Schlüsselgens die Neurodegeneration reduzierte (Simonsen *et al.* 2008). FoxO-Transkriptionsfaktoren regulieren ebenfalls zahlreiche Autophagozytose-fördernden Gene in Säugern (Salih & Brunet 2008). Zudem zeigen Zellkulturstudien, dass Quercetin, Galangin, Myricetin, 8-PN und 6-PN die Autophagozytose-Aktivität erhöhen können (Delmule *et al.* 2008, Pietrocola *et al.* 2012, Übersichtsartikel von Pallauf & Rimbach 2013, Li *et al.* 2016, He *et al.* 2017). Erste Untersuchungen an *C. elegans* weisen auch darauf hin, dass die Quercetin-vermittelte Protektion gegenüber der Hitzeschock-induzierte Paralyse in den Alzheimer-Nematoden (CL2006) über eine Induktion der Autophagozytose moduliert wird (Regitz *et al.* 2014).

5.5 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HOE und HE die A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* reduzieren können. Um protektive Naturstoffe zu identifizieren, wurden zum einen unsubstituierte Flavonoide und zum anderen methylierte und prenylierte Flavonoide untersucht. Eine vereinfachte Darstellung der Wirkungen der verschiedenen Naturstoffe ist in Abb. 56 ersichtlich. Hierbei zeigte sich, dass Flavonole eine höhere Bioaktivität als Flavanone aufweisen. Des Weiteren scheint die C5-OH-Gruppe für die Schutzwirkung der Flavonole essentiell zu sein. Jedoch konnte keine eindeutige Struktur-Wirkungsbeziehung festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass nicht eine aktive Komponente, sondern mehrere verschiedene Strukturelemente der Flavonoide die A β ₁₋₄₂-Toxizität über vielfältige molekulare Mechanismen reduzieren.

Ein Vergleich mit den Daten aus der Literatur ist aufgrund der heterogenen experimentellen Bedingungen nur bedingt möglich. Die *C. elegans*-Studien unterscheiden sich z.B. in dem eingesetzten Inkubationsmedium und in der Verwendung von metabolisch aktiven gegenüber inaktiven *E. colis* als Futterquelle der Nematoden. Unterschiede in den Kultivierungsbedingungen können für die O₂-, Bakterien- und letztendlich Flavonoidverfügbarkeit und -aufnahme von *C. elegans* entscheidend sein (Lenaerts *et al.* 2008). Zur besseren Vergleichbarkeit der Studien sollte daher eine Standardisierung der Inkubationsbedingungen von *C. elegans* erwogen werden. Weiterhin werden oftmals unterschiedliche transgenen Stämme als Morbus Alzheimer-Modell eingesetzt. Der hier verwendete Stamm CL4176 hat den Vorteil, dass die A β ₁₋₄₂-induzierte Paralyserate in einem relativ kurzen Zeitraum gemessen werden kann. Dadurch wurde die Untersuchung von zehn Flavonoiden *in vivo* unter gleichen Bedingungen ermöglicht, was zur Identifikation von protektiven Substanzen, wie 8-PN und 6-PN, führte, die vorher noch nicht in einem Alzheimer-Modell analysiert wurden. Zur Erforschung der A β -Prozessierung aus dem Vorläuferpeptid oder der Tau-Pathologie sind jedoch beide Stämme nicht geeignet. Hingegen können molekulare Mechanismen, die die A β ₁₋₄₂-Toxizität reduzieren, detailliert und schneller als in Säugermodellen untersucht werden. Dadurch konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bestimmte Flavonoide die A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* in Abhängigkeit von DAF-16 reduzieren (Abb. 56). Jedoch lässt sich nicht vollkommen auszuschließen, dass auch andere Mechanismen an der protektiven Wirkung der Naturstoffe beteiligt sind. Im Fall von Fisetin zeigte sich z.B., dass eine Induktion der nukleären DAF-16-Translokation allein nicht ausreichend ist, um die A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* zu reduzieren (Abb. 56). Daher lässt sich vermuten, dass Flavonoide über verschiedene zelluläre Angriffspunkte die A β ₁₋₄₂-Toxizität modulieren.

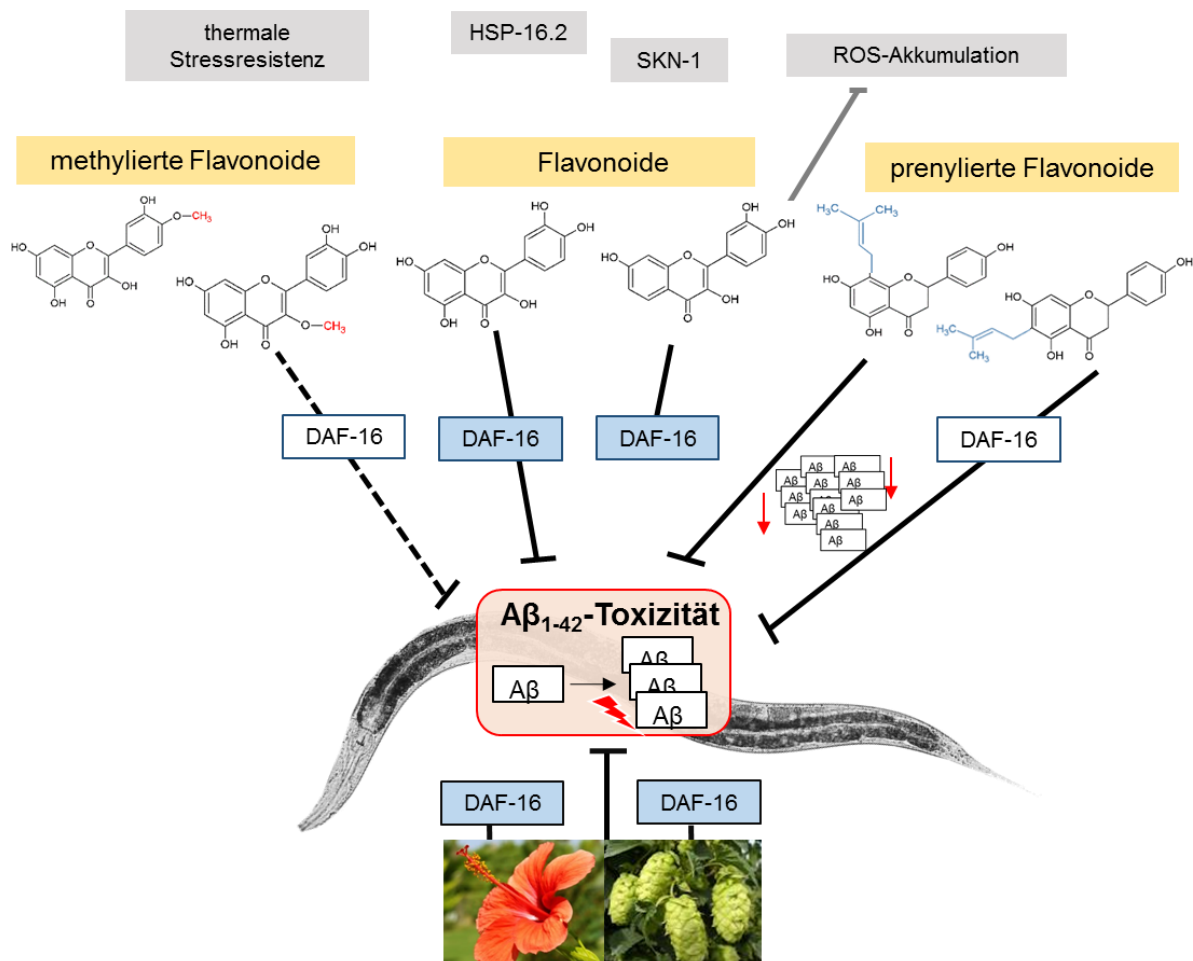


Abbildung 56. Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von spezifischen Flavonoiden gegenüber der $A\beta_{1-42}$ -Toxizität in *C. elegans*.

Blau gekennzeichnete Felder zeigen eine erhöhte nukleäre Akkumulation von DAF-16 durch die Behandlung mit dem Extrakt oder dem isolierten Naturstoff. Bilder der Hibiskus- und Hopfenblüten von Klitzsch (2017) und Seidel (2017). DAF = *Dauergen (abnormal DAUER Formation)*, PN = Prenylnaringenin, ROS = reaktive Sauerstoffspezien.

6 Zusammenfassung

Bei der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Alzheimer, spielt eine Akkumulation von A β -Peptiden eine wichtige Rolle. Epidemiologische Studien zeigen, dass eine pflanzenbasierte, flavonoidreiche Ernährung das Risiko für Morbus Alzheimer senkt. Die genauen Mechanismen der protektiven Wirkung sind jedoch nicht bekannt. Um den molekularen Wirkmechanismus von Flavonoiden bei Morbus Alzheimer aufzuklären, wurde als Modell der Nematode *Caenorhabditis elegans* verwendet: über die Expression des humanen A β ₁₋₄₂-Peptids kann die A β ₁₋₄₂-Toxizität in transgenen *C. elegans*-Stämmen untersucht werden.

Zwei flavonoidreiche Extrakte aus Hibiskus- und Hopfenblüten waren in der Lage, die A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* konzentrationsabhängig zu reduzieren. Ausgehend von diesem Ergebnis wurden ausgewählte isolierte Flavonoide untersucht. Neben unsubstituierten Verbindungen wurden methylierte und prenylierte Substanzen analysiert, um eine Struktur-Wirkungsbeziehung aufzuklären. Bis auf Fisetin führten alle untersuchten Flavonole zu einer Verlängerung der mittleren Zeitspanne bis zum Eintreten der Paralyse in *C. elegans*. Das Vorhandensein der C5-OH-Gruppe scheint für die Wirkung essentiell zu sein. Die ausgewählten Flavanone besaßen eine geringere Bioaktivität als die Flavonole in den Nematoden. Von den methylierten Quercetinderivaten führte nur Q-3-M zu einer Reduktion der A β ₁₋₄₂-Toxizität. Methoxygruppen am C3' und C4' stellen daher möglicherweise sterische Hinderungen dar, welche die Wirksamkeit von Quercetin im Alzheimer-Modell reduzieren. Hingegen erhöhte eine Prenylierung die biologische Aktivität von Naringenin in den Alzheimer-Nematoden, da die im Hopfenextrakt enthaltenen Verbindungen 6-PN und 8-PN die mittlere Zeitspanne bis zum Eintritt der Paralyse verlängerten.

Die Flavonoid-vermittelte Protektion gegenüber der A β ₁₋₄₂-induzierten Paralyse beruht nicht auf einer Modulation der A β -Aggregation, da bis auf den prenylierten Naringeninderivaten keiner der untersuchten Naturstoffe die Anzahl der ThS positiven-Ablagerung in *C. elegans* beeinflusst.

Um zu überprüfen, ob die Protektion gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität mit antioxidativen Wirkungen der Flavonoide in *C. elegans* korreliert, wurde neben den radikal-fangenden Eigenschaften der Substanzen *in vitro* die Modulation der ROS-Akkumulation in den Alzheimer- und wildtypischen Nematoden unter thermalem Stress gemessen. Hierbei wiesen alle Flavonole potente radikalfangende Eigenschaften *in vitro* auf, welche mit der Anzahl und Stellung der OH-Gruppen im B-Ring korrelierten, wohingegen die untersuchten Flavanone keine radikalfangende Kapazität zeigten. Weiterhin verringerte eine Methylierung das antioxidative Potential von Quercetin. Die potente *in vitro*-Aktivität der Flavonole korrelierte nicht mit der *in vivo*-Wirkung: Nur Myricetin war in der Lage die thermal induzierte ROS-Akkumulation in beiden Stämmen zu reprimieren. Dies weist daraufhin, dass die antioxidative Kapazität von Flavonoiden nicht mit der Protektion gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität im Alzheimer-Stamm korreliert. Auch im Hinblick auf die Stressantwort wurde keine Assoziation zwischen der Schutzwirkung der Naturstoffe im A β ₁₋₄₂-Toxizitätsassay und der thermalen Stressresistenz von wildtypischen Nematoden beobachtet.

Die nukleäre Translokation der Transkriptionsfaktoren DAF-16 und SKN-1 wurde in transgenen Tieren analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die Kurzzeitinkubationen, nicht aber die Langzeitinkubationen, mit den Flavonolen die nukleäre DAF-16-Akkumulation in *C. elegans* erhöhten. Diese Aktivität korrelierte tendenziell mit der steigenden Anzahl der OH-Gruppen im B-Ring. Die Inkubationen mit den Flavanonen

und den methylierten und prenylierten Naringeninderivaten modulierte die zelluläre DAF-16-Lokalisation in den transgenen Tieren nicht. Keine der untersuchten Naturstoffe, die vor der A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* schützten, beeinflusste die zelluläre Lokalisation von SKN-1 in den Nematoden.

Die protektive Wirkung von Quercetin, Q-3-M und 6-PN in den Alzheimer-Tieren war von DAF-16 abhängig. Die Expression des DAF-16-Zielgens HSP-16.2 wurde jedoch von keiner der untersuchten Substanzen beeinflusst. Daher schließt sich die Suche nach weiteren Zielgenen an, die durch die Flavonoide moduliert werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die flavonoidreichen Extrakte aus Hibiskus- und Hopfenblüten eine potente Schutzwirkung gegenüber der A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans* aufweisen. Flavonoide reduzieren in Abhängigkeit von ihrer Struktur ebenfalls die A β ₁₋₄₂-Toxizität, was jedoch nicht über eine antioxidative Wirkung vermittelt wird. Die Schutzwirkung von bestimmten Flavonoiden war von DAF-16 abhängig. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die physiologische Wirkung von Flavonoiden von der Struktur abhängt. Weitere Forschungen sind nötig, um den jeweiligen Wirkmechanismus im Detail aufzuklären und alzheimerprotektive Substanzen als potentielle Pharmaka zu identifizieren.

7 Literaturverzeichnis

- Abramov AY, (2004) β -Amyloid Peptides Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Astrocytes and Death of Neurons through Activation of NADPH Oxidase. In: *Journal of Neuroscience*, 24(2), S. 565–575.
- Ah Kang K, Wang ZH, Zhang R, Piao MJ, Kim KC, Kang SS, Kim YW, Lee J, Park D & Hyun JW, (2010) Myricetin protects cells against oxidative stress-induced apoptosis via regulation of PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. In: *International Journal of Molecular Sciences*, 11(11), S. 4348–4360.
- Ahmad A, Ali T, Park HY, Badshah H, Rehman SU & Kim MO, (2017) Neuroprotective Effect of Fisetin Against Amyloid-Beta-Induced Cognitive/Synaptic Dysfunction, Neuroinflammation, and Neurodegeneration in Adult Mice. In: *Molecular Neurobiology*, 54(3), S. 2269–2285 (Abstract).
- Ajit D, Simonyi A, Li R, Chen Z, Hannink M, Fritsche KL, Mossine V V., Smith RE, Dobbs TK, Luo R, Folk WR, Gu Z, Lubahn DB, Weisman GA & Sun GY, (2016) Phytochemicals and botanical extracts regulate NF- κ B and Nrf2/ARE reporter activities in di TNC1 astrocytes. In: *Neurochemistry International*, 97, S. 49–56.
- Akaishi T, Morimoto T, Shibao M, Watanabe S, Sakai-Kato K, Utsunomiya-Tate N & Abe K, (2008) Structural requirements for the flavonoid fisetin in inhibiting fibril formation of amyloid beta protein. In: *Neuroscience Letters*, 444(3), S. 280–285.
- Alexander AG, Marfil V & Li C, (2014) Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. In: *Frontiers in Genetics*, 5(September), S. 1–21.
- Alrushaid S, Davies NM, Martinez SE & Sayre CL, (2016) Pharmacological characterization of liquiritigenin, a chiral flavonoid in licorice. In: *Research Pharmacological Science*, 5, S. 355–65.
- Amoros M, Simões CM, Girre L, Sauvager F & Cormier M, (1992) Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. In: *Journal of Natural Products*, 55(12), S. 1732–1740.
- An JH & Blackwell TK, (2003) SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. In: *Genes and Development*, 17(15), S. 1882–1893.
- Athira K V, Madhana RM, Kasala ER, Samudrala PK, Lahkar M & Gogoi R, (2016) Morin Hydrate Mitigates Cisplatin-Induced Renal and Hepatic Injury by Impeding Oxidative/Nitrosative Stress and Inflammation in Mice. In: *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 28(7), S. 320–7.
- Barnham KJ, Masters CL & Bush AI, (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. In: *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(3), S. 205–214.
- Barsyte D, Lovejoy DA & Lithgow GJ, (2001) Longevity and heavy metal resistance in *daf-2* and *age-1* long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans*. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(3), S. 627–34.
- Baumeister R, Schaffitzel E & Hertweck M, (2006) Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans*

- controls stress response and longevity. In: *The Journal of Endocrinology*, 190(2), S. 191–202.
- Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA & Ganie SA, (2015) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. In: *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 74(2015), S. 101–110.
- Bhattacharya S, Christensen KB, Olsen LCB, Christensen LP, Grevsen K, Færgeman NJ, Kristiansen K, Young JF & Oksbjerg N, (2013) Bioactive components from flowers of *Sambucus nigra* L. increase glucose uptake in primary porcine myotube cultures and reduce fat accumulation in *Caenorhabditis elegans*. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), S. 11033–11040.
- Biesalski, H.K., Bischoff, S.C. PC, (2012) 1.Grundlagen der Ernährung 13. sekundäre Pflanzenstoffe (R. Carle). In *Ernährungsmedizin*. Stuttgart: George Thieme Verlag, S. 235.
- Blackwell TK, Steinbaugh MJ, Hourihan JM, Ewald CY & Isik M, (2015) SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. In: *Free Radical Biology and Medicine*, 88, S. 290–301.
- Blanquer-Rosselló MM, Oliver J, Valle A & Roca P, (2013) Effect of xanthohumol and 8-prenylnaringenin on MCF-7 breast cancer cells oxidative stress and mitochondrial complexes expression. In: *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(12), S. 2785–2794.
- de Boer VCJ, Dihal A a, van der Woude H, Arts ICW, Wolfram S, Alink GM, Rietjens IMCM, Keijer J & Hollman PCH, (2005) Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. In: *The Journal of Nutrition*, 135(7), S. 1718–1725.
- Boots AW, Haenen GRMM & Bast A, (2008) Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. In: *European Journal of Pharmacology*, 585(2–3), S. 325–337.
- Böttner M, Christoffel J & Wuttke W, (2008) Effects of long-term treatment with 8-prenylnaringenin and oral estradiol on the GH-IGF-1 axis and lipid metabolism in rats. In: *Journal of Endocrinology*, 198(2), S. 395–401.
- Le Bourg É, (2009) Hormesis, aging and longevity. In: *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(10), S. 1030–1039.
- Brenner S, (1974) The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. In: *Genetics*, 77, S. 71–94.
- Brooks KK, Liang B & Watts JL, (2009) The influence of bacterial diet on fat storage in *C. elegans*. In: *PLoS ONE*, 4(10), S. 1–8.
- Brown DI & Griendling KK, (2009) Nox proteins in signal transduction. In: *Free Radical Biology and Medicine*, 47(9), S. 1239–1253.
- Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED & Beal MF, (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. In: *Annals of Neurology*, 41(5), S. 646–653.
- Brunelli E, Pinton G, Chianale F, Graziani A, Appendino G & Moro L, (2009) 8-Prenylnaringenin inhibits epidermal growth factor-induced MCF-7 breast cancer cell proliferation by targeting phosphatidylinositol-3-OH kinase activity. In: *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular*

- Biology*, 113(3–5), S. 163–170.
- Bu G, Cam J & Zerbinatti C, (2006) LRP in amyloid-beta production and metabolism. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1086, S. 35–53.
- Büchter C, Ackermann D, Havermann S, Honnen S, Chovolou Y, Fritz G, Kampkötter A & Wätjen W, (2013) Myricetin-Mediated Lifespan Extension in *Caenorhabditis elegans* Is Modulated by DAF-16. In: *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), S. 11895–914.
- Busch C, Noor S, Leischner C, Burkard M, Lauer LM & Venturelli S, (2015) Anti-proliferative activity of hop-derived prenylflavonoids against human cancer cell lines. In: *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 165, S. 258–261.
- Busse R & Mülsch A, (1990) Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. In: *FEBS letters*, 275(1–2), S. 87–90.
- Cao H, Jing X, Wu D & Shi Y, (2013) Methylation of genistein and kaempferol improves their affinities for proteins. In: *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(4), S. 437–43.
- Cao J, Wang H, Chen F, Fang J, Xu A, Xi W, Zhang S, Wu G & Wang Z, (2016) Galangin inhibits cell invasion by suppressing the epithelial-mesenchymal transition and inducing apoptosis in renal cell carcinoma. In: *Molecular Medicine Reports*, 13, S. 4238–4244.
- Cao L, Tan L, Wang H, Jiang T, Zhu X, Lu H, Tan M & Yu J, (2015) Dietary Patterns and Risk of Dementia: a Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. In: *Molecular Neurobiology*, 53(9), S. 6144–6154.
- Chance B, Sies H & Boveris A, (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. In: *Physiological Reviews*, 59(3), S. 527–605.
- Cheyrier V, (2005) Polyphenols in foods are more complex than often thought. In: *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, S. 223–229.
- Chiang H-C, Wang L, Xie Z, Yau A & Zhong Y, (2010) PI3 kinase signaling is involved in A β -induced memory loss in *Drosophila*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(15), S. 7060–7065.
- Choi SM, Kim BC, Cho YH, Choi KH, Chang J, Park MS, Kim MK, Cho KH & Kim JK, (2014) Effects of Flavonoid Compounds on beta-amyloid-peptide-induced Neuronal Death in Cultured Mouse Cortical Neurons. In: *Chonnam Med J*, 50(2), S. 45–51.
- Choi Y, Kim TD, Paik SR, Jeong K & Jung S, (2008) Molecular simulations for anti-amyloidogenic effect of flavonoid myricetin exerted against Alzheimer's β -amyloid fibrils formation. In: *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 29(8), S. 1505–1509.
- Chtourou Y, Fetoui H & Gdoura R, (2014) Protective effects of naringenin on iron-overload-induced cerebral cortex neurotoxicity correlated with oxidative stress. In: *Biological Trace Element Research*, 158(3), S. 376–383.
- Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW & Dillin A, (2006) Opposing activities protect against

- age-onset proteotoxicity. In: *Science*, 313(5793), S. 1604–10.
- Cohen E, Paulsson JF, Blinder P, Burstyn-Cohen T, Du D, Estepa G, Adame A, Pham HM, Holzenberger M, Kelly JW, Masliah E & Dillin A, (2009) Reduced IGF-1 Signaling Delays Age-Associated Proteotoxicity in Mice. In: *Cell*, 139(6), S. 1157–1169.
- Cohen GM & Doherty M d'Arcy, (1987) Free radical mediated cell toxicity by redox cycling chemicals. In: *The British Journal of Cancer. Supplement*, 55(VIII), S. 46–50.
- Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P & Dartigues JF, (2000) Intake of flavonoids and risk of dementia. In: *European Journal of Epidemiology*, 16(4), S. 357–363.
- Cruz JC & Tsai LH, (2004) Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. In: *Trends in Molecular Medicine*, 10(9), S. 452–458.
- Currais A, Prior M, Dargusch R, Armando A, Ehren J, Schubert D, Quehenberger O & Maher P, (2014) Modulation of p25 and inflammatory pathways by fisetin maintains cognitive function in Alzheimer's disease transgenic mice. In: *Aging Cell*, 13(2), S. 379–390.
- Cushnie TPT, Hamilton VES & Lamb AJ, (2003) Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. In: *Microbiological research*, 158(4), S. 281–289.
- Da-Costa-Rocha I, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I & Heinrich M, (2014) Hibiscus sabdariffa L. - A phytochemical and pharmacological review. In: *Food Chemistry*, 165, S. 424–443.
- Dai Q, Borenstein AR, Wu Y, Jackson JC & Larson EB, (2006) Fruit and Vegetable Juices and Alzheimer's Disease: The Kame Project. In: *American Journal of Medicine*, 119(9), S. 751–759.
- Daigle I & Li C, (1993) apl-1, a Caenorhabditis elegans gene encoding a protein related to the human β -amyloid protein precursor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(24), S. 12045–9.
- Day A, Canada F, JC D, Kroon P, Mclauchlan R, Faulds C, Plumb G, Morgan M & Williamson G, (2000) Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phloridzin hydrolase. In: *FEBS Letters*, 468, S. 166–170.
- Day AJ, Dupont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ c, Morgan MR a & Williamson G, (1998) Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. In: *FEBS Letters*, 436(1), S. 71–75.
- Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman S, Kindy M, Stern S, Zlokovic B, (2003) RAGE mediates amyloid- β peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. In: *Nature medicine*, 9(7), S. 907–913.
- Delmulle L, Bellahcène A, Dhooge W, Comhaire F, Roelens F, Huvaere K, Heyerick A, Castronovo V

- & De Keukeleire D, (2006) Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. In: *Phytomedicine*, 13(9–10), S. 732–734.
- Delmulle L, Berghe T, Keukeleire D. & Vandenabeele P, (2008) Treatment of PC-3 and DU145 prostate cancer cells by prenylflavonoids from hop (*Humulus lupulus* L.) induces a caspase-independent form of cell death. In: *Phytotherapy Research*, 203(August 2007), S. 197–203.
- Devore EE, Kang JH, Breteler MMB & Grodstein F, (2012) Dietary intakes of berries and flavonoids in relation to cognitive decline. In: *Annals of Neurology*, 72(1), S. 135–143.
- Dietz BM, Hagos GK, Eskra JN, Wijewickrama GT, Anderson JR, Nikolic D, Guo J, Wright B, Chen S-N, Pauli GF, van Breemen RB & Bolton JL, (2013) Differential regulation of detoxification enzymes in hepatic and mammary tissue by hops (*Humulus lupulus*) in vitro and in vivo. In: *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(6), S. 1055–1066.
- Dinkova-Kostova AT & Talalay P, (2008) Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. In: *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(SUPPL. 1), S. 128–138.
- Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, Lee EH, Lee J, Song YS, Lee YH, Jin C, Lee YS & Cho J, (2003) Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. In: *Brain Research*, 965(1–2), S. 130–136.
- Dostal V, Roberts CM & Link CD, (2010) Genetic mechanisms of coffee extract protection in a *Caenorhabditis elegans* model of β -amyloid peptide toxicity. In: *Genetics*, 186(3), S. 857–66.
- Douglas PM & Dillin A, (2010) Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. In: *Journal of Cell Biology*, 190(5), S. 719–729.
- Drake J, (2003) Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid β -peptide (1–42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. In: *Neurobiology of Aging*, 24(3), S. 415–420.
- Du Y, Qu J, Zhang W, Bai M, Zhou Q, Zhang Z, Li Z & Miao J, (2016) Morin reverses neuropathological and cognitive impairments in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice by targeting multiple pathogenic mechanisms. In: *Neuropharmacology*, 108, S. 1–13.
- Dueñas M, González-Manzano S, González-Paramás A & Santos-Buelga C, (2010) Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), S. 443–449.
- Duenas M, Sucro-Laos F, Gonzáles-Manazona S, Gonzáles-Parmás A, Gómes-Orte E, Cabello J & Santos-Buelga C, (2013) Deglycosylation is a key step in biotransformation and lifespan effects of quercetin-3-O-glucoside in *Caenorhabditis elegans*. In: *Pharmacological Research*, 76, S. 41–48.
- Dueñas M, Surco-Laos F, González-Manzano S, González-Paramás AM & Santos-Buelga C, (2011) Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. In: *European Food Research and*

- Technology*, 232(1), S. 103–111.
- Ebermann R & Elmadfa I, (2011) 8 Phenolische Verbindungen als Bestandteile von Lebensmitteln. In *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung*. Springer Wien NewYork, S. 191–214.
- Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD & Jalili T, (2007) Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. In: *The Journal of nutrition*, 137(11), S. 2405–11.
- Egert S, Wolfram S, Bosy-Westphal A, Boesch-Saadatmandi C, Wagner AE, Frank J, Rimbach G & Mueller MJ, (2008) Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. In: *The Journal of nutrition*, 138(9), S. 1615–1621.
- Ekinci FJ, Linsley MD & Shea TB, (2000) β -Amyloid-induced calcium influx induces apoptosis in culture by oxidative stress rather than tau phosphorylation. In: *Molecular Brain Research*, 76(2), S. 389–395.
- Fang F, Li JM, Pan QH & Huang WD, (2006) Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. In: *Food Chemistry*, 101(1), S. 428–433.
- Fatemi MH & Gholami Rostami E, (2013) Prediction of the Radical Scavenging Activities of Some Antioxidant from Their Molecular Structure. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52, S. 9525–31.
- De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST & Klein WL, (2007) A β oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. In: *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), S. 11590–11601.
- Finckh U, (2006) Genetische Faktoren bei Alzheimer-Demenz. In: *Deutsches Ärzteblatt*, 103(April), S. 1010–1016.
- Finkel T & Holbrook NJ, (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. In: *Nature*, 408(November 9), S. 239–247.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas S, Driver S & Mello CC, (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature*, 391, S. 806–811.
- Flachsbart F, Caliebe A, Kleindorp R, Blanché H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, Schreiber S & Nebel A, (2009) Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), S. 2700–5.
- Florez-McClure M, Hohsfield L, Fonte G, Bealor M & Link CD, (2007) Decreased Insulin-Receptor Signalling Promotes the Autophagic Degradation of A β -Amyloid Peptide in *C. elegans*. In: *Autophagy*, 3(6), S. 569–580.
- Fonte V, Dostal V, Roberts CM, Gonzales P, Lacor PN, Lacor P, Velasco PT, Magrane J, Dingwell N, Fan EY, Silverman M a, Stein GH & Link CD, (2011) A glycine zipper motif mediates the formation of toxic β -amyloid oligomers in vitro and in vivo. In: *Molecular Neurodegeneration*, 6(61), S. 1–7.

- Forman HJ & Torres M, (2002) Reactive oxygen species and cell signaling: Respiratory burst in macrophage signaling. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(12 II), S. S4-8.
- Friedman DB & Thomas E, (1987) A Mutation in the age-1 Gene in *Caenorhabditis elegans* Lengthens Life and Reduces Hermaphrodite Fertility. In: *Genetics*, 118, S. 75–86.
- Ganesan S, Unger BL, Comstock AT, Angel KA, Mancuso P, Martinez FJ & Sajjan US, (2013) Aberrantly activated EGFR contributes to enhanced IL-8 expression in COPD airways epithelial cells via regulation of nuclear FoxO3A. In: *Thorax*, 68(2), S. 131–41.
- Gardana C, Scaglianti M, Pietta P & Simonetti P, (2007) Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(3), S. 390–399.
- Garing D, Hsum AL., Frase A, Kamath R, Ahringer J & Kenyon C, (2002) Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. In: *Genetics*, 161(3), S. 1101–12.
- Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U & Caristi C, (2007) Flavonoid composition of citrus juices. In: *Molecules*, 12(8), S. 1641–1673.
- El Gharras H, (2009) Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. In: *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), S. 2512–2518.
- Ghofrani S, Joghataei MT, Mohseni S, Baluchnejadmojarad T, Bagheri M, Khamse S & Roghani M, (2015) Naringenin improves learning and memory in an Alzheimer's disease rat model: Insights into the underlying mechanisms. In: *European Journal Pharmacology*, 764, S. 195–201.
- Gill MS, Olsen A, Sampayo JN & Lithgow GJ, (2003) An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Free Radical Biology and Medicine*, 35(6), S. 558–565.
- Goldwasser J, Cohen PY, Yang E, Balaguer P, Yarmush ML & Nahmias Y, (2010) Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: Role of PPAR α , PPAR γ and LXR α . In: *PLoS ONE*, 5(8), S. 1–9.
- Gomez F, Monsalve GC, Tse V, Saiki R, Weng E, Lee L, Srinivasan C, Frand AR & Clarke CF, (2012) Delayed accumulation of intestinal coliform bacteria enhances life span and stress resistance in *Caenorhabditis elegans* fed respiratory deficient *E. coli*. In: *BMC Microbiology*, 12(300), S. 1–16.
- Gong EJ, Park HR, Kim ME, Piao S, Lee E, Jo DG, Chung HY, Ha NC, Mattson MP & Lee J, (2011) Morin attenuates tau hyperphosphorylation by inhibiting GSK3 β . In: *Neurobiology of Disease*, 44(2), S. 223–230.
- Gong H, Zhang BK, Yan M, Fang PF, Li H De, Hu CP, Yang Y, Cao P, Jiang P & Fan XR, (2015) A protective mechanism of licorice (*Glycyrrhiza uralensis*): Isoliquiritigenin stimulates detoxification system via Nrf2 activation. In: *Journal of Ethnopharmacology*, 162, S. 134–139.

- Greilberger J, Koidl C, Greilberger M, Lamprecht M, Schroecksadel K, Leblhuber F, Fuchs D & Oettl K, (2008) Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. In: *Free Radical Research*, 42(7), S. 633–638.
- Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R & O'Neill C, (2005) Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. In: *Journal of Neurochemistry*, 93, S. 105–117.
- Gruber J, Ng LF, Poovathingal SK & Halliwell B, (2009) Deceptively simple but simply deceptive--Caenorhabditis elegans lifespan studies: considerations for aging and antioxidant effects. In: *FEBS letters*, 583(21), S. 3377–87.
- Grünz G, Haas K, Soukup S, Klingenspor M, Kulling SE, Daniel H & Spanier B, (2012) Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. In: *Mechanisms of Ageing and Development*, 133(1), S. 1–10.
- Haass C & Selkoe DJ, (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. In: *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(2), S. 101–12.
- Hajirahimkhan A, Simmler C, Dong H, Lantvit DD, Li G, Chen S-N, Nikolić D, Pauli GF, van Breemen RB, Dietz BM & Bolton JL, (2015) Induction of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) by Glycyrrhiza Species Used for Women's Health: Differential Effects of the Michael Acceptors Isoliquiritigenin and Licochalcone A. In: *Chemical Research in Toxicology*, 28(11), S. 2130–41.
- Halliwell B, (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? In: *Lancet*, 344(8924), S. 721–724.
- Halliwell B & Gutteridge JM, (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. In: *The Biochemical journal*, 219(1), S. 1–14.
- Hamaguchi T, Ono K, Murase A & Yamada M, (2009) Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid- β aggregation pathway. In: *The American Journal of Pathology*, 175(6), S. 2557–2565.
- Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M & Moilanen E, (2007) Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on i. In: *Mediators of Inflammation*, 2007, S. 1–10.
- Hanasaki Y, Ogawa S & Fukui S, (1994) The Correlation Between Active Oxygens Scavenging and Antioxidative Effects of Flavonoids. In: *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), S. 845–850.
- Hanneken A, Lin FF, Johnson J & Maher P, (2006) Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death. In: *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47(7), S. 3164–3177.
- Harman D, (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. In: *Journal of*

- Gerontology*, 11(3), S. 298–300.
- Harmon AW & Patel YM, (2004) Naringenin inhibits glucose uptake in MCF-7 breast cancer cells: A mechanism for impaired cellular proliferation. In: *Breast Cancer Research and Treatment*, 85(2), S. 103–110.
- He Y, Cao X, Guo P, Li X, Shang H, Liu J, Xie M, Xu Y & Liu X, (2017) Quercetin induces autophagy via FOXO1-dependent pathways and autophagy suppression enhances quercetin-induced apoptosis in PSMCs in hypoxia. In: *Free Radical Biology & Medicine*, 103(4), S. 165–176.
- Van Heemst D, Beekman M, Mooijaart SP, Heijmans BT, Brandt BW, Zwaan BJ, Slagboom PE & Westendorp RGJ, (2005) Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. In: *Aging Cell*, 4(2), S. 79–85.
- Heim KE, Tagliaferro AR & Bobilya DJ, (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), S. 572–584.
- Heinz S a, Henson D a, Nieman DC, Austin MD & Jin F, (2010) A 12-week supplementation with quercetin does not affect natural killer cell activity, granulocyte oxidative burst activity or granulocyte phagocytosis in female human subjects. In: *The British Journal of Nutrition*, 104, S. 849–857.
- Henderson ST & Johnson TE, (2001) Daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Current Biology*, 11(24), S. 1975–1980.
- Hengartner M & Horvitz HR, (1994) *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. In: *Cell Press*, 76, S. 666–676.
- Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM, Lovell M, Markesbery WR & Butterfield DA, (1995) Brain Regional Correspondence between Alzheimers-Disease Histopathology and Biomarkers of Protein Oxidation. In: *Journal of Neurochemistry*, 65, S. 2146–2156.
- Hertweck M, Göbel C & Baumeister R, (2004) *C. elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. In: *Developmental Cell*, 6(4), S. 577–588.
- Ho L, Ferruzzi MG, Janle EM, Wang J, Gong B, Chen T-Y, Lobo J, Cooper B, Wu QL, Talcott ST, Percival SS, Simon JE & Pasinetti GM, (2013) Identification of brain-targeted bioactive dietary quercetin-3-O-glucuronide as a novel intervention for Alzheimer's disease. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(2), S. 769–81.
- Hollman P & Katan M, (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. In: *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 51(8), S. 305–310.
- Honda Y & Honda S, (1999) The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. In: *FASEB journal :*

- official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(11), S. 1385–93.
- van Hoyweghen L, Biendl M & Heyerick A, (2010) Radical scavenging capacity of hop-derived products. In: *Brewing Science*, 63(January/ February 2010), S. 1–5.
- Hsu A, Murphy CT & Kenyon C, (2003) Regulation of Aging and Age-Related Disease by DAF-16 and Heat-Shock Factor. In: *Science*, 300(May 16), S. 1142–1145.
- Hu JP, Calomme M, Lasure A, De Bruyne T, Pieters L, Vlietinck A & Vanden Berghe DA, (1995) Structure Activity Relationship of Flavonoids With Superoxide Scavenging Acitivity. In: *Biological Trace Element Research*, 47, S. 327–331.
- Huang CY, Chan CY, Chou IT, Lien CH, Hung HC & Lee MF, (2013) Quercetin induces growth arrest through activation of FOXO1 transcription factor in EGFR-overexpressing oral cancer cells. In: *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(9), S. 1596–1603.
- Huebbe P, Wagner AE, Boesch-Saadatmandi C, Sellmer F, Wolfram S & Rimbach G, (2010) Effect of dietary quercetin on brain quercetin levels and the expression of antioxidant and Alzheimer's disease relevant genes in mice. In: *Pharmacological Research*, 61(3), S. 242–246.
- Hulme SE & Whitesides GM, (2011) Die Chemie und der Wurm: *Caenorhabditis elegans* als Plattform für das Zusammenführen von chemischer und biologischer Forschung. In: *Angewandte Chemie*, 123(21), S. 4870–4906.
- Hwang SL & Yen GC, (2009) Modulation of Akt, JNK, and p38 activation is involved in citrus flavonoid-mediated cytoprotection of PC12 cells challenged by hydrogen peroxide. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), S. 2576–2582.
- Iacono D, Markesbery WR, Gross M, Pletnikova O, Rudow G, Zandi P & Troncoso JC, (2009) The Nun Study. In: *Neurology*, 73(9), S. 665–673.
- Iida A, Usui T, Kalai FZ, Han J, Isoda H & Nagumo Y, (2015) Protective effects of *Nitraria retusa* extract and its constituent isorhamnetin against amyloid β -induced cytotoxicity and amyloid β aggregation. In: *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 79(9), S. 1548–1551.
- Ishige K, Schubert D & Sagara Y, (2001) Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. In: *Free Radical Biology & Medicine*, 30(4), S. 433–446.
- Ishii N, Takahashi K, Tomita S, Keino T, Honda S, Yoshino K & Suzuki K, (1990) A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Mutation Research*, 237, S. 165–171.
- Jagota S & Rajadas J, (2012) Effect of phenolic compounds against A β aggregation and A β -induced toxicity in transgenic *C. elegans*. In: *Neurochemical Research*, 37(1), S. 40–8.
- Jorgensen EM & Mango SE, (2002) The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature Reviews. Genetics*, 3(5), S. 356–69.
- Jung SY, Kim HJ, Lee J, Cho J, Lee YS & Jin C, (2012) Neuroprotective Effects of Quercetin 3-O-

- Methyl Ether, Quercetin and (±) -Dihydroquercetin in a Rat Model of Transient Focal Cerebral Ischemia. In: *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33(7), S. 2443–2446.
- Kaltalioglu K & Coskun-Cevher S, (2016) Potential of morin and hesperidin in the prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity. In: *Renal Failure*, 6049(July), S. 1–9.
- Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG & Ahringer J, (2001) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Genome biology*, 2(1), S. 1–10.
- Kampkötter A, Gombitang Nkwonkam C, Zurawski RF, Timpel C, Chovolou Y, Wätjen W & Kahl R, (2007a) Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. In: *Archives of Toxicology*, 81(12), S. 849–58.
- Kampkötter A, Nkwonkam CG, Zurawski RF, Timpel C, Chovolou Y, Wätjen W & Kahl R, (2007b) Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. In: *Toxicology*, 234(1–2), S. 113–23.
- Kampkötter A, Pielarski T, Rohrig R, Timpel C, Chovolou Y, Wätjen W & Kahl R, (2007c) The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. In: *Pharmacological Research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 55(2), S. 139–47.
- Kampkötter A, Timpel C, Zurawski R, Ruhl S, Chovolou Y, Proksch P & Wätjen W, (2008) Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. In: *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B.*, 149, S. 314–323.
- Kang J, Lemaire H-G, Unterbeck A, Slabaum JM, Masters CL, Grzeschik K-H, Multhaup G, Beyreuther K & Müller-Hill B, (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. In: *Nature*, 325(19 Feb), S. 733–36.
- Kang JH, Ascherio A & Grodstein F, (2005) Fruit and vegetable consumption and cognitive decline in aging women. In: *Annals of Neurology*, 57(5), S. 713–720.
- Kang KA, Piao MJ, Kim KC, Cha JW, Zheng J, Yao CW, Chae S & Hyun JW, (2014) Fisetin attenuates hydrogen peroxide-induced cell damage by scavenging reactive oxygen species and activating protective functions of cellular glutathione system. In: *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 50(1), S. 66–74.
- Kang SW, Baines IC & Rhee SG, (1998) Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. In: *Journal of Biological Chemistry*, 273(11), S. 6303–6311.
- Kanninen K, Heikkinen R, Malm T, Rolova T, Kuhmonen S, Leinonen H, Ylä-Herttuala S, Tanila H, Levonen A-L, Koistinaho M & Koistinaho J, (2009) Intrahippocampal injection of a lentiviral vector expressing Nrf2 improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer's disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), S. 16505–16510.
- Kanninen K, Malm TM, Jyrkkänen HK, Goldsteins G, Keksa-Goldsteine V, Tanila H, Yamamoto M, Ylä-

- Herttua S, Levonen AL & Koistinaho J, (2008) Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid. In: *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39(3), S. 302–313.
- Kawabata K, Sawada K, Ikeda K, Fukuda I, Kawasaki K, Yamamoto N & Ashida H, (2011) Prenylated chalcones 4-hydroxyderricin and xanthoangelol stimulate glucose uptake in skeletal muscle cells by inducing GLUT4 translocation. In: *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(3), S. 467–475.
- Kelényi G, (1967) Thioflavin S fluorescent and congo red anisotropic stainings in the histologic demonstration of amyloid. In: *Acta Neuropathologica*, 7(4), S. 336–348.
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A & Tabtiang R, (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. In: *Nature*, 366, S. 461–4.
- Khan MB, Khan MM, Khan A, Ahmed ME, Ishrat T, Tabassum R, Vaibhav K, Ahmad A & Islam F, (2012) Naringenin ameliorates Alzheimer's disease (AD)-type neurodegeneration with cognitive impairment (AD-TNDCI) caused by the intracerebroventricular- streptozotocin in rat model. In: *Neurochemistry International*, 61(7), S. 1081–1093.
- Khan N, Syed DN, Ahmad N & Mukhtar H, (2013) Fisetin: a dietary antioxidant for health promotion. In: *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(2), S. 151–62.
- Kim H, Park BS, Lee KG, Cheol YC, Sung SJ, Kim YH & Lee SE, (2005) Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of β -amyloid. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), S. 8537–8541.
- Kim S, Choi KJ, Cho S-J, Yun S-M, Jeon J-P, Koh YH, Song J, Johnson GVW & Jo C, (2016) Fisetin stimulates autophagic degradation of phosphorylated tau via the activation of TFEB and Nrf2 transcription factors. In: *Scientific Reports*, 6, S. 1–13.
- Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y & Ruvkun G, (1997) Daf-2, an Insulin Receptor-Like Gene That Regulates Longevity and Diapause in *Caenorhabditis elegans*. In: *Science*, 277(August), S. 942–946.
- Klotz L, Sánchez-ramos C, Prieto-arroyo I, Urbánek P, Steinbrenner H & Monsalve M, (2015) Redox Biology Redox regulation of FoxO transcription factors. In: *Redox Biology*, 6, S. 51–72.
- Kong Y, Li K, Fu T, Wan C, Zhang D & Song H, (2016) Quercetin ameliorates A β toxicity in *Drosophila* AD model by modulating cell cycle-related protein expression. In: *Oncotarget*, 7(42), S. 67716–31.
- Konishi Y, (2005) Transepithelial transport of microbial metabolites of quercetin in intestinal Caco-2 cell monolayers. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), S. 601–607.
- Kretschmar G, Zierau O, Wober J, Tischer S, Metz P & Vollmer G, (2010) Prenylation has a compound specific effect on the estrogenicity of naringenin and genistein. In: *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 118(1–2), S. 1–6.
- Kuhnert N, (2013) Polyphenole: Vielseitige Pflanzeninhaltsstoffe. In: *Chemie in unserer Zeit*, 47, S. 80–91.
- Kupfer R, Swanson L, Chow S, Staub RE, Yan LZ, Cohen I & Christians U, (2008) Oxidative in vitro

- metabolism of liquiritigenin, a bioactive compound isolated from the Chinese herbal selective estrogen β -receptor agonist MF101. In: *Drug Metabolism and Disposition*, 36(11), S. 2261–2269.
- LaFerla FM, Green KN & Oddo S, (2007) Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. In: *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(July), S. 499–509.
- Lee-Hilz YY, Boerboom AMJF, Westphal AH, Van Berkel WJH, Aarts JMMJG & Rietjens IMCM, (2006) Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. In: *Chemical Research in Toxicology*, 19(11), S. 1499–1505.
- Lee EH, Kim HJ, Song YS, Jin C, Lee K-T, Cho J & Lee YS, (2003) Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. In: *Archives of Pharmacal Research*, 26(12), S. 1018–1023.
- Lee KM, Lee Y, Chun HJ, Kim AH, Kim JY, Lee JY, Ishigami A & Lee J, (2016) Neuroprotective and anti-inflammatory effects of morin in a murine model of Parkinson's disease. In: *Journal of Neuroscience Research*, 0, S. 1–14.
- Lee SE, Jeong S II, Yang H, Park CS, Jin YH & Park YS, (2011) Fisetin induces Nrf2-mediated HO-1 expression through PKC-delta and p38 in human umbilical vein endothelial cells. In: *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(9), S. 2352–2360.
- Lee SS, Kennedy S, Tolonen AC & Ruvkun G, (2003) DAF-16 Target Genes That Control *C. elegans* Life-Span and Metabolism. In: *Science*, 300(April), S. 644–647.
- Lei Y, Chen J, Zhang W, Fu W, Wu G, Wei H, Wang Q & Ruan J, (2012) In vivo investigation on the potential of galangin, kaempferol and myricetin for protection of d-galactose-induced cognitive impairment. In: *Food Chemistry*, 135(4), S. 2702–2707.
- Lemańska K, van der Woude H, Szymusiak H, Boersma MG, Gliszczyńska-Swigło A, Rietjens IMCM & Tyrakowska B, (2004) The effect of catechol O-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin - a mechanistic insight. In: *Free Radical Research*, 38(6), S. 639–647.
- Lenaerts I, Walker GA, Van Hoorebeke L, Gems D & Vanfleteren JR, (2008) Dietary restriction of *Caenorhabditis elegans* by axenic culture reflects nutritional requirement for constituents provided by metabolically active microbes. In: *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(3), S. 242–52.
- Letenneur L, Proust-Lima C, Le Gouge A, Dartigues JF & Barberger-Gateau P, (2007) Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. In: *American Journal of Epidemiology*, 165(12), S. 1364–71.
- Li J, Tewari M, Vidal M & Sylvia Lee S, (2007) The 14-3-3 protein FTT-2 regulates DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. In: *Developmental Biology*, 301(1), S. 82–91.
- Li J, Zhu F, Lubet RA, De Luca A, Grubbs C, Ericson ME, D'Alessio A, Normanno N, Dong Z & Bode AM, (2013) Quercetin-3-methyl ether inhibits lapatinib-sensitive and -resistant breast cancer cell growth by inducing G(2)/M arrest and apoptosis. In: *Molecular Carcinogenesis*, 52(2), S. 134–43.
- Li Q, Liu Y & Sun M, (2016) Autophagy and Alzheimer's Disease. In: *Cellular and Molecular*

Neurobiology, 37, S. 377–388.

- Li X, Wang H, Gao Y, Li L, Tang C, Wen G, Zhou Y, Zhou M, Mao L & Fan Y, (2016) Protective Effects of Quercetin on Mitochondrial Biogenesis in Experimental Traumatic Brain Injury via the Nrf2 Signaling Pathway. In: *Plos One*, 11(10), S. 1–12.
- Lin K, Dorman JB, Rodan A & Kenyon C, (1997) Daf-16: An HNF-3/forkhead Family Member That Can Function to Double the Life-Span of *Caenorhabditis elegans*. In: *Science*, 278(November), S. 1319–1322.
- Link C, (2003) Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. In: *Neurobiology of Aging*, 24(3), S. 397–413.
- Link CD, (2006) *C. elegans* models of age-associated neurodegenerative diseases: lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease. In: *Experimental Gerontology*, 41(10), S. 1007–13.
- Link CD, (1995) Expression of human β -amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), S. 9368–72.
- Link CD, Cypser JR, Johnson CJ & Johnson TE, (1999) Direct observation of stress response in *Caenorhabditis elegans* using a reporter transgene. In: *Cell Stress & Chaperones*, 4(4), S. 235–242.
- Link P, Wetterauer B, Fu Y & Wink M, (2015) Extracts of *Glycyrrhiza uralensis* and Isoliquiritigenin Counteract Amyloid- β Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. In: *Planta Medica*, 81(5), S. 357–362.
- Liu R-T, Zou L-B & Lü Q-J, (2009) Liquiritigenin inhibits A β (25-35)-induced neurotoxicity and secretion of A β (1-40) in rat hippocampal neurons. In: *Acta pharmacologica Sinica*, 30(7), S. 899–906.
- Liu RT, Tang JT, Zou LB, Fu JY & Lu QJ, (2011) Liquiritigenin attenuates the learning and memory deficits in an amyloid protein precursor transgenic mouse model and the underlying mechanisms. In: *European Journal of Pharmacology*, 669(1–3), S. 76–83.
- Liu X, Wang L, Chen J, Ling Q, Wang H, Shilin L, Li L, Yang S, Xia M & Jing L, (2015) Estrogen receptor β agonist enhances temozolomide sensitivity of glioma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway. In: *Molecular Medicine Reports*, 11(2), S. 1516–1522.
- Luchsinger JA, T., Luchsinger JA, Tang MX, Shea S & Mayeux R, (2003) Antioxidant vitamin intake and risk of Alzheimer disease. In: *Archives of Neurology*, 60(2), S. 203–208.
- Lynn DA & Curran SP, (2015) The SKN-1 hunger games: May the odds be ever in your favor. In: *Worm*, 4(3), S. e1078959-1–4.
- Ma Y, Ge A, Zhu W, Liu YN, Ji NF, Zha WJ, Zhang JX, Zeng XN & Huang M, (2016) Morin attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by modulating oxidative stress-responsive MAPK signaling. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, S. 1–13.
- Machiela E, Dues DJ, Senchuk MM & Van Raamsdonk JM, (2016) Oxidative stress is increased in *C.*

- C. elegans* models of Huntington's disease but does not contribute to polyglutamine toxicity phenotypes. In: *Neurobiology of Disease*, 96, S. 1–11.
- Madduma Hewage SRK, Piao MJ, Kang KA, Ryu YS, Fernando PMDJ, Oh MC, Park JE, Shilnikova K, Moon YJ, Shin DO & Hyun JW, (2016) Galangin Activates the ERK/AKT-Driven Nrf2 Signaling Pathway to Increase the Level of Reduced Glutathione in Human Keratinocytes. In: *Biomolecules & Therapeutics*, 8, S. 1–8.
- Madduma Hewage SRK, Piao MJ, Kim KC, Cha JW, Han X, Choi YH, Chae S & Hyun JW, (2015) Galangin (3,5,7-trihydroxyflavone) shields human keratinocytes from ultraviolet B-induced oxidative stress. In: *Biomolecules & Therapeutics*, 23(2), S. 165–73.
- Maher P, Akaishi T & Abe K, (2006) Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), S. 16568–73.
- Maher P, Dargusch R, Bodai L, Gerard PE, Purcell JM & Lawrence Marsh J, (2011) Erk activation by the polyphenols fisetin and resveratrol provides neuroprotection in multiple models of Huntington's disease. In: *Human Molecular Genetics*, 20(2), S. 261–270.
- Maier W, Adilov B, Regenass M & Alcedo J, (2010) A neuromedin u receptor acts with the sensory system to modulate food type-dependent effects on *C. elegans* lifespan. In: *PLoS Biology*, 8(5), S. 1–18.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C & Jiménez L, (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. In: *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, S. 727–47.
- Manach C, Texier O, Régéat F, Agullo G, Demigné C & Rémésy C, (1996) Dietary quercetin is recovered in rat plasma as conjugated derivatives of isorhamnetin and quercetin. In: *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(7), S. 375–380.
- Manchope MF, Calixto-Campos C, Coelho-Silva L, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Georgetti SR, Baracat MM, Casagrande R & Verri WA, (2016) Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-K-ATP Channel Signaling Pathway. In: *Plos One*, 11(4), S. 1–20.
- Maruyama H, Sumitou Y, Sakamoto T, Araki Y & Hara H, (2009) Antihypertensive effects of flavonoids isolated from brazilian green propolis in spontaneously hypertensive rats. In: *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32(7), S. 1244–1250.
- Mathur A, Rizvi F & Kakkar P, (2016) PHLPP2 down regulation influences nuclear Nrf2 stability via Akt-1/Gsk3 β /Fyn kinase axis in acetaminophen induced oxidative renal toxicity: Protection accorded by morin. In: *Food and Chemical Toxicology*, 89, S. 19–31.
- Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickancaité E & Segura-Aguilar J, (1999) Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. In: *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1–2), S. 107–116.
- Milligan S, Kalita J, Pocock V, Van de Kauter V, Stevens J, Deinzer M, Rong H & De Keukeleira D,

- (2000) The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(12), S. 4912–4915.
- Min BS, Cuong TD, Lee JS, Shin BS, Woo MH & Hung TM, (2010) Cholinesterase inhibitors from *Cleistocalyx operculatus* buds. In: *Archives of Pharmacal Research*, 33(10), S. 1665–1670.
- Miranda CL, Aponso GLM, Stevens JF, Deinzer ML & Buhler DR, (2000) Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. In: *Cancer Letters*, 149(1–2), S. 21–29.
- Moltke LL von, Weemhoff JL, Bedir E, Khan I a, Harmatz JS, Goldman P & Greenblatt DJ, (2004) Inhibition of human cytochromes P450 by components of *Ginkgo biloba*. In: *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(8), S. 1039–1044.
- Morris MC, (2016) Nutrition and risk of dementia: Overview and methodological issues. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1367(1), S. 31–37.
- Morris MC, Evans D a, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, Wilson RS & Scherr PA, (2002) Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. In: *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 287(24), S. 3230–3237.
- Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL & Wilson RS, (2006) Associations of vegetable and fruit consumption with age-related cognitive change. In: *Neurology*, 67(8), S. 1370–1376.
- Morris MC, Tangney CC, Wang Y, Sacks FM, Bennett DA & Aggarwal NT, (2015) MIND diet associated with reduced incidence of Alzheimer's disease. In: *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 11(9), S. 1007–14.
- Mukai R, Fujikura Y, Murota K, Uehara M, Minekawa S, Matsui N, Kawamura T, Nemoto H & Terao J, (2013) Prenylation enhances quercetin uptake and reduces efflux in Caco-2 cells and enhances tissue accumulation in mice fed long-term. In: *The Journal of Nutrition*, 143, S. 1558–64.
- Mukai R, Horikawa H, Fujikura Y, Kawamura T, Nemoto H, Nikawa T & Terao J, (2012) Prevention of Disuse Muscle Atrophy by Dietary Ingestion of 8-Prenylnaringenin in Denervated Mice. In: *PLoS ONE*, 7(9), S. 1–11.
- Müller UC & Zheng H, (2012) Physiological functions of APP family proteins. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2), S. 1–17.
- Mulvihill EE, Allister EM, Sutherland BG, Telford DE, Sawyez CG, Edwards JY, Markle JM, Hegele R a & Huff MW, (2009) Naringenin Prevents Dyslipidemia, Apolipoprotein B Overproduction, and Hyperinsulinemia in LDL Receptor-Null Mice With Diet-Induced Insulin Resistance. In: *Diabetes*, 58(10), S. 2198–2210.
- Mungrue IN & Bredt DS, (2004) nNOS at a glance : implications for brain and brawn nNOS Signaling. In: *Journal of Cell Science*, 117 (13), S. 2627–2629.
- Myara I, Pico I, Védie B & Moatti N, (1993) A method to screen for the antioxidant effect of compounds

- on Low-Density Lipoprotein (LDL): Illustration with flavonoids. In: *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 30(2), S. 69–73.
- Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N & Shirvany H, (2003) Anti-oxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation. In: *Molecular and Cellular Biochemistry*, 246(1–2), S. 193–196.
- Nagele RG, D'Andrea MR, Anderson WJ & Wang H-Y, (2002) Intracellular accumulation of β -amyloid(1–42) in neurons is facilitated by the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. In: *Neuroscience*, 110(2), S. 199–211.
- Naldi M, Fiori J, Pistolozzi M, Drake AF, Bertucci C, Wu R, Mlynarczyk K, Filipek S, Simone A De & Andrisano V, (2012) Amyloid β -Peptide 25–35 Self-Assembly and Its Inhibition: A Model Undecapeptide System to Gain Atomistic and Secondary Structure Details of the Alzheimer ' s Disease Process and Treatment. In: *ACS Chemical Neuroscience*, 3(11), S. 952–962.
- Nekohashi M, Ogawa M, Ogihara T, Nakazawa K, Kato H, Misaka T, Abe K & Kobayashi S, (2014) Luteolin and quercetin affect the cholesterol absorption mediated by epithelial cholesterol transporter Niemann-Pick C1-Like 1 in Caco-2 cells and rats. In: *PLoS ONE*, 9(5), S. 1–9.
- Nicolini F, Burmistrova O, Marrero MT, Torres F, Hernández C, Quintana J & Estévez F, (2013) Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by the flavonoid tamarixetin on human leukemia cells. In: *Molecular Carcinogenesis*, 53(April), S. 1–12.
- O'Neill C, Kiely AP, Coakley MF, Manning S & Long-Smith CM, (2012) Insulin and IGF-1 signalling: longevity, protein homeostasis and Alzheimer's disease. In: *Biochemical Society Transactions*, 40(4), S. 721–7.
- Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, 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*. In: *Nature*, 389(10), S. 994–9.
- Ola MS, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Abuohashish HM, Parmar MY, Alhomida AS & Ahmed MM, (2014) Flavonoid, morin inhibits oxidative stress, inflammation and enhances neurotrophic support in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. In: *Neurological Sciences*, 35(7), S. 1003–1008.
- Ono K, Condron MM & Teplow DB, (2009) Structure – neurotoxicity relationships of amyloid β -protein oligomers. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35), S. 14745–50.
- Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiike Y, Zhu L, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki JI, Nishijo H, Takashima A, Teplow DB, Zagorski MG & Yamada M, (2012) Phenolic compounds prevent amyloid β -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. In: *Journal of Biological Chemistry*, 287(18), S. 14631–14643.
- Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H & Yamada M, (2003) Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. In: *Journal of Neurochemistry*, 87(1), S. 172–181.
- von Otter M, Landgren S, Nilsson S, Zetterberg M, Celojovic D, Bergström P, Minthon L, Bogdanovic

- N, Andreassen N, Gustafson DR, Skoog I, Wallin A, Tasa G, Blennow K, Nilsson M, Hammarsten O & Zetterberg H, (2010) Nrf2-encoding NFE2L2 haplotypes influence disease progression but not risk in Alzheimer's disease and age-related cataract. In: *Mechanisms of Ageing and Development*, 131(2), S. 105–110.
- Padurariu M, Ciobica A, Lefter R, Serban IL, Stefanescu C & Chirita R, (2013) The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. In: *Psychiatria Danubina*, 25(4), S. 401–409.
- Pallauf K & Rimbach G, (2013) Autophagy, polyphenols and healthy ageing. In: *Ageing Research Reviews*, 12(1), S. 237–252.
- Park JY, Kang KA, Kim KC, Cha JW, Kim EH & Hyun JW, (2013) Morin Induces Heme Oxygenase-1 via ERK-Nrf2 Signaling Pathway. In: *Journal of Cancer Prevention*, 18(3), S. 249–56.
- Park T-S, Ryu Y-K, Park H-Y, Kim J, Go J, Noh J-R, Kim Y-H, Hwang J, Choi D-H, Oh W-K, Lee C-H & Kim K-S, (2017) Humulus japonicus inhibits the progression of Alzheimer's disease in a APP/PS1 transgenic mouse model. In: *International Journal of Molecular Medicine*, 39, S. 21–30.
- Park Y & Lee CY, (1996) Identification of Isorhamnetin 4'-Glucoside in Onions. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, S. 34–36.
- Partridge L & Gems D, (2002) Mechanisms of ageing : public or private? In: *Nature Reviews. Genetics*, 3(March), S. 165–175.
- Pereira RB, Sousa C, Costa A, Andrade PB & Valentão P, (2013) Glutathione and the antioxidant potential of binary mixtures with flavonoids: Synergisms and antagonisms. In: *Molecules*, 18(8), S. 8858–8872.
- Pietrocola F, Mariño G, Lissa D, Vacchelli E, Malik SA, Niso-Santano M, Zamzami N, Galluzzi L, Maiuri MC & Kroemer G, (2012) Pro-autophagic polyphenols reduce the acetylation of cytoplasmic proteins. In: *Cell Cycle*, 11(20), S. 3851–3860.
- Pietsch K, Saul N, Chakrabarti S, Stürzenbaum SR, Menzel R & Steinberg CEW, (2011) Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. In: *Biogerontology*, 12(4), S. 329–47.
- Pietsch K, Saul N, Menzel R, Stürzenbaum SR & Steinberg CEW, (2009) Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. In: *Biogerontology*, 10(5), S. 565–78.
- Podder B, Song HY & Kim YS, (2014) Naringenin exerts cytoprotective effect against paraquat-induced toxicity in human bronchial epithelial BEAS-2B cells through NRF2 activation. In: *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5), S. 605–613.
- Possemiers S, Bolca S, Grootaert C, Heyerick A, Decroos K, Dhooge W, De Keukeleire D, Rabot S, Verstraete W & Van de Wiele T, (2006) The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine. In: *The Journal of Nutrition*, 136(7), S. 1862–1867.

- Prasad KN, (2016) Simultaneous activation of Nrf2 and elevation of antioxidant compounds for reducing oxidative stress and chronic inflammation in human Alzheimer's disease. In: *Mechanisms of Ageing and Development*, 153, S. 41–47.
- Qin S, Chen J, Tanigawa S & Hou DX, (2013) Microarray and pathway analysis highlight Nrf2/ARE-mediated expression profiling by polyphenolic myricetin. In: *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(3), S. 435–446.
- Qiu S, Sun G, Zhang Y, Li X & Wang R, (2016) Involvement of the NF- κ B signaling pathway in the renoprotective effects of isorhamnetin in a type 2 diabetic rat model. In: *Biomedical Reports*, 4(5), S. 628–634.
- Rafat HS, Josiane C & Pierre C, (1987) Radical scavenging activity of flavonoids. In: *Phytochemistry*, 26(9), S. 2489–2491.
- Ramsey CP, Glass CA, Montgomery MB, Lindl KA, Ritson GP, Chia LA, Hamilton RL, Chu CT & Jordan-Sciutto KL, (2007) Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. In: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(1), S. 75–85.
- Rauha J-PP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P & Kahkonen M, (2000) Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. In: *International Journal of Food Microbiology*, 56(1), S. 3–12.
- Rebolledo DL, Aldunate R, Kohn R, Neira I, Minniti AN & Inestrosa NC, (2011) Copper Reduces A β Oligomeric Species and Ameliorates Neuromuscular Synaptic Defects in a *C. elegans* Model of Inclusion Body Myositis. In: *The Journal of Neuroscience*, 31(28), S. 10149–10158.
- Regitz C, Dußling LM & Wenzel U, (2014) Amyloid-beta (A β 1-42)-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is inhibited by the polyphenol quercetin through activation of protein degradation pathways. In: *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(10), S. 1931–40.
- Reinke SN, Hu X, Sykes BD & Lemire BD, (2010) *Caenorhabditis elegans* diet significantly affects metabolic profile, mitochondrial DNA levels, lifespan and brood size. In: *Molecular Genetics and Metabolism*, 100(3), S. 274–282.
- Renugadevi J & Prabu SM, (2009) Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. In: *Toxicology*, 256(1–2), S. 128–134.
- Rice-Evans CA, Miller NJ & Paganga G, (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. In: *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), S. 933–56.
- Roberts RO, Geda YE, Cerhan JR, Knopman DS, Cha RH, Christianson TJH, Pankratz VS, Ivnik RJ, Boeve BF, O'Connor HM & Petersen RC, (2010) Vegetables, Unsaturated Fats, Moderate Alcohol Intake, and Mild Cognitive Impairment. In: *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 29(5), S. 413–423.
- Roshanzamir F & Yazdanparast R, (2014) Quercetin attenuates cell apoptosis of oxidant-stressed SK-N-MC cells while suppressing up-regulation of the defensive element, HIF-1 α . In: *Neuroscience*, 277, S. 780–793.

- Rubio S, Quintana J, Eiroa JL, Triana J & Estévez F, (2007) Acetyl derivative of quercetin 3-methyl ether-induced cell death in human leukemia cells is amplified by the inhibition of ERK. In: *Carcinogenesis*, 28(10), S. 2105–2113.
- Rubio S, Quintana J, López M, Eiroa JL, Triana J & Estévez F, (2006) Phenylbenzopyrones structure-activity studies identify betuletol derivatives as potential antitumoral agents. In: *European Journal of Pharmacology*, 548(1–3), S. 9–20.
- Sabogal-Guáqueta AM, Muñoz-Manco JI, Ramírez-Pineda JR, Lamprea-Rodriguez M, Osorio E & Cardona-Gómez GP, (2015) The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. In: *Neuropharmacology*, 93, S. 134–45.
- Sahu BD, Kalvala AK, Koneru M, Kumar JM, Kuncha M, Rachamalla SS & Sistla R, (2014) Ameliorative effect of fisetin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats via modulation of NF- κ B activation and antioxidant defence. In: *PLoS ONE*, 9(9), S. 1–15.
- Salih DAM & Brunet A, (2008) FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. In: *Current Opinion in Cell Biology*, 20(2), S. 126–136.
- Sasaoka N, Sakamoto M, Kanemori S, Kan M, Tsukano C, Takemoto Y & Kakizuka A, (2014) Long-term oral administration of hop flower extracts mitigates alzheimer phenotypes in mice. In: *PLoS ONE*, 9(1), S. 1–12.
- Saul N, Pietsch K, Menzel R & Steinberg CEW, (2008) Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: is DAF-16 involved? In: *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(10), S. 611–3.
- Scarmeas N, Stern Y, Tang M & Luchsinger JA, (2011) Mediterranean Diet and Risk for Alzheimer's Disease Nikolaos. In: *Annals of Neurology*, 59(6), S. 912–921.
- Schieber A, Keller P, Streker P, Klaiber I & Carle R, (2002) Detection of isorhamnetin glycosides in extracts of apples (*Malus domestica* cv. „Brettacher“) by HPLC-PDA and HPLC-APCI-MS/MS. In: *Phytochemical Analysis*, 13(2), S. 87–94.
- Sehmisch S, Hammer F, Christoffel J, Seidlova-Wuttke D, Tezval M, Wuttke W, Stuermer KM & Stuermer EK, (2008) Comparison of the phytohormones genistein, resveratrol and 8-prenylnaringenin as agents for preventing osteoporosis. In: *Planta Medica*, 74(8), S. 794–801.
- Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI & Milner J a, (2007) A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9), S. 567–79.
- Selkoe DJ, (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. In: *Science*, 298(October 25), S. 789–791.
- Selkoe DJ, Hardy J, Selkoe D & Hardy J, (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer ' s disease at 25 years. In: *EMBP Molecular Medicine*, 8(6), S. 595–608.
- Semwal DK, Semwal RB, Combrinck S & Viljoen A, (2016) Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. In: *Nutrients*, 8(2), S. 1–31.

- Seo S & Jeong G, (2015) Fisetin inhibits TNF- α -induced inflammatory action and hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human keratinocyte HaCaT cells through PI3K / AKT / Nrf-2-mediated heme oxygenase-1 expression. In: *International Immunopharmacology*, 29(2), S. 246–253.
- Serrano F & Klann E, (2004) Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. In: *Ageing Research Reviews*, 3(4), S. 431–443.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-munoz A, Nina E, Smith I, Brett FM, Farrell M a, Rowan MJ, Lemere C a, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL & Selkoe DJ, (2008) Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer brain impair synaptic plasticity and memory. In: *Nature Medicine*, 14(8), S. 837–842.
- Shi C, Wu F & Xu J, (2010) H₂O₂ and PAF mediate A β 1-42-induced Ca²⁺ dyshomeostasis that is blocked by EGb761. In: *Neurochemistry International*, 56(8), S. 893–905.
- Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, Niidome T & Sugimoto H, (2008) Multifunction of myricetin on A β : Neuroprotection via a conformational change of A β and reduction of A β via the interference of secretases. In: *Journal of Neuroscience Research*, 86(2), S. 368–377.
- Shu YS, Tao W, Miao QB, Lu SC & Zhu YB, (2014) Galangin Dampens Mice Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. In: *Inflammation*, 37(5), S. 1661–1668.
- Sies H, (1985) Oxidative Stress: Introductory Remarks. In *Oxidative Stress*. Orlando, Florida: Academic Press Inc. (London) Ltd., S. 1–7.
- Sies H, (1993) Strategies of antioxidant defense. In: *European journal of biochemistry / FEBS*, 215(2), S. 213–219.
- Simonsen A, Cumming RC, Brech A, Isakson P, Schubert DR & Finley KD, (2008) Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. In: *Autophagy*, 4(2), S. 176–184.
- Sivakumar AS & Anuradha CV, (2011) Effect of galangin supplementation on oxidative damage and inflammatory changes in fructose-fed rat liver. In: *Chemico-Biological Interactions*, 193(2), S. 141–148.
- Sivakumar AS, Viswanathan P & Anuradha C V, (2010) Dose-dependent effect of galangin on fructose-mediated insulin resistance and oxidative events in rat kidney. In: *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 15(5), S. 224–32.
- Smirnova NA, Haskew-Layton RE, Basso M, Hushpulier DM, Payappilly JB, Speer RE, Ahn YH, Rakhman I, Cole PA, Pinto JT, Ratan RR & Gazaryan IG, (2011) Development of Nrf2-luciferase reporter and its application for high throughput screening and real-time monitoring of Nrf2 activators. In: *Chemistry and Biology*, 18(6), S. 752–765.
- Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA & Markesbery WR, (1991) Excess Brain Protein Oxidation and Enzyme Dysfunction in Normal Aging and in Alzheimer Disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(23), S. 10540–10543.

- Smith J V & Luo Y, (2003) Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761. In: *Journal of Alzheimer's Disease*, 5(4), S. 287–300.
- Smith PJ, Blumenthal JA, Babyak MA, Craighead L, Welsh-Bohmer KA, Browndyke JN, Strauman TA & Sherwood A, (2010) Effects of the dietary approaches to stop hypertension diet, exercise, and caloric restriction on neurocognition in overweight adults with high blood pressure. In: *Hypertension*, 55(6), S. 1331–8.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK & Greengard P, (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . In: *Nature Neuroscience*, 8(8), S. 1051–8.
- Stadtman ER, (2006) Protein oxidation and aging. In: *Free Radical Research*, 40(12), S. 1250–1258.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF & Nathan CF, (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(17), S. 7773–7777.
- Suh Y, Atzmon G, Cho M-O, Hwang D, Liu B, Leahy DJ, Barzilai N & Cohen P, (2008) Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 105(9), S. 3438–3442.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG & Thomson JN, (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Developmental Biology*, 100(1), S. 64–119.
- Sun J, Sun G, Meng X, Wang H, Luo Y, Qin M, Ma B, Wang M, Cai D, Guo P & Sun X, (2013) Isorhamnetin Protects against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity In Vivo and In Vitro. In: *PLoS ONE*, 8(5), S. 1–14.
- Surco-Laos F, Cabello J, Gómez-Orte E, González-Manzano S, González-Paramás AM, Santos-Buelga C & Dueñas M, (2011) Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. In: *Food & Function*, 2(8), S. 445–56.
- Surco-Laos F, Dueñas M, González-Manzano S, Cabello J, Santos-Buelga C & González-Paramás AM, (2012) Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. In: *Food Research International*, 46(2), S. 514–521.
- Surh Y-J, Kundu JK & Na H-K, (2008) Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. In: *Planta medica*, 74(13), S. 1526–39.
- Sweatt JD, (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. In: *Current Opinion in Neurobiology*, 14(3), S. 311–317.
- Takeara R, Albuquerque S, Lopes NP & Lopes JLC, (2003) Trypanocidal activity of *Lychnophora*

- staavioides Mart. (Vernonieae, Asteraceae). In: *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 10(6–7), S. 490–3.
- Tangney CC, Kwasny MJ, Li H, Wilson RS, Evans DA & Morris MC, (2011) Adherence to a Mediterranean-type dietary pattern and cognitive decline in a community population. In: *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(3), S. 601–607.
- Tangney CC, Li H, Wang Y, Barnes L, Schneider JA, Bennett DA & Morris MC, (2014) Relation of DASH- and Mediterranean-like dietary patterns to cognitive decline in older persons. In: *Neurology*, 83(16), S. 1410–1416.
- Tao L, Wang ZT, Zhu EY, Lu YH & Wei DZ, (2006) HPLC analysis of bioactive flavonoids from the rhizome of *Alpinia officinarum*. In: *South African Journal of Botany*, 72(1), S. 163–166.
- Tao W, Dong Y, Su Q, Wang H, Chen Y, Xue W, Chen C, Xia B, Duan J & Chen G, (2016) Liquiritigenin reverses depression-like behavior in unpredictable chronic mild stress-induced mice by regulating PI3K/Akt/mTOR mediated BDNF/TrkB pathway. In: *Behavioural Brain Research*, 308, S. 177–186.
- Taub J, Lau JF, Ma C, Hahn JH, Hoque R, Rothblatt J & Chalfie M, (1999) A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans* *daf-C* and *clk-1* mutants. In: *Nature*, 399(May 13), S. 162–166.
- The *C. elegans* Sequencing consortium, (1998) Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. In: *Science*, 282(December), S. 2012–2018.
- Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM & Selkoe DJ, (2006) Effects of secreted oligomers of amyloid β -protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. In: *The Journal of Physiology*, 572(Pt 2), S. 477–92.
- Trichopoulou A, Kyrozis A, Rossi M, Katsoulis M, Trichopoulos D, La Vecchia C & Lagiou P, (2015) Mediterranean diet and cognitive decline over time in an elderly Mediterranean population. In: *European Journal of Nutrition*, 54(8), S. 1311–1321.
- Trichopoulou A & Vasilopoulou E, (2000) Mediterranean diet and longevity. In: *The British Journal of Nutrition*, 84(2), S. S205-9.
- Tsai J, Grutzendler J, Duff K & Gan W-B, (2004) Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. In: *Nature Neuroscience*, 7(11), S. 1181–1183.
- Tseng H, Li C, Huang L, Chen C, Tsai C, Lin C & Hsu H, (2012) Quercetin 3-O-methyl ether protects FL83B cells from copper induced oxidative stress through the PI3K/Akt and MAPK/Erk pathway. In: *Toxicology and Applied Pharmacology*, 264(1), S. 104–113.
- Tullet JMA, Hertweck M, An JH, Baker J, Hwang JY, Liu S, Oliveira RP, Baumeister R & Blackwell TK, (2008) Direct Inhibition of the Longevity-Promoting Factor SKN-1 by Insulin-like Signaling in *C. elegans*. In: *Cell*, 132(6), S. 1025–1038.
- Vargas AJ & Burd R, (2010) Hormesis and synergy: Pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. In: *Nutrition Reviews*, 68(7), S. 418–428.

- Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP & Williams RL, (2000) Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine. In: *Molecular Cell*, 6, S. 909–919.
- Walle T, Ta N, Kawamori T, Wen X, Tsuji PA & Walle UK, (2007) Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids--methylated versus unmethylated flavones. In: *Biochemical Pharmacology*, 73(9), S. 1288–96.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva J V, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ & Selkoe DJ, (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. In: *Nature*, 416(6880), S. 535–539.
- Wang D, Lu J, Liu Y, Meng Q, Xie J, Wang Z & Teng L, (2014) Liquiritigenin induces tumor cell death through mitogen-Activated protein kinase- (MAPKs-) mediated pathway in hepatocellular carcinoma cells. In: *BioMed Research International*, 2014, S. 1–11.
- Wang H-J, Pao L-H, Hsiong C-H, Shih T-Y, Lee M-S & Hu OY-P, (2014) Dietary Flavonoids Modulate CYP2C to Improve Drug Oral Bioavailability and Their Qualitative/Quantitative Structure–Activity Relationship. In: *The AAPS Journal*, 16(2), S. 258–268.
- Wang RE, Kao JL, Hilliard CA, Pandita RK, Roti JL, Hunt CR & Taylor J, (2010) Inhibition of Heat Shock Induction of Heat Shock protein 70 and Enhancement of Heat Shock Protein 27 Phosphorylation by Quercetin Derivates. In: *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(7), S. 1912–1921.
- Wang ZH, Ah Kang K, Zhang R, Piao MJ, Jo SH, Kim JS, Kang SS, Lee JS, Park DH & Hyun JW, (2010) Myricetin suppresses oxidative stress-induced cell damage via both direct and indirect antioxidant action. In: *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29(1), S. 12–18.
- Wätjen W, Michels G, Steffan B, Niering P, Chovolou Y, Kampkötter A, Tran-Thi Q-H, Proksch P & Kahl R, (2005) Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. In: *The Journal of Nutrition*, 135, S. 525–531.
- Wei B-L, Lu C-M, Tsao L-T, Wang J-P & Lin C-N, (2001) *In Vitro* Anti-Inflammatory Effects of Quercetin 3- O -Methyl Ether and Other Constituents from *Rhamnus* Species. In: *Planta Medica*, 67(8), S. 745–747.
- Wen X & Walle T, (2006) Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. In: *Drug Metabolism and Disposition*, 34(10), S. 1786–1792.
- Willcox BJ, Donlon T a, He Q, Chen R, Grove JS, Yano K, Masaki KH, Willcox DC, Rodriguez B & Curb JD, (2008) FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37), S. 13987–92.
- Williams RJ & Spencer JPE, (2012) Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. In: *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), S. 35–45.
- Win MTT, Yamamoto Y, Munesue S, Han D, Harada S-I & Yamamoto H, (2013) Validated Liquid Culture Monitoring System for Lifespan Extension of *Caenorhabditis elegans* through Genetic and Dietary

- Manipulations. In: *Aging and Disease*, 4(4), S. 178–85.
- Wood J, Rogina B, Lavu S & Howitz K, (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. In: *Nature*, 430(August), S. 2–6.
- Van Der Woude H, Boersma MG, Vervoort J & Rietjens IMCM, (2004) Identification of 14 quercetin phase II mono- and mixed conjugates and their formation by rat and human phase II in vitro model systems. In: *Chemical Research in Toxicology*, 17(11), S. 1520–1530.
- Wu S, Yue Y, Peng A, Zhang L, Xiang J, Cao X, Ding H & Yin S, (2016) Myricetin ameliorates brain injury and neurological deficits via Nrf2 activation after experimental stroke in middle-aged rats. In: *Food Function*, 7, S. 2624–2634.
- Wu Y, Cao Z, Klein WL & Luo Y, (2010) Heat shock treatment reduces beta amyloid toxicity in vivo by diminishing oligomers. In: *Neurobiology of Aging*, 31(6), S. 1055–1058.
- Wu Y, Sun J, George J, Ye H, Cui Z, Li Z, Liu Q, Zhang Y, Ge D & Liu Y, (2016) Study of neuroprotective function of Ginkgo biloba extract (EG b761) derived-flavonoid monomers using a three-dimensional stem cell-derived neural model. In: *Biotechnology Progress*, 32(3), S. 735–744.
- Yang EJ, Park GH & Song KS, (2013) Neuroprotective effects of liquiritigenin isolated from licorice roots on glutamate-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells. In: *NeuroToxicology*, 39, S. 114–123.
- Yang JH, Kim SC, Kim KM, Jang CH, Cho SS, Kim SJ, Ku SK, Cho IJ & Ki SH, (2016) Isorhamnetin attenuates liver fibrosis by inhibiting TGF- β /Smad signaling and relieving oxidative stress. In: *European Journal of Pharmacology*, 783, S. 92–102.
- Yang JH, Shin BY, Han JY, Kim MG, Wi JE, Kim YW, Cho IJ, Kim SC, Shin SM & Ki SH, (2014) Isorhamnetin protects against oxidative stress by activating Nrf2 and inducing the expression of its target genes. In: *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274(2), S. 293–301.
- Yang W, Ma J, Liu Z, Lu Y, Hu B & Yu H, (2014) Effect of naringenin on brain insulin signaling and cognitive functions in ICV-STZ induced dementia model of rats. In: *Neurological Sciences*, 35(5), S. 741–751.
- Yang X, Jiang Y, Yang J, He J, Sun J, Chen F, Zhang M & Yang B, (2015) Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities. In: *Trends in Food Science and Technology*, 44(1), S. 93–104.
- Yang X, Yang L & Zheng H, (2010) Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. In: *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), S. 2374–2379.
- Yatin SM, Varadarajan S, Link CD & Butterfield DA, (1999) In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid β -peptide (1-42). In: *Neurobiology of Aging*, 20(3), S. 325–330.
- Yen K, Narasimhan SD & Tissenbaum H a, (2011) DAF-16/Forkhead box O transcription factor: many paths to a single Fork(head) in the road. In: *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(4), S. 623–34.

- Yu JY, Ha JY, Kim KM, Jung YS, Jung JC & Oh S, (2015) Anti-inflammatory activities of licorice extract and its active compounds, glycyrrhizic acid, liquiritin and liquiritigenin, in BV2 cells and mice liver. In: *Molecules*, 20(7), S. 13041–13054.
- Yuting C, Rongliang Z, Zhongjian J & Yong J, (1990) Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. In: *Free Radical Biology and Medicine*, 9(1), S. 19–21.
- Zbarsky V, Datla KP, Parkar S, Rai DK, Aruoma OI & Dexter DT, (2005) Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. In: *Free Radical Research*, 39(10), S. 1119–25.
- Zeng H, Huang P, Wang X, Wu J, Wu M & Huang J, (2015) Galangin-induced down-regulation of BACE1 by epigenetic mechanisms in SH-SY5Y cells. In: *Neuroscience*, 294, S. 172–181.
- Zhang R, Kang KA, Kang SS, Park JW & Hyun JW, (2011) Morin (2',3,4',5,7-Pentahydroxyflavone) Protected Cells against gamma-Radiation-induced oxidative stress. In: *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 108(1), S. 63–72.
- Zhang R, Kang KA, Piao MJ, Maeng YH, Lee KH, Chang WY, You HJ, Kim JS, Kang SS & Hyun JW, (2009) Cellular protection of morin against the oxidative stress induced by hydrogen peroxide. In: *Chemico-Biological Interactions*, 177(1), S. 21–27.
- Zhang Y, He Y, Yu H, Ma F, Wu J & Zhang X, (2015) Liquiritigenin Protects Rats from Carbon Tetrachloride Induced Hepatic Injury through PGC-1 α Pathway. In: *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, S. 1–9.
- Zhang Z, Peng X, Li S, Zhang N, Wang Y & Wei H, (2014) Isolation and identification of quercetin degrading bacteria from human fecal microbes. In: *PLoS ONE*, 9(3), S. 1–5.
- Zhao J, Song J, Pan S & Wang K, (2016) Treatment with Isorhamnetin Protects the Brain Against Ischemic Injury in Mice. In: *Neurochemical Research*, 41, S. 1939–1948.
- Zhao W-Q, De Felice FG, Fernandez S, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft G a & Klein WL, (2008) Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. In: *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(1), S. 246–260.
- Zhou A & Sadik OA, (2008) Comparative analysis of quercetin oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: A mechanistic study. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), S. 12081–12091.
- Zierau O, Morrissey C, Watson RWG, Schwab P, Kolba S, Metz P & Vollmer G, (2003) Antiandrogenic Activity of the Phytoestrogens Naringenin, 6-(1,1-Dimethylallyl)naringenin and 8-Prenylnaringenin. In: *Planta Medica*, 69(9), S. 856–858.

Bildernachweis:

Klitzsch M, Advanco GmbH (2014-2017) Hibiskus, Hibiscus. Online verfügbar unter <http://www.gartenlexikon.de/pflanzen/hibiskus.html>, zuletzt geprüft am 06.04.17.

Seidl S und F, 1A Garten Eickelmann (2017) Hopfendolde, Online verfügbar unter <http://www.eickelmann.de/Hopfen/>, zuletzt geprüft am 06.04.17

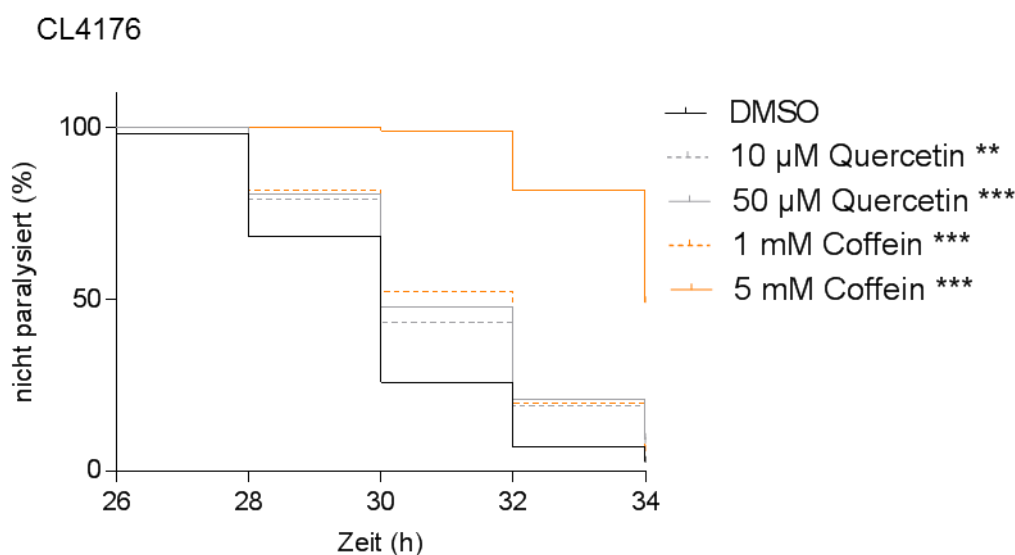
8 Anhang

8.1 Ergänzende Ergebnisse

8.1.1 Vorversuche:

8.1.1.1 Austestung des Paralyseverhaltens und Konzentrationsfindung

Die Behandlung mit 1 und 5 mM Coffein verzögerte den Paralyseeintritt der CL4176-Nematoden statistisch signifikant ($p \leq 0,001$) gegenüber der Kontrolle, wobei die Wirkung konzentrationsabhängig war. Die Inkubation mit 10 und 50 μM Quercetin zeigte ebenfalls eine statistisch signifikante ($p \leq 0,01$ bzw. $p \leq 0,001$) Rechtsverschiebung der Paralysekurve im Vergleich zur DMSO-Inkubation. Da unter diese Inkubationsbedingungen das Flavonol in einer Konzentration von 100 μM nicht stabil in Lösung gehalten werden konnte, wurden die Daten nicht ausgewertet.



Anh. Abbildung 57: Vorversuch zur Etablierung des Protokolls zur Untersuchung der $\text{A}\beta_{1-42}$ -induzierten Paralyse in *C. elegans* ($\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität).

Nematoden vom transgenen Stamm CL4176, die das humane $\text{A}\beta_{1-42}$ -Peptid temperaturabhängig in den Körperwandmuskelzellen exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit entsprechenden Konzentrationen Coffein, Quercetin oder 0,1 % DMSO bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 25°C für 24 h, wobei die Tiere zeitversetzt auf NGM-Platten überführt wurden. Mittels *touch-provoked movement* wurde das Eintreten der Paralyse festgestellt. Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven, $n = 3$ (ca. 40 Individuen/Versuch), ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ (Log-rank (Mantel-Cox) Test) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. Bei einer Konzentration von 100 μM Quercetin konnte die Löslichkeit nicht gewährleistet werden.

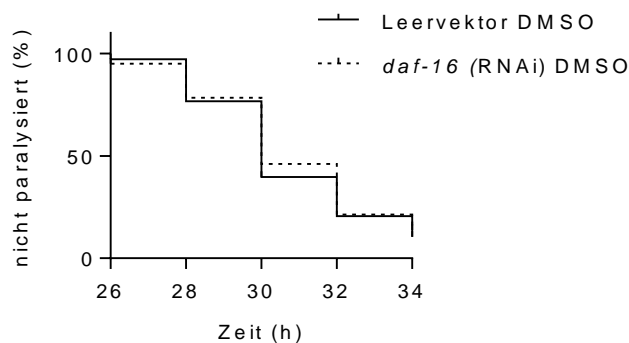
8.1.1.2 *Daf-16* RNAi-knock down

TJ356

**Anh. Abbildung 58: *Daf-16* RNAi-knock down in TJ356 Nematoden.**

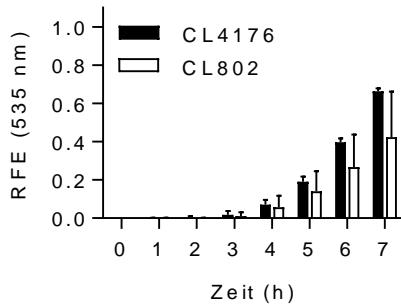
Nematoden vom Stamm TJ356, die ein Fusionsprotein aus GFP und DAF-16 überexprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit IPTG-induzierten hitzeinaktivierten HT115 *E. coli*s inkubiert. Anschließend erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung.

- Repräsentative Abbildung von Nematoden, die mit Leervektor HT115 *E. coli*s inkubiert wurden.
- Repräsentative Abbildung von Nematoden, die mit *daf-16* RNAi HT115 *E. coli*s inkubiert wurden.
- Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der GFP-Fluoreszenz, $n = 1$ (11 Individuen/Gruppe).

**Anh. Abbildung 59: $A\beta_{1-42}$ -induzierte Paralyse im *C. elegans* Stamm CL4176 unter *daf-16* RNAi-Bedingungen.**

Nematoden vom transgenen Stamm CL4176, die das humane $A\beta_{1-42}$ -Peptid temperaturabhängig in den Körperwandmuskelzellen exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h in flüssigen NGMk mit 0,1 % DMSO und hitzeinaktivierten IPTG-induzierten *daf-16*- oder Leervektor RNAi HT115 *E. coli*s bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine zeitversetzte Überführung der Tiere auf Platten, die bei 25°C gestellt wurden. 26 h nach der Temperaturerhöhung wurden die Nematoden auf Paralyse mittels *touch-provoked movement* überprüft. Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven, $n = 6$ (40 Individuen/Versuch) (Log-rank (Mantel-Cox) Test).

8.1.1.3 CL4176 DCF



Anh. Abbildung 60: Vergleichende Untersuchung der ROS-Akkumulation in den *C. elegans*-Stämmen CL4176 und CL802.

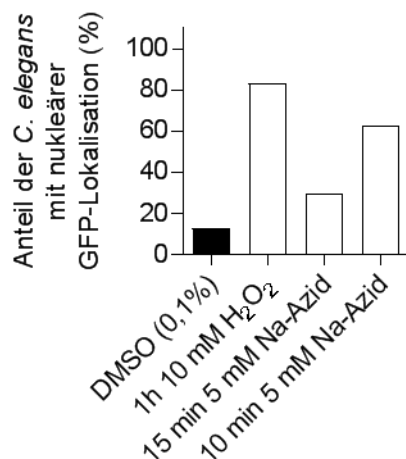
Nematoden vom Stamm CL4176, die das humane $A\beta_{1-42}$ -Peptid temperaturabhängig in den Körperwandmuskelzellen exprimieren, und Nematoden vom Kontrollstamm CL802 wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit 0,1 % DMSO bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 25°C für 24 h. Nach einem Waschschrift (PBST) wurden die Tiere in eine 384-Wellplate pipettiert und mit 50 μ M H_2DCF -DA versetzt. Die Fluoreszenz der Tiere wurde bei 37°C für 12 h im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 485 nm, Em.: 535 nm). Angegeben sind relative Mittelwerte \pm Standardabweichung bezogen auf den 8 h-Wert der Kontrolltiere, $n = 3$ (30 Individuen/Versuch), (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

8.1.1.4 Positivkontrolle für die SKN-1::GFP Translokation in den Zellkern

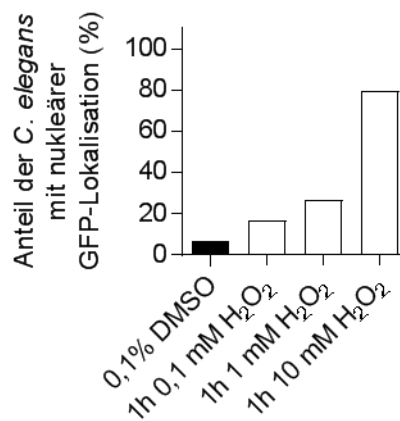
Zur Austestung einer Positivkontrolle für die Translokation von SKN-1::GFP in die Darmzellkerne der LD001-Nematoden wurden unterschiedliche Inkubationsschemata mit Na-Azid und H_2O_2 getestet (Anh. Abb. 62).

LD001

A.



B.



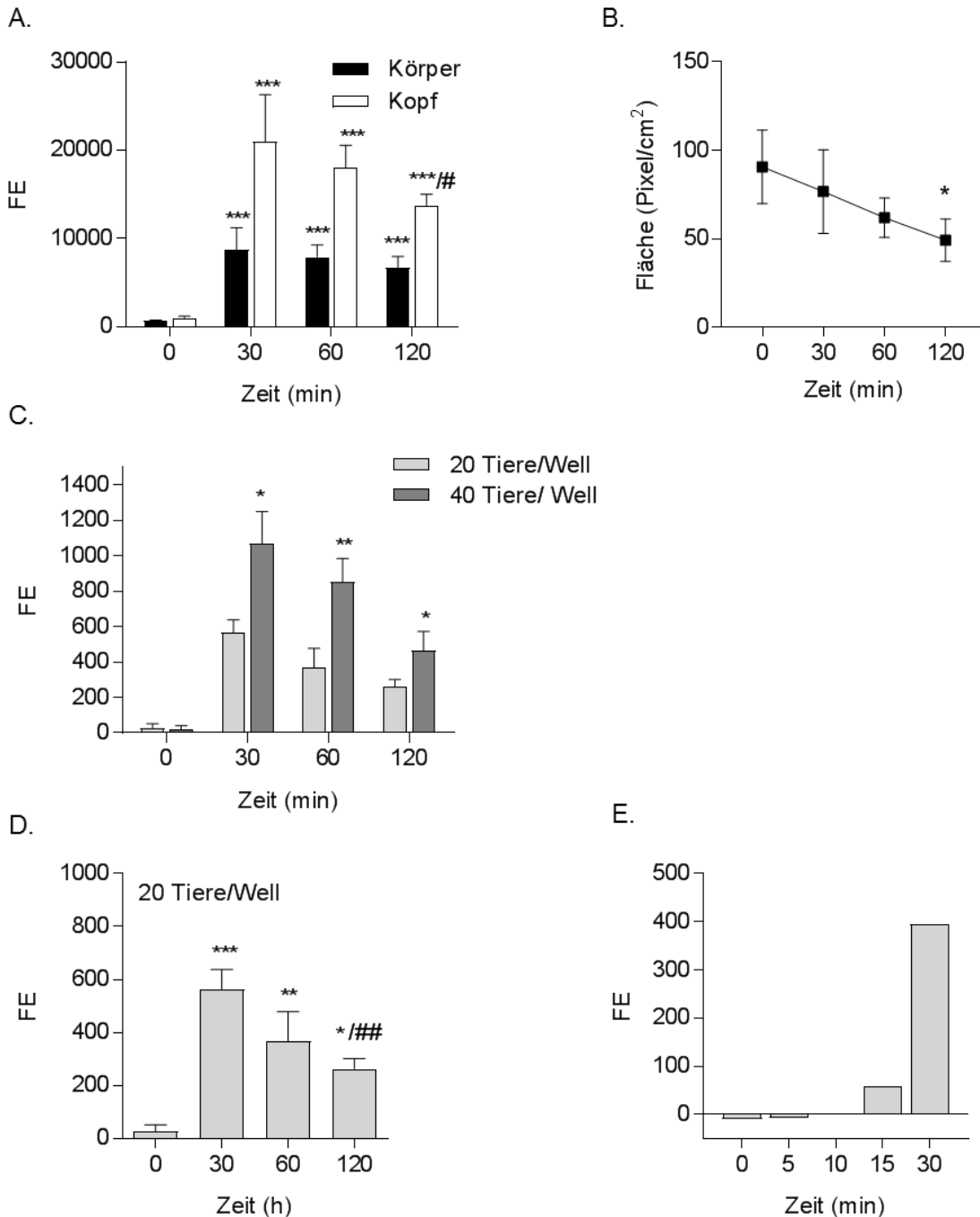
Anh. Abbildung 61: Einfluss von verschiedenen Stressoren auf die SKN-1::GFP-Lokalisation in *C. elegans*.

Nematoden vom Stamm LD001, die ein Fusionsprotein aus GFP und SKN-1 exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit DMSO inkubiert und anschließend mit unterschiedlichen Stressoren behandelt:

- H_2O_2 und Na-Azid,
- verschiedene H_2O_2 -Konzentrationen für 1h, $n = 1$ (30 Nematoden/Gruppe).

8.1.1.5 Etablierung der HSP-16.2::GFP-Messung im Plattenlesegerät

CL2070

**Anh. Abbildung 62. Vorversuch zur Etablierung der HSP-16.2::GFP-Messung in *C. elegans* mittels Plattenlesegerät.**

Nematoden vom transgenen Stamm CL2070, die ein Fusionsprotein aus HSP-16.2 und GFP exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit 0,1 % DMSO und hitzeinaktivierten OP50-1 *E. coli* in NGMk inkubiert. Für die HSP-16.2-Induktion wurde thermaler Stress appliziert.

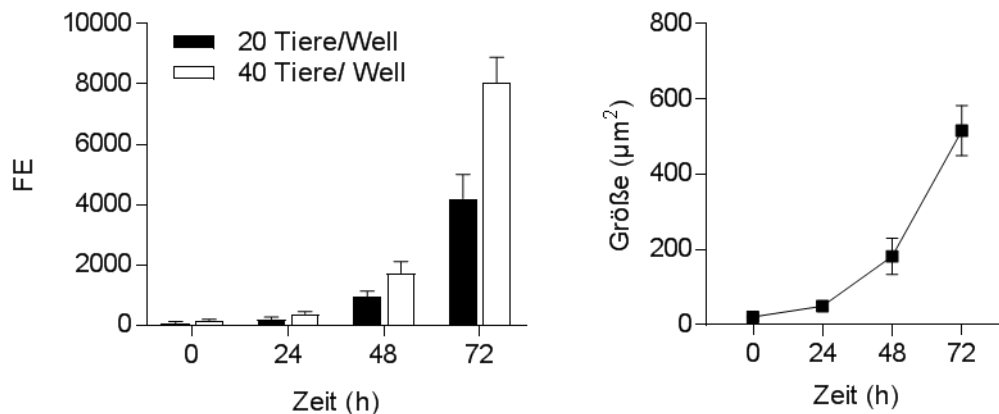
- A. Fluoreszenzmikroskopische Messung: Körper oder Kopf der Tiere wurden anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen mittels Densitometrie ausgewertet, $n = 4$ (20 Tiere/Gruppe und Versuch), $***p \leq 0,001$ im Vergleich zum jeweiligen 0 min-Wert, $\#p \leq 0,05$ im Vergleich zum jeweiligen 30 min-Wert (*one-way ANOVA* Bonferroni's multipler Vergleichstest).
- B. Größenmessung: Die Fläche der Tiere wurde anhand mikroskopischer Aufnahmen gemessen, $n = 4$ (20 Tiere/Gruppe und Versuch), $*p \leq 0,05$ im Vergleich zum 0 min-Wert, (*one-way ANOVA* Bonferroni's multipler Vergleichstest).

- C. Fluoreszenzmessung im Plattenlesegerät: 20 oder 40 Nematoden wurden in je ein Well einer 384-Wellplatte pipettiert und die Fluoreszenz (Ext.: 488 ± 9 nm, Em.: 511 ± 9 nm) im Plattenlesegerät gemessen. Die Messung von 20 Tieren wurde im Triplikate (60 Tiere/Versuch) und die Messung von 40 Tieren im Duplikate (80 Tiere/Versuch) durchgeführt, $n = 3$, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ im Vergleich zu 20 Tiere/Well m jeweiligen Zeitpunkt (*t*-test).
- D. Fluoreszenzmessung im Plattenlesegerät: Nematoden wurden für 0, 30, 60 und 120 min bei 35°C gestresst. Anschließend wurde die Fluoreszenz von 20 Nematoden/Well (Triplikate) im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 488 ± 9 nm, Em.: 511 ± 9 nm), *one-way* ANOVA Bonferroni's multipler Vergleichstest. $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$ im Vergleich 0 min-Wert, $\#p \leq 0,05$ im Vergleich zum 30 min-Wert (*one-way* ANOVA Bonferroni's multipler Vergleichstest).
- E. Fluoreszenzmessung im Plattenlesegerät: Nematoden wurden für 0, 5, 10, 15 und 30 min bei 35°C gestresst. Anschließend wurde die Fluoreszenz von 20 Nematoden/Well (Triplikate) im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 488 ± 9 nm, Em.: 511 ± 9 nm), $n = 1$.
- FE = Fluoreszenzeinheiten.

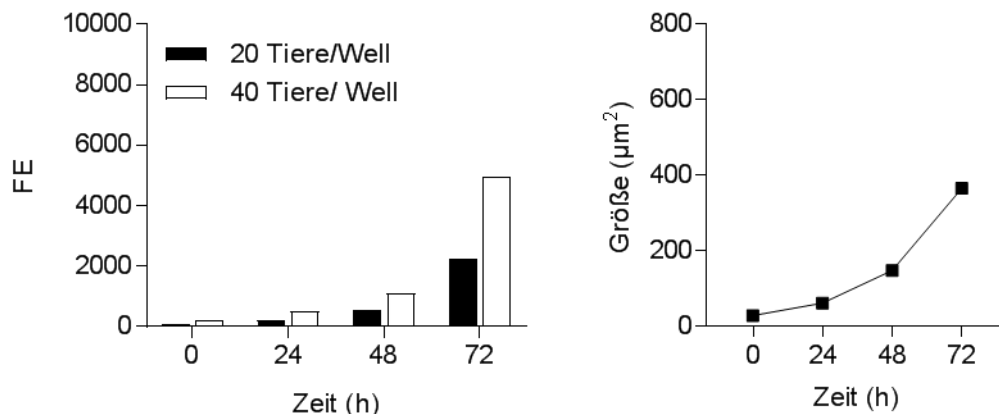
8.1.1.6 Etablierung der MYOSIN-4::GFP-Messung im Plattenlesegerät

PD4251

A.



B.



Anh. Abbildung 63: Vorversuch zur Etablierung der MYOSIN-3::GFP-Messung in *C. elegans* mittels Plattenlesegerät als Indikator für die Größe der Tiere.

Nematoden vom transgenen Stamm PD4251, die ein Fusionsprotein aus MYOSIN-3 und GFP exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium mit 0,1 % DMSO inkubiert.

A. Behandlung mit lebenden OP50-1 *E.colis*:

Links: Es erfolgte die tägliche Messung der GFP-Fluoreszenz im Plattenlesegerät (Ext.: 488 ± 9 nm, Em.: 511 ± 9 nm) von 20 (im Triplikate) oder 40 Tieren/Well (im Duplikate), $n = 2$.

Rechts: Gleichzeitig wurden von 20 Tiere unter dem binokularen Mikroskop fotografiert und anschließend die Größe der Nematoden gemessen, $n = 2$.

B. Behandlung mit hitzeinaktivierte OP50-1 *E.colis*:

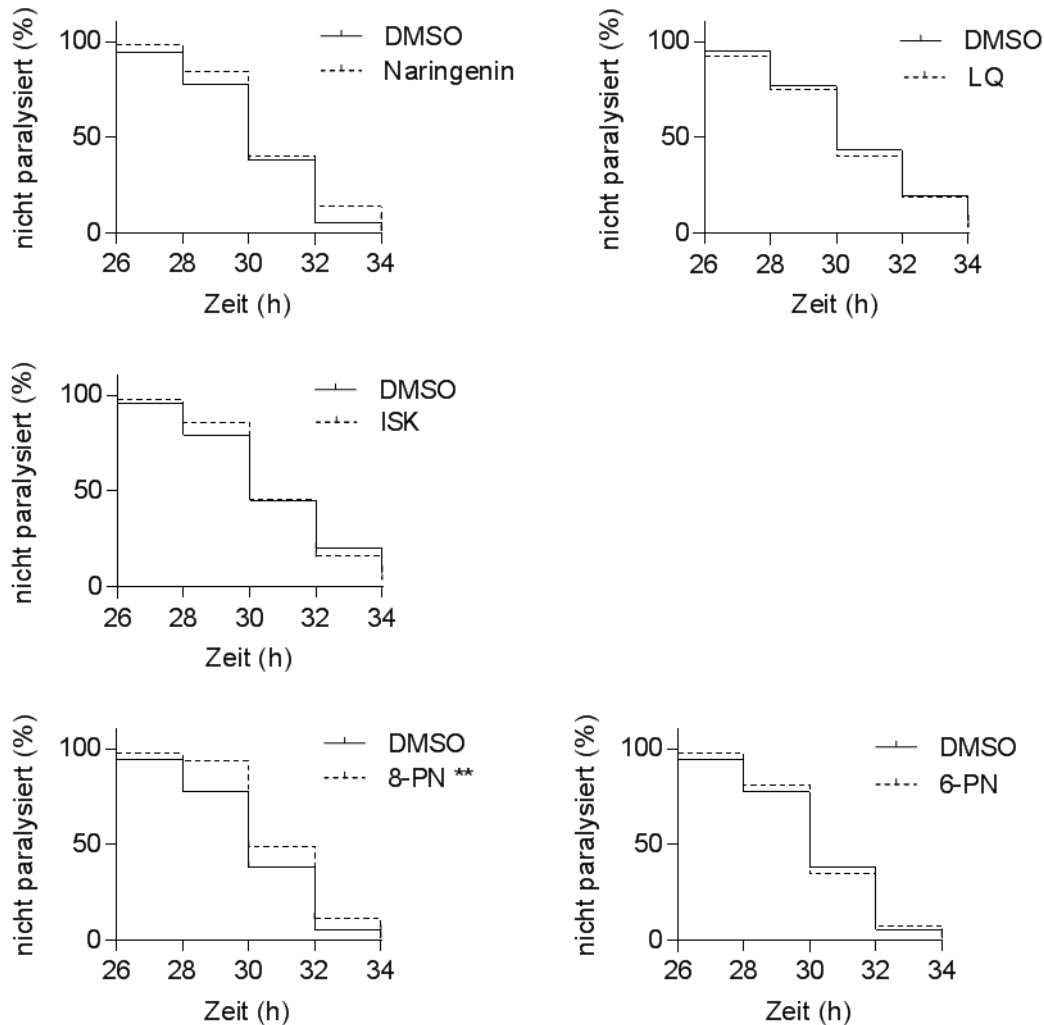
Links: Es erfolgte die tägliche Messung der GFP-Fluoreszenz im Plattenlesegerät (Ext.: 488 ± 9 nm, Em.: 511 ± 9 nm) von 20 (im Triplikate) oder 40 Tieren/Well (im Duplikate), $n = 1$.

Rechts: Gleichzeitig wurden von 20 Tiere unter dem binokularen Mikroskop fotografiert und anschließend die Größe der Nematoden gemessen, $n = 1$.

FE =Fluoreszenzeinheiten.

8.1.2 Einfluss von Flavanonen auf die $A\beta_{1-42}$ -Toxizität

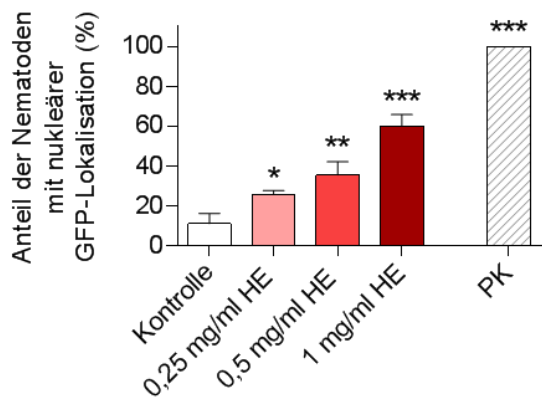
CL4176

**Anh. Abbildung 64: Einfluss von Flavanonen auf die $A\beta_{1-42}$ -induzierte Toxizität in *C. elegans*.**

Nematoden vom transgenen Stamm CL4176, die das humane $A\beta_{1-42}$ -Peptid temperaturabhängig in den Körperwandmuskelzellen exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit $50 \mu\text{M}$ des Flavonoids bzw. 0,1 % DMSO bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 25°C für 24 h, wobei die Tiere zeitversetzt auf NGM-Platten überführt wurden. Mittels *touch-provoked movement* wurde das Eintreten der Paralyse festgestellt. Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven, $n = 3$ (40 Individuen/Versuch), $**p \leq 0,01$ (Log-rank (Mantel-Cox) Test) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. Ergebnisse für Naringenin, 8-PN und 6-PN wurden von Gabriel Schulz im Rahmen einer Masterarbeit erstellt. DMSO = Dimethylsulfoxid, ISK = Isosakuranetin, PN = Prenylnaringenin.

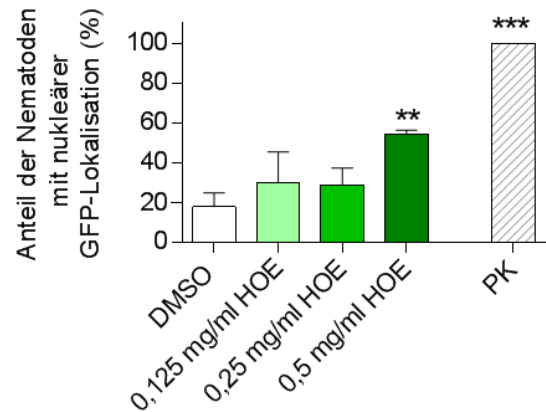
8.1.3 Modulation der zellulären DAF-16-Lokalisation in *C. elegans* durch Pflanzenextrakte

A.



Versuch	NGMk	0,25 mg/ml HBE	0,5 mg/ml HBE	1 mg/ml HBE	PK (5 min 37°C)
1	16,7	26,7	30,0	63,3	100
2	6,7	23,3	33,3	63,3	100
3	10,0	27,0	43,0	53,0	100

B.



Versuch	DMSO	0,125 mg/ml HOE	0,25 mg/ml HOE	0,5 mg/ml HOE	PK (5 min 37°C)
1	20,0	16,7	20,0	53,3	100
2	10,0	26,7	30,0	53,3	100
3	23,3	46,7	36,7	56,7	100

Anh. Abbildung 65: Einfluss von HE und HOE auf die zelluläre DAF-16-Lokalisation in *C. elegans* (Kurzzeitinkubation).

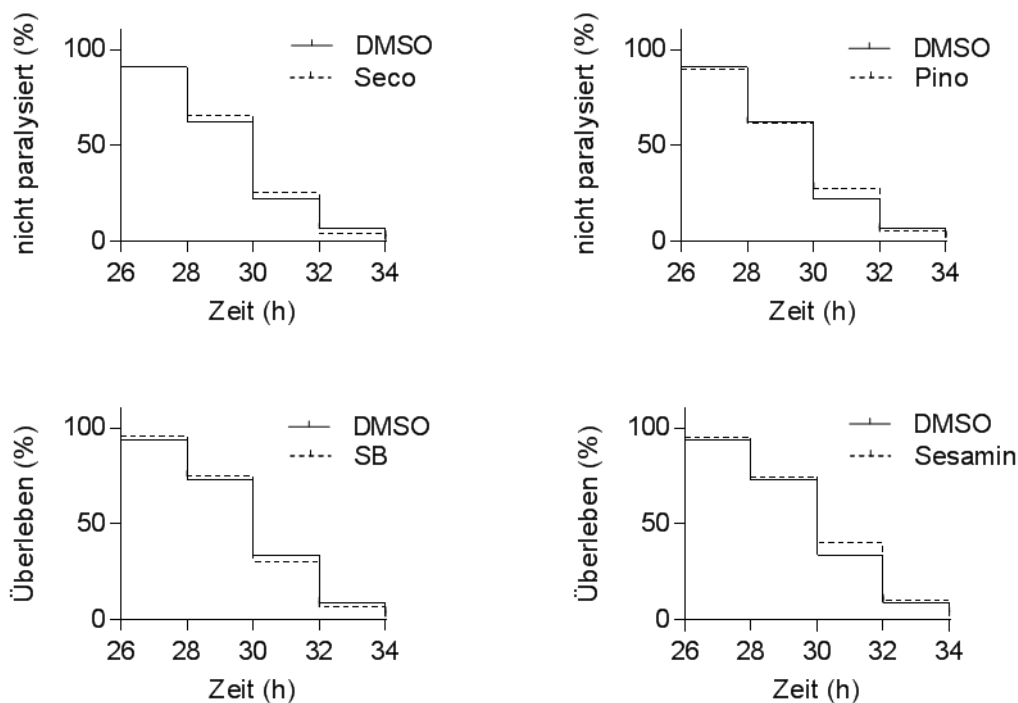
Nematoden vom transgenen Stamm TJ356, die ein Fusionsprotein aus DAF-16 und GFP überexprimieren, wurden ab dem L4-Stadium für 1 h mit A. HE oder B. HOE in unterschiedlichen Konzentrationen bzw. mit entsprechender Kontrolle bei 20°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Tiere. Angegeben sind die Mittelwerte der Fraktion mit nukleärer GFP-Lokalisation \pm Standardabweichung, $n = 3$ (30 Individuen/Versuch), $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$ (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. Die Daten zu dem Hibiskus-Extrakt wurden von Frau Nora Weldle im Rahmen ihrer Masterarbeit erstellt. DMSO = Dimethylsulfoxid, GFP = grün fluoreszierendes Protein, HOE = Hopfenextrakt.

8.1.4 Einfluss von Lignanene auf biologische Parameter in *C. elegans*

Neben den Flavonoiden wurden zusätzlich die Polyphenol-Klasse der Lignane in *C. elegans* untersucht. In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse zum Einfluss der ausgewählten Vertreter Secoisolariciresinol (Seco), Pinoresinol (Pino), Schisandrin B (SB) und Sesamin auf die A β ₁₋₄₂-Toxizität, ROS-Akkumulation, thermalen Stressresistenz und nukleären DAF-16-Lokalisation in *C. elegans* zusammengestellt. Neben dem Wildtypen wurde auch die oxidative Stress-sensitive *mev-1*-Mutante untersucht. Für das Lignan Pino wurde ebenfalls der Einfluss auf die Lebensspannen von wildtypischen Nematoden und der *mev-1*-Mutante analysiert.

8.1.4.1 Modulation der A β ₁₋₄₂-Toxizität im transgenen *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer

CL4176

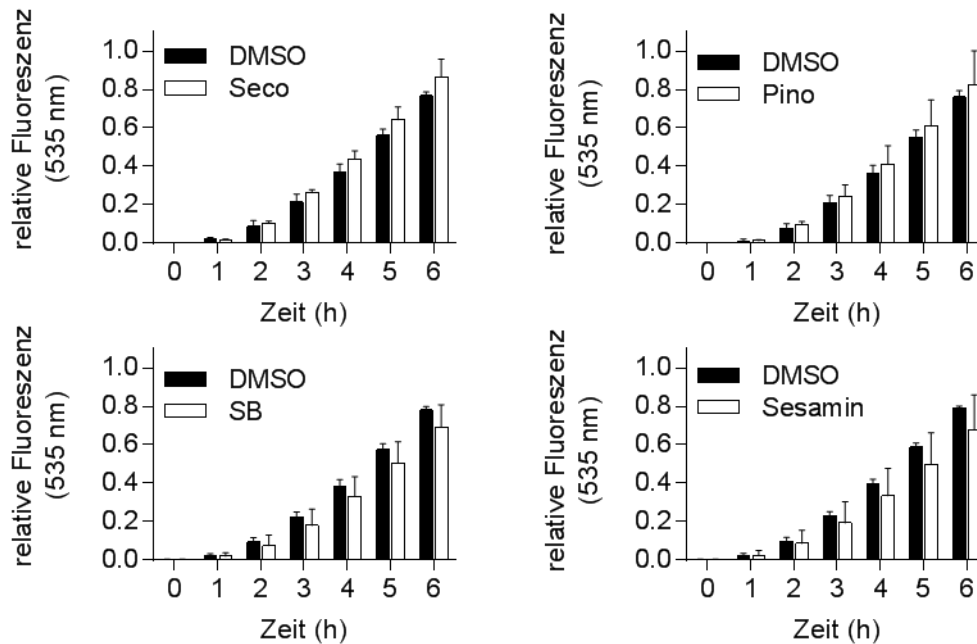


Anh. Abbildung 66: Lignane haben keinen Einfluss auf die A β ₁₋₄₂-Toxizität in *C. elegans*.

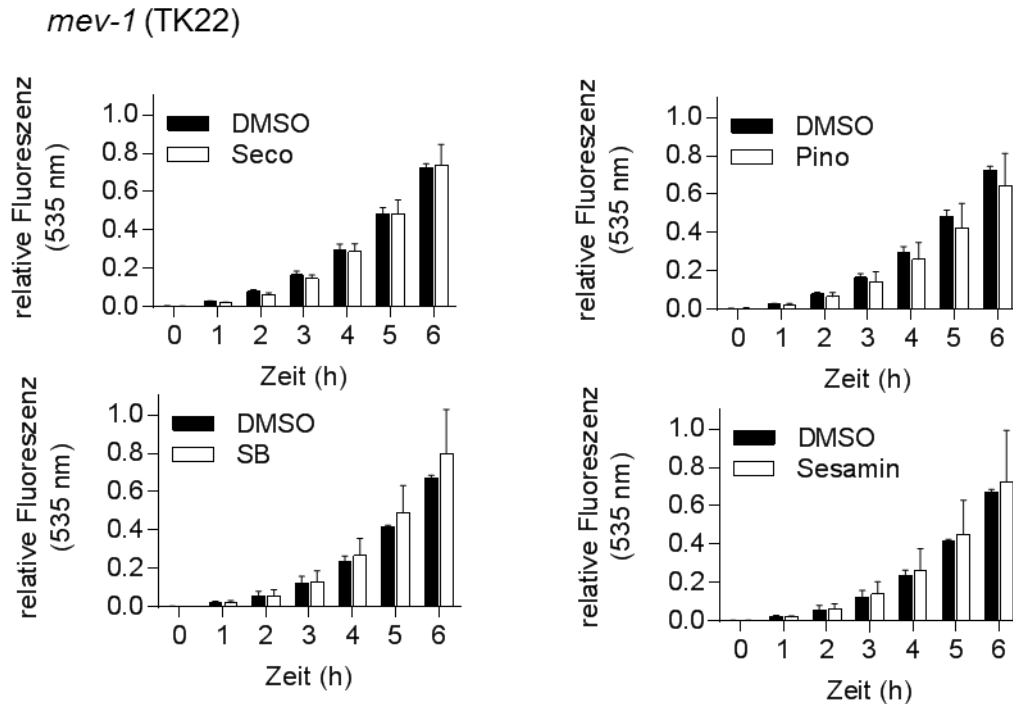
Nematoden vom transgenen Stamm CL4176, die das humane A β ₁₋₄₂-Peptid temperaturabhängig in den Körperwandmuskelzellen exprimieren, wurden ab dem Ei-Stadium für 64 h mit 50 μ M des Lignans bzw. DMSO (Seco und Pino mit 0,1 % und SB und Sesamin mit 0,5 % DMSO) bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 25°C für 24 h, wobei die Tiere zeitversetzt auf NGM-Platten überführt wurden. Mittels *touch-provoked movement* wurde das Eintreten der Paralyse festgestellt. Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven, n = 3 (40 Individuen/Versuch), (Log-rank (Mantel-Cox) Test) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. DMSO = Dimethylsulfoxid, Pino = Pinoresinol, SB = Schisandrin B, Seco = Secoisolariciresinol.

8.1.4.2 Modulation der ROS-Akkumulation im Wildtypen unter thermalem Stress

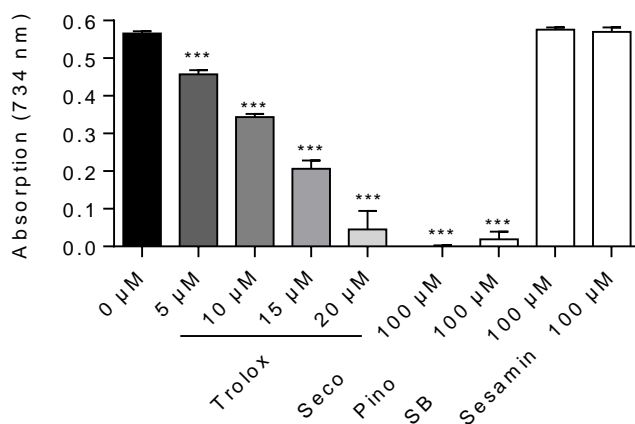
Wildtyp (N2)

**Anh. Abbildung 67: Lignane haben keinen Einfluss auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im wildtypischen *C. elegans*-Stamm unter thermalem Stress.**

Nematoden vom Stamm N2 wurden ab dem L4-Stadium für 48 h mit 100 μ M des Lignans bzw. DMSO (Seco und Pino mit 0,1 % und SB und Sesamin mit 1 % DMSO) bei 20°C inkubiert. Nach einem Waschschrift (PBST) wurden die Tiere in eine 384-Wellplate pipettiert und mit 50 μ M H₂DCF-DA versetzt. Die Fluoreszenz der Tiere wurde bei 37°C für 12 h im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 485 nm, Em.: 535 nm). Angegeben sind relative Mittelwerte \pm Standardabweichung bezogen auf den 8 h-Wert der Kontrolltiere, n = 3 (16 Individuen/Versuch), (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. DMSO = Dimethylsulfoxid, Pino = Pinoresinol, SB = Schisandrin B, Seco = Secoisolariciresinol.

8.1.4.3 Modulation der ROS-Akkumulation in der *mev-1*-Mutante**Anh. Abbildung 68: Lignane haben keinen Einfluss auf die intrazelluläre ROS-Konzentration in der *mev-1*-Mutante unter thermalem Stress.**

Nematoden vom Stamm TK22 wurden ab dem L4-Stadium für 48 h mit 100 μ M des Lignans bzw. DMSO (Seco und Pino mit 0,1 % und SB und Sesamin mit 1 % DMSO) bei 20°C inkubiert. Nach einem Waschschrift (PBST) wurden die Tiere in eine 384-Wellplate pipettiert und mit 50 μ M H₂DCF-DA versetzt. Die Fluoreszenz der Tiere wurde bei 37°C für 12 h im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 485 nm, Em.: 535 nm). Angegeben sind relative Mittelwerte \pm Standardabweichung bezogen auf den 8 h-Wert der Kontrolltiere, $n = 3$ (16 Individuen/Versuch), (*one-way* ANOVA mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. DMSO = Dimethylsulfoxid, Pino = Pinosin, SB = Schisandrin B, Seco = Secoisolariciresinol.

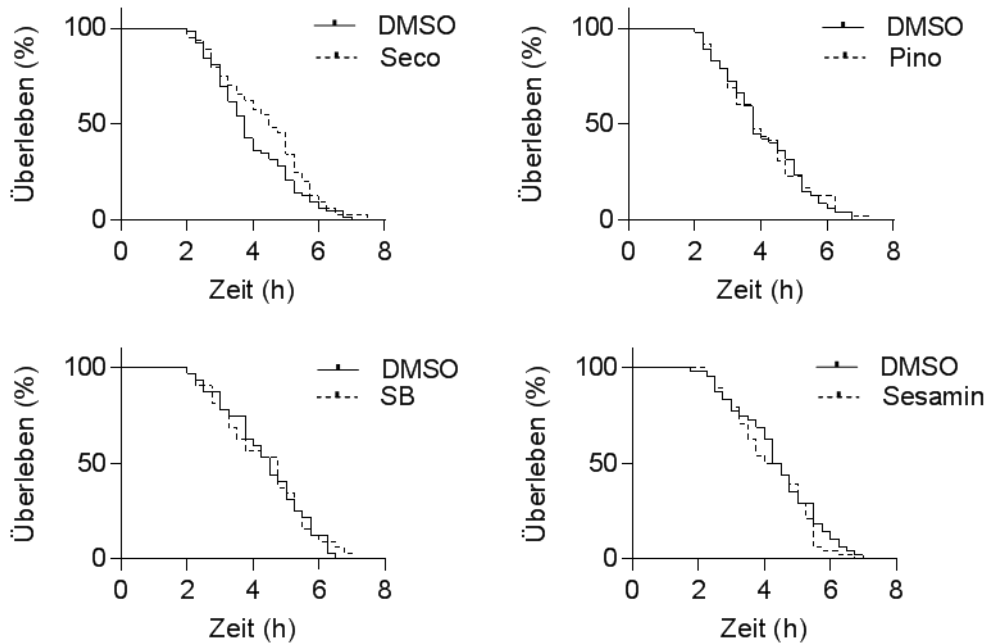
8.1.4.4 Bestimmung der radikalfangenden Kapazität *in vitro* (TEAC-Methode)**Anh. Abbildung 69: Antioxidative Kapazität von Lignan in vitro in einem zellfreien System. Pino und SB zeigen eine starke antioxidative Aktivität.**

Photometrische Bestimmung der Absorption des blau-grün gefärbten ABTS-Radikals nach sechsminütiger Inkubation mit 100 μ M Substanz. Die Abnahme der Absorption korreliert mit der antioxidativen Kapazität des Lignans. Für die Standardreihe wurde das synthetische Vitamin E-Derivat

TROLOX verwendet. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 3$, $***p \leq 0,001$ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (*one-way ANOVA* mit Bonferroni's multiplen Vergleichstest). Pino = Pinoresinol, SB = Schisandrin B, Seco = Secoisolariciresinol.

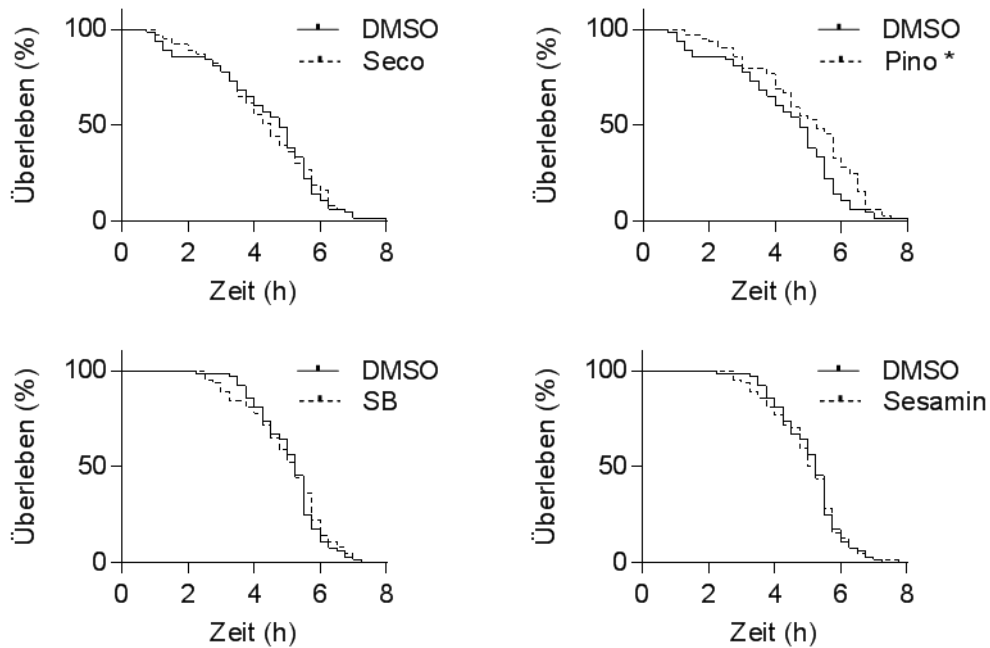
8.1.4.5 Modulation der thermalen Stressresistenz im Wildtypen

Wildtyp (N2)



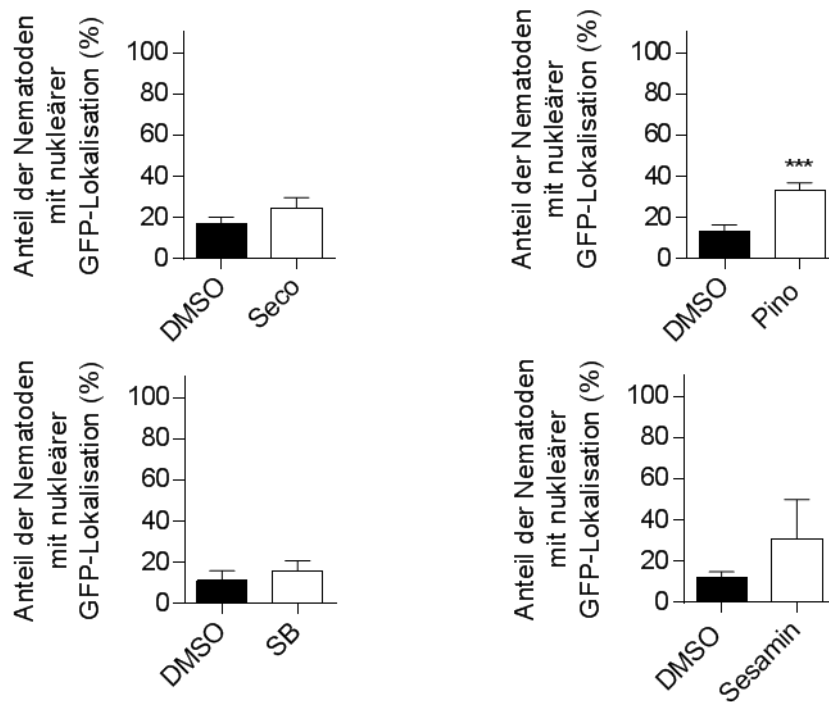
Anh. Abbildung 70: Lignanen haben keinen Einfluss auf das Überleben von wildtypischen *C. elegans* unter thermalem Stress.

Nematoden vom Stamm N2 wurden ab dem L4-Stadium für 48 h mit dem Lignan bzw. DMSO (Seco und Pino mit 0,1 % und SB und Sesamin mit 1 % DMSO) bei 20°C inkubiert. Nach einem Waschschrift (PBST) wurden die Tiere einzeln in je eine Kavität mit 9 μ l PBS einer 384-Wellplatte pipettiert. Anschließend wurde die SYTOX Green-Lösung in einer Endkonzentration von 1 μ M hinzugegeben, die Platte versiegelt und die Fluoreszenz bei 37°C für 12 h im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 485 nm, Em.: 535 nm). Aus den individuellen Fluoreszenzkurven wurden durch Festlegen von Schwellenwerten virtuelle Todeszeitpunkte Die Naringenin-Daten wurden von Herrn Gabriel Schulz im Rahmen seiner Masterarbeit erstellt. Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven, $n \geq 2$ (16 Individuen/Versuch), (Log-rank (Mantel-Cox Test)) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. DMSO = Dimethylsulfoxid, Pino = Pinoresinol, SB = Schisandrin B, Seco = Secoisolariciresinol.

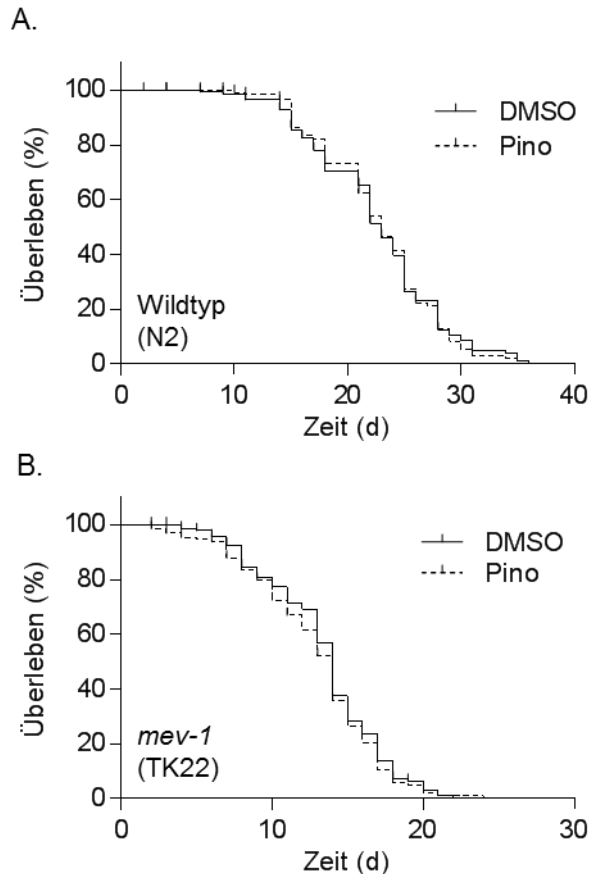
8.1.4.6 Modulation der thermalen Stressresistenz in der *mev-1*-Mutante*mev-1* (TK22)**Anh. Abbildung 71: Einfluss von Lignan auf das Überleben der *mev-1* Mutante unter thermalem Stress: die Inkubation mit Pino verlängert das Überleben unter thermalem Stress.**

Nematoden vom Stamm TK22 wurden ab dem L4-Stadium für 48 h mit dem Lignan bzw. DMSO (Seco und Pino mit 0,1 % und SB und Sesamin mit 1 % DMSO) bei 20°C inkubiert. Nach einem Waschschrift (PBST) wurden die Tiere einzeln in je eine Kavität mit 9 µl PBS einer 384-Wellplatte pipettiert. Anschließend wurde die SYTOX Green-Lösung in einer Endkonzentration von 1 µM hinzugegeben, die Platte versiegelt und die Fluoreszenz bei 37°C für 12 h im Plattenlesegerät gemessen (Ext.: 485 nm, Em.: 535 nm). Aus den individuellen Fluoreszenzkurven wurden durch Festlegen von Schwellenwerten virtuelle Todeszeitpunkte berechnet. Angegeben sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven, $n = 4$ (16 Individuen/Versuch), * $p \leq 0,05$ (Log-rank (Mantel-Cox) Test)) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. DMSO = Dimethylsulfoxid, Pino = Pinoresinol, SB = Schisandrin B, Seco = Secoisolariciresinol.

8.1.4.7 Modulation der zellulären DAF-16::GFP-Lokalisation (Kurzzeitinkubation)



Anh. Abbildung 72: Einfluss von Lignan auf die DAF-16::GFP-Lokalisation in *C. elegans* (Kurzzeitinkubation): die Inkubation mit Pino induziert die nukleäre DAF-16::GFP-Translokation. Nematoden vom transgenen Stamm TJ356, die ein Fusionsprotein aus DAF-16 und GFP überexprimieren, wurden ab dem L4-Stadium für 1 h mit 100 μ M Substanz bzw. 0,1 %- 1 % DMSO inkubiert. Anschließend erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Tiere. Angegeben sind die Mittelwerte der Fraktion mit nukleärer GFP-Lokalisation, $n = 3-4$ (30 Individuen/Versuch), *** $p \leq 0,001$ (*paired* t-test) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. DMSO = Dimethylsulfoxid, Pino = Pinosin, SB = Schisandrin B, Seco = Secoisolariciresinol.

8.1.4.8 Einfluss von Pino auf Lebensspanne im Wildtypen und in der *mev-1* Mutante

Anh. Abbildung 73: Die Pino-Behandlung hat keine Einfluss auf die Lebensspanne von A. wildtypischen (N2) und B. *mev-1*-defizienten (TK22) *C. elegans*.

Alterssynchrone L4 oder jung adulte Nematoden wurden in flüssigen Inkubationsmedium mit 100 μ M Pino bzw. 0,1 % DMSO und lebenden OP50-1 *E. colis* bei 25°C inkubiert. Das Medium wurde fünfmal pro Woche erneuert und die Nematoden auf Überleben mittels *touch-provoked movement* überprüft. In der reproduktiven Phase wurde zusätzlich 120 μ M FUDR eingesetzt, um eine Vermischung mit den Nachkommen zu verhindern. n = 3 (50 Individuen/ Versuch), (Log-rank (Mantel-Cox) Test) im Vergleich zur DMSO-Gruppe. DMSO = Dimethylsulfoxid, Pino = Pinoresinol.

8.2 Rohdaten

8.2.1 A β ₁₋₄₂-Toxizität im transgenen *C.elegans*-Modell für Morbus Alzheimer

Tabelle 8: Rohdaten zu Anh. Abb. 58 - Quercetin und Coffein, angegebene sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyisiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, C = Coffein, Q = Quercetin.

Versuch 1						Versuch 2					
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	10 μ M Q	50 μ M Q	1 mM C	5 mM C	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	10 μ M Q	50 μ M Q	1 mM C	5 mM C
26	1					28	1	1	1	1	
28	1	1	1	1		28	1	1		1	
28	1	1	1	1		28	1				
28	1	1	1	1		28	1				
28	1	1	1	1		30	1	1	1	1	
28	1	1	1	1		30	1	1	1	1	
28	1	1	1	1		30	1	1	1	1	
28	1	1	1	1		30	1	1	1	1	
28	1	1	1	1		30	1	1	1		
28	1	1	1	1		30	1	1			
28	1	1	1	1		30	1	1			
28	1	1	1	1		30	1	1			
28	1	1	1	1		30	1	1			
28	1	1	1	1		30	1	1			
30	1	1	1	1		30	1	1			
30	1	1	1	1		30	1				
30	1	1	1	1		30	1				
30	1	1	1	1		30	1				
30	1	1	1	1		30	1				
30	1	1	1	1		30	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1		32	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1		32	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1		32	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1		32	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1		32	1	1	1	1	
30	1	1	1	1		32	1	1	1	1	
30	1	1	1	1		32	1	1	1	1	
30	1	1	1	1		32	1	1	1	1	
30	1	1	1	1		32	1	1	1	1	
30	1	1	1	1		32	1	1	1	1	
30	1	1	1	1		32	1		1	1	
30	1	1	1	1		32	1		1	1	
32	1	1	1	1	1	32			1	1	
32	1	1	1	1	1	32			1	1	
32	1	1	1	1	1	32			1	1	
32	1	1	1	1	1	32			1	1	
32	1	1	1	1	1	32			1	1	
32	1	1	1	1	1	32			1	1	
32	1	1	1	1	1	32			1	1	
32	1	1	1	1	1	32			1	1	
32	1	1	1	1	1	34	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	34	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	34	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	34	1	1	1	1	1

32	1		1	1		34	0	1	1	1	1
32				1		34	0	1	1	1	1
32				1		34	0	1	1	1	1
32				1		34		0	1	1	1
32				1		34		0	1	1	1
32				1		34		0	0	0	1
32				1		34		0	0	0	1
32				1		34		0	0	0	1
32				1		34		0	0	0	0
34	1	1	1	1	1	34		0	0	0	0
34		1	1	1	1	34		0	0	0	0
34		1	1	1	1	34			0		0
34		0	1	1	1	34			0		0
34				0	1	34			0		0
34					1	34			0		0
34					1	34					0
34					1	34					0
34					1	34					0
34					1	34					0
34					1	34					0
34					1	34					0
34					1	34					0
34					1	34					0
34					1	34					0
34					0	34					0
34					0						
34					0						
34					0						
34					0						
34					0						
34					0						
34					0						
34					0						
34					0						
34					0						
34					0						
34					0						
34					0						
34					0						
34					0						
34					0						
34					0						

30	1		1	1	
30	1		1	1	
30	1		1	1	
30	1			1	
30	1				
32		1	1	1	1
32		1	1	1	1
32		1	1	1	1
32		1	1	1	1
32		1	1	1	1
32		1	1	1	1
32		1	1	1	1
32		1			1
32		1			1
32		1			1
32					1
32					1
32					1
34		1	1	1	1
34		1	0	1	1
34				1	1
34				1	1
34				1	1
34				0	1
34					1
34					1
34					1
34					1
34					0
34					0
34					0
34					0
34					0
34					0
34					0
34					0
34					0
34					0
34					0
34					0
34					0
34					0
34					0
34					0

Tabelle 9: Rohdaten zu Abb. 20 - Hibiskus -Extrakt, angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyisiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, C = Coffein, HE = Hibiskus-Extrakt, K = Kontrolle (NGM). Daten aus der Masterarbeit von Nora Weldle.

Versuch 1					Versuch 2				
Zeit (h)	K	0,5 mg/ml HE	1 mg/ml HE	1 mM C	Zeit (h)	K	0,5 mg/ml HE	1 mg/ml HE	1 mM C
28	1	1	1		26	1	1	1	
28	1	1			26	1			
28	1				28	1	1	1	1
28	1				28	1	1	1	1
30	1	1	1		28	1		1	
30	1	1	1		28	1		1	
30	1	1	1		28	1		1	
30	1	1	1		28	1			
30	1	1	1		30	1	1	1	1
30	1		1		30	1	1	1	1
32	1	1	1	1	30	1	1	1	1
32	1	1	1	1	30	1	1	1	
32	1	1	1	1	30	1	1	1	
32	1	1	1	1	30	1	1	1	
32	1	1			30	1	1	1	
32	1	1			30	1	1		
32	1	1			30	1	1		
32	1				30	1			
32	1				30	1			
32	1				30	1			
32	1				32	1	1	1	1
32	1				32	1	1	1	1
32	1				32	1	1	1	1
32	1				32	1	1	1	1
32	1				32	1	1	1	
34	1	1	1	1	32	1	1	1	
34	1	1	1	1	32	1		1	
34	1	1	1	1	32	1		1	
34	1	1	1	1	34	1	1	1	1
34	1	1	1	1	34	1	1	1	1
34		1	1	1	34		1		1
34		1	1	1	34		1		1
34		1			34				1
34		1			34				1
34	0	0	0	0	34	0	0	0	0
34	0	0	0	0	34	0	0	0	0
34	0	0	0	0	34	0	0	0	0
34	0	0	0	0	34	0	0	0	0
34	0	0	0	0	34	0	0	0	0
34	0	0	0	0	34	0	0	0	0

34	0	0	0	0	34	0	0	0	0
34	0	0	0	0	34	0	0	0	0
34	0	0	0	0	34	0	0	0	0
34	0	0	0	0	34	0	0	0	0
34		0	0	0	34		0	0	0
34		0	0	0	34		0	0	0
34		0	0	0	34		0	0	0
34		0	0	0	34		0	0	0
34		0	0	0	34		0	0	0
34		0	0	0	34		0	0	0
34		0	0	0	34		0	0	0
34		0	0	0	34		0	0	0
34			0	0	34		0		0
34			0	0	34				0
34			0	0	34				0
34			0	0	34				0
34				0	34				0
34				0	34				0
34				0	34				0
34				0	34				0
34				0					
34				0					
34				0					
34				0					

Versuch 3

Zeit (h)	K	0,5 mg/ml HE	1 mg/ml HE	1 mM C
28	1	1		
28	1	1		
28	1	1		
28	1			
28	1			
28	1			
30	1	1	1	1
30	1	1	1	1
30	1	1	1	1
30	1	1	1	1
30	1	1	1	1
30	1	1	1	
30	1	1	1	
30	1	1	1	
30		1		
32	1	1	1	1
32	1	1	1	1
32	1	1	1	
32	1	1	1	

32	1	1	1	
32	1	1	1	
32	1	1	1	
32	1	1	1	
32	1	1	1	
32	1	1	1	
32	1		1	
32			1	
32			1	
32			1	
34	1	1	1	1
34	1	1	1	1
34	1	1		1
34	1	1		
34	1			
34	1			
34	1			
34	0	0	0	0
34	0	0	0	0
34	0	0	0	0
34	0	0	0	0
34	0	0	0	0
34	0	0	0	0
34	0	0	0	0
34	0	0	0	0
34	0	0	0	0
34	0	0	0	0
34	0	0	0	0
34	0	0	0	0
34		0	0	0
34		0	0	0
34		0	0	0
34		0	0	0
34		0	0	0
34		0	0	0
34			0	0
34			0	0
34				0
34				0
34				0
34				0
34				0
34				0
34				0
34				0
34				0
34				0

34				0
----	--	--	--	---

Tabelle 10: Rohdaten zu Abb. 20 - Hopfenblüten-Extrakt, angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyisiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, HOE = Hopfen-Extrakt.

Versuch 1					Versuch 2				
Zeit (h)	DMSO (0,2 %)	0,125 mg/ml HOE	0,25 mg/ml HOE	0,5 mg/ml HOE	Zeit (h)	DMSO (0,2 %)	0,125 mg/ml HOE	0,25 mg/ml HOE	0,5 mg/ml HOE
26	1	1			26	1			
26	1	0			26				
28	1	1	1	1	26				
28	1	1	1	1	28	1	1	1	1
28	1	1	1	1	28	1	1	1	1
28	1	1	1	1	28	1	1		1
28	1	1	1	1	28	1	1		1
28	1	1	1	1	28	1			
28	1	1	1	1	28	1			
28	1	1	1	1	28	1			
28	1	1	1	1	28	1			
28	1	1	1	1	28	1			
28	1		1	1	28	1			
28	1		1	1	28	1			
28	1		1	1	28	1			
28	1		1	1	28	1			
28	1		1	1	28	1			
28	1			1	28	1			
28	1			1	28	1			
28	1			1	28	1			
28	1			1	28	1			
28	1			1	28	1			
28	1			1	30	1	1	1	1
28	1			1	30	1	1	1	1
28					30	1	1	1	1
28					30	1	1	1	1
28					30	1	1	1	1
30	1	1		1	30	1	1	1	1
30	1	1	1	1	30	1	1	1	1
30	1	1	1	1	30	1	1	1	1
30	1	1	1	1	30	1	1	1	1
30	1	1	1	1	30	1	1	1	1
30	1	1	1	1	30	1	1	1	1
30	1	1	1	1	30	1	1	1	1
30	1	1	1	1	30	1	1	1	1
30	1	1	1	1	30	1	1	1	1
30	1	1	1	1	30	1	1	1	1
30	1	1	1	1	30	1	1	1	1
30	1	1	1	1	30	1	1	1	1
30	1	1	1	1	30		1	1	
30	1		1	1	30		1	1	
30	1		1	1	30		1	1	

30	1		1	1	30		1		
30	1		1		30		1		
30			1		30		1		
32	1	1	1	1	30		1		
32	1	1	1	1	30		1		
32	1	1	1	1	32	1	1	1	1
32		1	1	1	32	1	1	1	1
32		1	1	1	32	1	1	1	1
32		1	1	1	32	1	1	1	1
32			1	1	32	1	1	1	1
32			1		32			1	1
32			1		32			1	1
32					32			1	1
32					32			1	1
32					32			1	1
33		1		1	32			1	1
					32			1	1
					32				
					32				
					32				
					32				
					33	1	1	1	1
					33		1	1	1
					33		1	1	1
					33		1	1	1
					33		1	0	1
					33				1
					33				0
					33				0
					33				0

Versuch 3

Zeit (h)	DMSO (0, 2%)	0,125 mg/ml HOE	0, 25 mg/ml HOE	0,5 mg/ml HOE
26				
28	1	1	1	
28	1	1	1	
28	1	1		
28	1	1		
28	1			
28	1			
28	1			
28	1			
28	1			
28	1			
30	1	1	1	1

30	1	1	1	1
30	1	1	1	1
30	1	1	1	1
30	1	1	1	1
30	1	1	1	1
30	1	1	1	1
30	1	1	1	1
30	1	1	1	1
30	1	1	1	1
30	1	1	1	1
30	1	1	1	0
30	1	1	1	
30	1	1		
30	1	1		
30	1	1		
30	1	1		
30				
30				
30				
32	1	1	1	1
32	1	1	1	1
32	1	1	1	1
32	1	1	1	1
32	1	1	1	1
32	1	1	1	1
32	1	1	1	1
32	1	1	1	1
32	1	1	1	1
32	1	1	1	1
32	1	1	1	1
32	1	1	1	1
32		1	1	1
32		1	1	1
32		1	1	1
32			1	1
32			1	1
32			1	1
32				1
34	1	1	1	1
34	1	1	1	1
34	0		1	1
34			1	1
34			1	1
34			1	1
34			0	1
34			0	1

34				1
----	--	--	--	---

Tabelle 11: Rohdaten zu Abb. 21 - Quercetin (50 μ M), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyziert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, Q = Quercetin.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Q	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Q	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Q
24	1	1	28	1	1	26	1	
24	1		28	1	1	28	1	1
26	1	1	28	1	1	28	1	1
26	1		28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	
28	1	1	28	1	1	28	1	
28	1	1	28	1		28	1	
28	1	1	28	1		28	1	
28	1	1	28	1		30	1	1
28	1	1	28	1		30	1	1
28	1	1	28	1		30	1	1
28	1	1	28	1		30	1	1
28	1	1	28	1		30	1	
28	1	1	28	0		30	1	
28	1		30	1	1	30	1	
28	1		30	1	1	30	1	
28	1		30	1	1	30	1	
28	1		30	1	1	30	1	
30	1	1	30	1	1	30	1	
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	34	1	1
30	1	1	30	1	1	34	1	1
30	1	1	30		1	34	1	1
30		1	30		1	34	1	1
32	1	1	32	1	1	34	1	1
32	1	1	32	1	1	34	0	1
32	1	1	32	1	1	34	0	1
32	1	1	32	1	1	34	0	1
32	1	1	32	1	1	34	0	1
32		1	32	1	1	34	0	1
32		1	32		1	34	0	1

32		1	32		1	34		0
32		1	32		1	34		0
34	1	1	32		1	34		0
34	1	1	32		1	34		0
34	1	1	34	1	1	34		0
34	0	1	34	1	1	34		0
34		1	34	1	1	34		0
34		0	34		0	34		0
			34		0	34		0
						34		0
						34		0
						34		0
						34		0
						34		0

Tabelle 12: Rohdaten zu Abb. 21 - Galangin (50 µM), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyisiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Galangin	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Galangin	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Galangin
26	1	1	26	1	1	28	1	1
26	1	1	26	1	1	28	1	1
26	1	1	26	1	1	28	1	1
26	1	1	26	1	1	28	1	
26	1	1	26	1		28	1	
26	1	0	26	1		28	1	
26	1	0	28	1	1	28	1	
26	1		28	1	1	28	1	
26	1		28	1	1	30	1	1
26	0		28	1	1	30	1	1
26	0		28	1	1	30	1	1
26	0		28	1	1	30	1	1
26	0		28	1	1	30	1	1
28	1	1	28	1	1	30	1	1
28	1	1	28	1	1	30	1	1
28	1	1	28	1	1	30	1	1
28	1	1	28		1	30	1	1
28	1	1	28		0	30	1	1
28	1	1	28		0	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1

30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30		1	32	1	1
30	1	1	30		1	32	1	1
30	1	1	30		1	32	1	0
30	1	1	30		1	32		0
30		1	32	1	1	32		0
30		1	32	1	1	34	1	1
30		1	32	1	1	34	1	1
30		1	32	1	1	34	1	0
30		1	32		1	34	1	0
30		1	32		1	34	0	0
30		1	32		1	34	0	0
30		1	32		1			
30		1	32		0			
30		0	34	1	1			
30		0	34	1	1			
32	1	1	34		1			
32	1	1						
32	0	1						
32	0	1						
32	0	1						
32		0						

Tabelle 13: Rohdaten zu Abb. 21 - Fisetin (50 μ M), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyisiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Fisetin	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Fisetin	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Fisetin
26	1		28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1		28	1	
28	1	1	30	1	1	28	1	
28	1	1	30	1	1	28	1	
28	1	1	30	1	1	28	1	
28	1		30	1	1	28	1	
28	1		30	1	1	28	1	
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	0		30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1

30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30		0	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	0	32	1	1	30		1
30	1		32	1	1	32	1	1
30	1		32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1		32	1	1
32	1	1	32	1		32	1	1
32	1	1	32	1		32	1	1
32		1	32	1		32	1	1
32		1	32	1		32		1
32		1	32	1		32		1
32		1	34	1	1	32		1
34	1	1	34	1	1	32		1
34	1	1	34	1	1	32		1
34	1	1	34	1	1	32		1
34	1	1	34		1	32		1
34	1	0	34		1	32		1
34	0	0	34		1	34	1	1
34	0	0	34		1	34	1	1
34		0	34		0	34	1	0
						34	1	
						34	1	
						34	1	
						34	1	

Tabelle 14: Rohdaten zu Abb. 21 - Morin (50 μ M), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralysiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Morin	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Morin	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Morin
26	1	1	26		1	26	1	1
26	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	

28	1	1	28	1	1	26	1	
28	1	1	28	1	1	26	1	
28	1	1	28	1	1	26	1	
28	1	1	28	1		26	1	
28	1		28	1		26	1	
28	1		28	1		28	1	1
30	1	1	28	1		28	1	1
30	1	1	28	1		28	1	1
30	1	1	28	1		28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
32	1	1	30	1		30	1	1
32	1	1	30	1		30	1	1
32	1	1	30	1		30	1	1
32	1	1	30	1		30		1
32	1	1	32	1	1	30		1
32	1	1	32	1	1	30		1
32	1	0	32	1	1	30		1
32	1		32	1	1	30		1
32	1		32	1	1	30		1
34	1	1	32		1	32	1	1
34	1	1	32		1	32	1	1
34	0	1	32		1	32	1	1
34		1	32		1	32	1	1
34		1	32		1	32	0	1
34		1	34	1	1	32	0	1
34		1	34	0	1	32	0	1
34		0	34		0	32		1
34		0	34		0	32		1
34		0	34		0	32		1
			34		0	32		0
			34		0	32		0

			34		0			
			34		0			

Tabelle 15: Rohdaten zu Abb. 21 - Myricetin (50 μM), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyisiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Myricetin	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Myricetin	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Myricetin
26	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	
28	1	1	28	1	1	28	1	
28	1	1	28		1	28	1	
28	1		30	1	1	28	1	
28	1		30	1	1	28	1	
28	1		30	1	1	28	1	
28	1		30	1	1	28	1	
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	0		30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1		32	1	1	30	1	1
30	1		32	1	1	32	1	1
30	1		32	1	1	32	1	1
30	1		32	1	1	32	1	1
30	1		32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1

32		1	34	1	1	34	1	1
32		1	34	1	1	34	1	1
32		1	34	1	1	34	1	1
32		1	34	1	1	34	1	1
34	1	1	34		1	34	1	1
34	1	1	34		0	34	1	1
34	1	1	34		0	34	1	1
34	1	1				34		1
34	1	1				34		1
34	1	1				34		1
34	0	0						
34	0	0						
34		0						

Tabelle 16: Rohdaten zu Abb. 21 - Naringenin (100 μ M), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyziert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, Nar = Naringenin. Daten aus der Masterarbeit von Gabriel Schulz.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Nar	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Nar	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Nar
26		0	26		1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	0
28	1	1	28	1	1	30	1	1
28	1	1	28		1	30	1	1
28	1	1	28		1	30	1	1
28	1	1	28		1	30	1	1
28	1	1	28		1	30	1	1
28	1	1	28		1	30	1	1
28	1	1	28		1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	
30	1	1	30	1	1	30	1	
30	1	1	30	1	1	30	1	
30	1	1	30	1	1	30	1	
30	1	1	30	1	1	30	0	
30	1	1	30	1	1	32	1	1

30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1		32	1	1
30	1	1	30	1		32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	0	1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	0	1
30		1	32	1	1	32	0	1
30		1	32	1	0	32	0	1
30		1	32	1	0	32		1
32	1	1	32	1	0	32		1
32		1	32	0		32		0
32		1	32	0		32		0
			32	0		32		0
			32	0				

Tabelle 17: Rohdaten zu Anh. Abb. 65 - Naringenin (50 μ M), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralysiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, Nar = Naringenin. Daten aus der Masterarbeit von Gabriel Schulz.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,2 %)	Nar	Zeit (h)	DMSO (0,2 %)	Nar	Zeit (h)	DMSO (0,2 %)	Nar
26	1	1	26	1	1	28	1	1
26	1		28	1	1	28		1
26	1		28	1	1	28		1
26	1		28	1		28		1
26	1		28	1		30	1	1
26	1		28	1		30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1		30		1	30	1	1
28	1		30		1	30	1	1

28	1		30		1	30	1	1
28	1		30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32		1
30		1	32	1	1	34	1	1
30		1	32	1	1	34	0	1
32	1	1	32	1	1	34	0	1
32	1	1	32	1	1	34		0
32	1		32	1				
32	1		32	1				
32	1		32	1				
34	1	1	32	1				
34		0	32	1				
34		0	34	1	1			
34		0	34	1	1			
34		0	34	1	1			
34		0	34		1			
34		0	34					
34		0						
34		0						

Tabelle 18: Rohdaten zu Abb. 21 - Liquiritigenin (100 µM), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralysiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, LQ = Liquiritigenin.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	LQ	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	LQ	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	LQ
26	1	1	26	1	1	26	1	1
26		1	26		1	26	1	1
26		1	28	1	1	26	1	
26		1	28	1	1	26	1	
28	1	1	28	1	1	26	1	
28	1	1	28	1		26	1	
28	1	1	28	1		26	1	

28	1	1	28	1		28	1	1
28	1	1	28	1		28	1	1
28	1	1	28	1		28	1	1
28		1	28	1		28	1	1
30	1	1	28	1		28	1	1
30	1	1	28	1		28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	
30	1	1	30	1	1	28	1	
30	1	1	30	1	1	28	1	
30	1	1	30	1	1	28	1	
30	1	1	30	1	1	28	1	
30	1	1	30	1	1	28	1	
30	1	1	30	1	1	28	1	
30	1	1	30	1	1	28	1	
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30		1	32	1	1	30	1	1
32	1	1	32	1	1	30	1	1
32	1	1	32	1	1	30	1	1
32	1	1	32	1	1	30	1	1
32	1	1	32	1	1	30	1	1
32	1	1	32	1	1	30	1	1
32	1	1	32	1	1	30		1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
34	1	1	32	1	1	32		1
34	0	1	32	1	1	32		1
34	0	1	32	1		32		1
34	0	1	34	1	1	32		1
34	0	0	34		1	32		1
34		0	34		1	32		1
			34		1	34	1	1
			34		1	34		0
			34		1	34		0
			34		1	34		0
			34		0			

Tabelle 19: Rohdaten zu Anh. Abb. 65 - Liquiritigenin (50 μ M), angegebene Stunden, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyziert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, LQ = Liquiritigenin.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	LQ	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	LQ	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	LQ
26		1	26	1	1	26	1	1
26		1	26		1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1		28	1	1	28	1	1
28	1		28		1	28	1	1
30	1	1	28		1	28	1	1
30	1	1	28		1	28	1	1
30	1	1	28		1	28	1	
30	1	1	30	1	1	28	1	
30	1	1	30	1	1	28	1	
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30		1	32	1	1	30	1	1
30		1	32	1	1	30	1	1
30		1	32	1	1	30	1	1
32	1	1	32	1	1	30	1	1
32	1	1	32	1	1	30	1	1
32	1	1	32	1		30	1	
32	1	1	32	1		30	1	
32	1	1	34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1
34	1	1	34	0	1	32	1	1
34	1	1	34	0	1	32	1	
34	1	1	34	0	0	34	1	1
34	1	1	34	0	0	34		1

32	1	1	30		1	34	0	1
32	1	1	30		1	34	0	0
32	1	1	30		1	34	0	0
32	1	1	30		1	34	0	0
32		1	32	1	1	34	0	0
32		1	32	1	1	34	0	0
32		1	32	1	1	34		0
32		1	32	1	1	34		0
32		1	32	1	1	34		0
32		1	32	1	1	34		0
32		1	32		1			
32		1	32		1			
32		1	32		1			
34	1	1	32		1			
34	1	0	32		1			
34	1		34	1	1			
34	0		34	1	1			
			34	1	1			
			34		1			

Tabelle 21: Rohdaten zu Abb.36 - Tamarixetin (50 µM), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralysiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, Tam = Tamarixetin.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Tam	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Tam	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Tam
24	1	1	28	1	1	26	1	1
24	1	1	28	1	1	28	1	1
26	1	1	28	1	1	28	1	1
26	1		28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1		28		1
28	1	1	28	1		30	1	1
28	1	1	28	1		30	1	1
28	1	1	28	1		30	1	1
28	1	1	28	1		30	1	1
28	1	1	28	0		30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1

30	1	1	30	1	1	30		1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1		30		1	34	1	1
32	1	1	30		1	34	1	1
32	1	1	30		1	34	1	1
32	1	1	30		1	34	1	1
32	1	1	30		1	34	1	1
32	1	1	30		1	34	0	0
32		1	30		1	34	0	0
32		1	30		1	34	0	0
32		1	30		1	34	0	0
32		1	32	1	1	34	0	0
32		1	32	1	1	34	0	
34	1	1	32	1	1			
34	1	1	32	1	1			
34	1		32	1	1			
34	0		32	1	1			
			32		1			
			32		1			
			34	1				
			34	1				
			34	1				

Tabelle 22: Rohdaten zu Abb.36 - Isorhamnetin (50 µM), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralysiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, Isorham = Isorhamnetin.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Isorham	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Isorham	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Isorham
24	1	1	28	1	1	26	1	1
24	1		28	1	1	26		1
26	1	1	28	1	1	28	1	1
26	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1		28	1	1
28	1	1	28	1		28	1	1
28	1	1	28	1		28	1	1
28	1	1	28	1		30	1	1

28	1	1	28	1		30	1	1
28	1	1	28	1		30	1	1
28	1	1	28	1		30	1	1
28	1	1	28	0		30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30		1
30	1	1	30	1	1	30		1
30	1	1	30	1	1	30		1
30	1	1	30	1	1	30		1
30	1	1	30	1	1	30		1
30	1	1	30	1	1	30		1
30	1	1	30	1	1	30		1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30	1	1	32	1	1
30	1	1	30		1	32	1	1
32	1	1	30		1	32	1	1
32	1	1	30		1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	34	1	1
32	1	1	32	1	1	34	1	1
32	1	1	32	1	1	34	1	1
32		1	32	1	1	34	1	1
32		1	32	1	1	34	1	1
32		1	32	1	1	34	0	0
34	1	1	32		1	34	0	0
34	1	1	32		1	34	0	0
34	1	1	32		1	34	0	
34	0	0	32		1	34	0	
			32		1	34	0	
			32		1			
			32		1			
			32		1			
			32		1			
			32		1			
			34	1	1			
			34	1				
			34	1				

Tabelle 23: Rohdaten zu Abb. 47 - Isosakuranetin (100 μ M), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralysiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, ISK = Isosakuranetin.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	ISK	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	ISK	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	ISK
26	1	1	26	1		26	1	1
26		1	28	1	1	26	1	
26		1	28	1	1	26	1	
28	1	1	28	1	1	26	1	
28	1	1	28	1	1	26	1	
28	1	1	28	1	1	26	1	
28	1	1	28	1	1	26	1	
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1		28	1	1
28		1	28	1		28	1	1
30	1	1	28	1		28	1	1
30	1	1	28	1		28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30		1
32	1	1	32	1	1	30		1
32	1	1	32	1	1	30		1
32	1	1	32	1	1	30		1
32	1	1	32	1	1	30		1
32	1	1	32	1	1	30		1
32	1	1	32	1	1	30		1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1

32	1		32	1	1	32	1	1
32	1		32	1	1	32	1	1
32	1		32	1	1	32	1	1
32	1		32	1	1	32	1	1
32	1		32	1		32	1	1
34	1	0	34	1		34	1	1
34	0					34		1
34	0							
34	0							
34	0							

Tabelle 24: Rohdaten zu Anh. Abb. 65 - Isosakuranetin (50 µM), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyisiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, ISK = Isosakuranetin.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	ISK	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	ISK	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	ISK
26	1	1	28	1	1	26	1	1
26	1		28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	
28	1	1	28	1		28	1	1
28	1	1	28	1		28	1	1
28	1		30	1	1	28	1	1
28	1		30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30		1	28	1	
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	1
32	1	1	32	1	1	30		1
32	1	1	34	1	1	32	1	1

32	1	1	34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1
32		1	34	1	1	32	1	1
32		1	34	1	1	32	1	1
32		1	34	1	1	32	1	1
34	1	1	34	0	0	32	0	1
34	1	1	34	0	0	32	0	0
34	0	1	34	0	0	32	0	0
			34	0	0			
			34	0				
			34	0				
			34	0				

Tabelle 25: Rohdaten zu Abb. 47 - 8-PN (100 μ M), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralysiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, PN = Prenylningenin. Daten aus der Masterarbeit von Gabriel Schulz.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	8-PN	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	8-PN	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	8-PN
28	1	1	30	1	1	28	1	
28	1		30	1	1	28	1	
28	1		30	1	1	28	1	
28	1		30	1	1	28	1	
28	1		30	1		30	1	1
28	1		30	1		30	1	1
28	1		32	1	1	30	1	1
28	0		32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	0	30	1	
30	1		34	1	1	30	1	

30	1		34	1	1	30	1	
30	1		34	1	1	30	1	
30	1		34	1	1	30	1	
30	1		34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	0	32	1	1
32	1	1	34	1	0	32	1	1
32	1	1	34	0	0	32	1	1
32	1	1	34	0	0	32	1	1
32	1	1	34	0	0	32	1	1
32	1	1	34	0	0	32	1	1
32	1	1	34	0	0	32		1
32	1	1	34	0	0	34	1	1
32	1	1	34	0	0	34	1	1
32	1	1	34	0	0	34	1	1
32		1	34	0	0	34	0	1
34	0	1	34	0	0	34	0	1
34		1	34	0	0	34	0	1
34		1	34	0		34		0
34		1	34	0		34		0
34		1	34	0		34		0
34		1				34		0
34		1				34		0
34		1				34		0
34		1				34		0
34		1				34		0
34		1				34		0
34		1				34		0
34		1				34		0
34		1				34		0
34		1				34		0
34		1				34		0
34		0				34		0
34		0						

Tabelle 26: Rohdaten zu Anh. Abb. 65 - 8-PN (50 μ M), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyisiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, PN = Prenylnaringenin. Daten aus der Masterarbeit von Gabriel Schulz.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,2 %)	8-PN	Zeit (h)	DMSO (0,2 %)	8-PN	Zeit (h)	DMSO (0,2 %)	8-PN
26	1	1	26	1	1	28	1	1
26	1	1	28	1		30	1	1
26	1		28	1		30	1	1
26	1		28	1		30	1	1
26	1		28	1		30	1	1
26	1		28	1		30	1	1

28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
28	1		30	1	1	30	1	1
30	1	1	30		0	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	0	
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	34	1	1	32		1
30		1	34	1	1	32		0
30		1	34	1	0	34	1	1
32	1	1				34	0	1
32	1	1				34	0	1
32	1	1				34		1
32	1	1				34		1
32	1	1				34		0

32		1						
34	1	0						
34		0						
34		0						
34		0						

Tabelle 27: Rohdaten zu Abb. 47 - 6-PN (100 µM), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyziert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, PN = Prenylningerin. Daten aus der Masterarbeit von Gabriel Schulz.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1%)	6-PN	Zeit (h)	DMSO (0,1%)	6-PN	Zeit (h)	DMSO (0,1%)	6-PN
28	1	1	30	1		28	1	
28	1		30	1		28	1	
28	1		30	1		28	1	
30	1	1	30	1		28	1	
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	0		30	1	1
30	1	1	30	0		30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	34	1	1	30	1	
30	1	1	34	1	1	30	1	
30	1	0	34	1	1	30	1	
32	1	1	34	1	1	30	1	
32	1	1	34	1	1	30	1	
32	1	1	34	1	1	30	1	
32	1	1	34	0	1	32	1	1
32	1	1	34	0	1	32	1	1
32	1	1	34	0	0	32	1	1
32	1	1	34	0	0	32	1	1
32	1	1	34	0	0	32	1	1
32	1	1	34	0	0	32	1	1
32	1	1	34	0	0	32	1	1
34	1	1	34	0	0	32	1	1
34	1	1	34	0	0	32	1	1

34	1	1	34	0	0	32		1
34	1	1	34	0	0	32		1
34	1	1	34	0	0	32		1
34	0	1	34	0	0	32		1
34	0	1	34	0	0	34	1	1
34	0	1	34	0	0	34	1	1
34	0	0	34		0	34	1	1
34	0	0	34		0	34	0	1
34	0	0	34		0	34	0	1
			34		0	34	0	1
			34		0	34		1
			34		0	34		1
			34		0	34		1
			34		0	34		0
			34		0	34		0
			34		0	34		0
			34		0	34		0
						34		0
						34		0
						34		0
						34		0

Tabelle 28: Rohdaten zu Anh. Abb. 65 - 6-PN (50 μ M), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyisiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, PN = Prenylnaringenin. Daten aus der Masterarbeit von Gabriel Schulz.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,2 %)	6-PN	Zeit (h)	DMSO (0,2 %)	6-PN	Zeit (h)	DMSO (0,2 %)	6-PN
26	1	1	26	1	1	28	1	1
26	1	1	28	1		28		1
26	1		28	1		28		1
26	1		28	1		28		1
26	1		28	1		28		1
26	1		28	1		28		1
28	1	1	30	1	1	28		1
28	1	1	30	1	1	28		1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1

28	1		30		1	30	1	1
28	1		30		1	30	1	1
28	1		30		1	30	1	1
30	1	1	30		1	30	1	
30	1	1	30		1	30	1	
30	1	1	30		1	30	1	
30	1	1	30		1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	1	
30	1	1	32	1	1	30	0	
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
32	1		32	1		32		1
32	1		32	1		32		1
32	1		34	1	1	32		1
32	1		34	1	1	34	1	1
32	1		34	1		34	0	1
34	1	0				34	0	1
34		0						
34		0						
34		0						

Tabelle 29: Rohdaten zu Anh. Abb. 66 - Seco (50 µM), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyisiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, Seco = Secoisolariciresinol.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Seco	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Seco	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Seco
26	1	1	26		1	26	1	1
26	1		28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1

28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1		28	1	1	28	1	1
30	1	1	28	1	1	28	1	1
30	1	1	28	1	1	28	1	1
30	1	1	28	1		28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30		1	30	1	1	30	1	1
30		1	30	1		30	1	1
30		1	30	1		30	1	1
32	1	1	30	1		30		1
32	1	1	32	1	1	30		1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32		1	32	0	1
32	1	1	32		1	32	0	1
32	1	1	32		1	32	0	1
34	1	1	32		1			
34	1	1	32		1			
34	0		32		1			
			34	1	1			
			34	0	1			
			34		0			

Tabelle 30: Rohdaten zu Anh. Abb. 66 - Pino (50 μ M), angegeben sind Stunden, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyisiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, Pino = Pinoresinol.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Pino	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Pino	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Pino
26	1	1	26		1	26	1	1
26	1	1	26		1	26	1	1
28	1	1	26		1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	26	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28		1	28	1	1	28	1	1
28		1	28	1	1	28	1	1
28		1	28	1		28	1	1
28		1	28	1		28	1	1
30	1	1	28	1		28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	1
30	1	1	30	1	1	28	1	0
30	1	1	30	1	1	28		0
30	1	1	30	1	0	28		0
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
30	1	1	30	1		30	1	1
32	1	1	30	1		30	1	1
32	1	1	30	1		30		1
32	1	1	32	1	1	30		1
32	1	1	32	1	1	30		1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1		32		1	32	1	1

32	1		32		1	32	0	1
34	1	1	32		1	32	0	0
34	1		32		1	32	0	
34	0		32		1			
			32		1			
			32		1			
			32		1			
			32		1			
			34	1	1			
			34	0	1			
			34		0			
			34		0			

Tabelle 31: Rohdaten zu Anh. Abb. 66 - SB (50 μ M), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyziert, 0 = zensiert), Stamm CL4176, SB = Schisandrin B.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,5 %)	SB	Zeit (h)	DMSO (0,5 %)	SB	Zeit (h)	DMSO (0,5 %)	SB
26	1	1	26	1	1	26	1	1
26	1	1	28	1	1	26	1	
26	1	1	28	1	1	26	1	
26	1		28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	0	28	1	1
28	1	1	30	1	1	28	1	1
28	1	1	30	1	1	28	1	1
28	1	1	30	1	1	28		1
28	1	1	30	1	1	28		1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1
30	1	1	32	1	1	30	1	1

30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32		1	32	1	1
32	1	1	32		1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	0
32	1	1	34	1	0	32	1	0
32	1	1	34	0		32	0	
32	1	0	34	0		32	0	
32	1	0	34	0		32	0	
32	0							

Tabelle 32: Rohdaten zu Anh. Abb. 66 - Sesamin (50 µM), angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyziert, 0 = zensiert). Stamm CL4176.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (h)	DMSO (0,5 %)	Sesamin	Zeit (h)	DMSO (0,5 %)	Sesamin	Zeit (h)	DMSO (0,5 %)	Sesamin
26	1	1	26	1	1	26	1	1
26	1	1	26		1	26	1	
26	1	1	28	1	1	26	1	
26	1		28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28	1	1	28	1	1
28	1	1	28		1	28	1	
28	1	1	28		1	30	1	1
28	1	1	28		1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
28	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	1
30	1	1	30	1	1	30	1	
30	1	1	30	1	1	30	1	
30	1	1	30	1	1	30	1	

30	1	1	30	1	1	30	1	
30	1	1	30	1		30	1	
30	1	1	30	1		32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30	1	1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
30		1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	32	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	1	1
32	1	1	34	1	1	32	0	1
32	1	1	34	1	1	32	0	1
32	1	1	34	1	1	32	0	1
32	1	1	34	0	0	32		1
32	0	1	34	0		32		1
32		0	34	0		32		1
32		0				32		0
						32		0
						32		0
						32		0
						32		0
						32		0

8.2.2 Aggregation von A β -Plaques im transgenen *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer

Tabelle 33: Rohdaten zu Abb. 22 - Flavonole, angegeben ist die Anzahl der A β -Plaques/Nematode. Stamm CL2006.

Versuch 1				
DMSO (0,1 %)	Galangin	Fisetin	Morin	Myricetin
12	16	7	10	3
15	20	11	12	4
19	21	12	13	5
21	23	12	14	9
21	24	13	14	10
24	24	14	14	10
25	25	15	15	13
26	28	18	16	13
28	30	18	18	14
33	31	20	19	15

33	32	20	20	17
33	33	21	20	18
34	34	22	24	18
35	34	24	27	19
38	35	27	27	20
41	39	28	28	21
43	41	30	30	21
46	42	30	30	23
47	46	32	37	24
68	48	47	39	30
Versuch 2				
8	10	29	20	13
11	19	42	21	16
14	22	31	22	18
16	22	24	25	18
18	25	35	27	19
18	27	33	28	19
19	28	23	29	19
23	29	34	31	22
25	31	33	32	27
25	33	40	36	28
25	33	30	39	28
26	34	(Gruppe zensiert)	39	28
28	34		40	28
0	35		42	29
33	36		43	30
33	36		44	34
33	38		48	35
34	38		48	35
34	39		50	42
34	43		51	49
Versuch 3				
13	19	11	12	6
18	19	12	13	13
19	21	15	15	14
19	23	16	18	17
20	23	17	18	19
21	24	19	19	20
21	24	19	21	23
21	27	20	22	23
21	29	22	24	24
23	31	22	24	27
24	32	22	24	27
27	32	23	25	27
27	34	24	25	29

28	34	25	32	29
30	35	27	32	33
31	36	27	33	34
32	37	27	34	35
35	37	31	36	36
36	39	32	42	38
37	44	33	45	40
Versuch 4				
5	17	21	17	21
20	22	22	17	22
23	22	23	19	28
25	27	23	21	28
26	27	24	24	29
27	30	25	26	30
28	31	25	26	31
30	31	27	26	32
31	32	27	26	33
31	32	28	28	33
32	33	29	28	37
32	34	33	29	39
34	36	34	30	40
37	37	35	32	40
37	39	36	35	41
37	39	38	36	41
38	40	38	38	41
40	40	39	40	46
41	44	39	42	46
49	53	41	47	49

Tabelle 34: Rohdaten zu Abb. 22, 37 und 48 - Naringenin, Liquiritigenin, Isosakuranetin, Tamarixetin und Isorhamnetin, angegeben ist die Anzahl der A β -Plaques/Nematode. Stamm CL2006, ISK = Isosakuranetin, LQ= Liquiritigenin.

Versuch 1					
DMSO (0,1 %)	Naringenin	LQ	ISK	Tamarixetin	Isorhamnetin
19	11	12	6	11	12
24	14	14	10	13	12
25	15	16	11	14	17
27	16	19	11	16	18
30	18	24	14	16	19
31	18	25	14	16	20
36	20	25	14	16	21
36	20	26	15	17	21
38	21	27	16	18	23
39	23	27	23	21	24

40	24	27	23	21	25
42	24	27	24	23	26
43	25	28	24	27	26
44	25	28	29	29	30
46	30	30	31	30	30
47	32	31	32	32	31
51	33	33	34	32	32
57	33	34	36	33	35
58	34	36	38	41	36
59	40	44	38	42	40
Versuch 2					
15	15	24	11	9	15
17	21	26	15	15	16
17	24	26	15	15	16
17	26	26	18	17	21
19	27	26	18	21	22
19	27	27	22	23	27
20	29	31	23	24	30
23	29	33	24	25	32
23	30	33	28	26	32
23	30	34	28	29	33
24	32	34	29	29	35
24	33	34	30	30	36
26	33	34	31	31	39
27	34	36	31	33	39
30	35	38	36	33	42
31	38	38	36	34	42
37	40	39	38	38	44
39	41	47	41	40	46
40	42	49	43	42	55
41	46	49	50	45	67
Versuch 3					
25	16	2	15	10	7
25	18	11	17	15	16
25	18	14	20	17	17
28	19	15	23	19	18
29	19	17	24	22	19
30	19	18	24	22	19
31	21	19	24	24	20
32	23	21	25	28	23
32	23	21	26	29	24
33	24	22	28	30	29
34	24	23	29	32	30
34	25	24	30	32	30
35	28	24	30	32	30

35	28	26	31	34	31
37	29	28	32	35	32
38	29	29	33	36	32
41	31	30	38	38	32
41	33	31	38	40	36
46	36	33	41	43	37
51	38	35	51	45	46
Versuch 4					
11	22	11	15	15	19
12	24	14	17	16	21
15	24	15	23	17	22
19	25	16	25	17	24
19	26	17	26	23	25
21	27	20	29	23	27
23	27	22	31	24	27
24	29	23	32	24	27
25	29	24	33	25	30
26	30	25	34	27	30
26	31	26	35	28	31
29	32	27	35	28	32
30	33	28	38	29	34
30	33	30	39	30	36
31	35	32	39	31	39
38	42	32	39	32	40
38	45	38	39	32	41
39	45	39	40	33	43
43	47	41	43	33	45
45	48	42	49	48	49

Tabelle 35: Rohdaten zu Abb. 37– Quercetin und Quercetin-3-Methylether angegeben ist die Anzahl der A β -Plaques/Nematode. Stamm CL2006, Q = Quercetin, Q-3-M = Quercetin-3-Methyl ether.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
DMSO (0,1 %)	Q	Q-3-M	DMSO (0,1 %)	Q	Q-3-M	DMSO (0,1 %)	Q	Q-3-M
5	2	5	10	4	0	10	17	9
9	4	5	10	8	0	13	18	9
9	5	5	15	9	2	15	19	13
11	5	5	18	10	2	16	19	15
11	6	5	24	10	3	16	19	17
12	6	6	26	10	3	17	20	18
16	8	6	26	15	5	18	22	19
17	9	6	29	16	5	18	22	19
19	11	7	29	16	6	19	23	20
20	11	7	29	18	7	20	24	21
20	11	7	34	19	8	22	25	22

21	11	7	35	22	9	27	26	22
23	11	8	36	22	10	28	28	22
23	11	8	38	23	10	29	28	23
24	13	9	44	25	10	30	28	24
25	13	10	50	28	12	30	29	26
26	16	12	50	29	12	32	31	27
27	17	15	56	31	12	33	34	28
29	17	16	56	36	14	37	37	33
31	18	27	56	37	19	37	37	35

Tabelle 36: Rohdaten zu Abb. 48 – 8-PN und 6-PN, angegeben ist die Anzahl der A β -Plaques/Nematode. Stamm CL2006, PN = Prenylnaringenin.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 2		
DMSO (0,1%)	6-PN	8-PN	DMSO (0,1 %)	6-PN	8-PN	DMSO (0,1 %)	6-PN	8-PN
18	18	6	13	5	4	9	3	5
23	19	7	14	6	6	12	6	6
23	19	8	14	6	6	11	7	6
24	20	9	18	7	9	15	8	7
25	21	9	18	8	10	16	8	7
28	23	10	19	8	11	16	9	7
33	26	11	19	9	11	17	9	7
34	26	11	20	10	12	17	10	9
36	27	12	21	10	13	17	11	9
39	28	12	22	10	13	19	11	10
41	29	13	23	11	14	20	11	10
43	29	13	23	13	14	20	13	10
44	30	13	24	13	15	21	13	11
45	35	13	26	13	18	23	14	12
46	37	14	27	14	19	23	14	15
47	37	15	28	14	20	26	15	15
47	37	15	28	15	20	28	17	18
49	53	19	29	15	22	28	17	19
50	55	20	31	18	25	35	17	21
60	%	24	35	22	34	42	21	26

8.2.3 ROS-Akkumulation im transgenen *C. elegans*-Modell für Morbus Alzheimer unter thermalem Stress

Tabelle 37: Rohdaten zu Abb. 24, 38 und Anh. Abb. 61- Quercetin und methylierte Quercetinderivate (50 µM), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (30 Nematoden/ Versuch und Gruppe), Stamm CL4176 und CL802, Isorham = Isorhamnetin, Tam = Tamarixetin, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

Zeit (h)	Versuch 1					
	CL4176 DMSO (0,1 %)	CL802 DMSO (0,1 %)	CL4176 Quercetin	CL4176 Q-3-M	CL4176 Tam	CL4176 Isorham
0	0,0001	-0,0003	-0,0004	0,0000	0,0000	-0,0004
1	-0,0052	-0,0076	-0,0083	-0,0030	-0,0081	-0,0061
2	-0,0054	-0,0115	-0,0065	0,0011	-0,0092	-0,0038
3	0,0034	-0,0140	0,0100	0,0098	0,0001	0,0094
4	0,0617	-0,0055	0,0655	0,0472	0,0327	0,0759
5	0,1823	0,0199	0,1873	0,1619	0,1587	0,2357
6	0,3782	0,0691	0,3722	0,3534	0,3464	0,4824
7	0,6512	0,1506	0,5968	0,6093	0,5953	0,8009
Zeit (h)	Versuch 2					
0	0,0009	0,0017	0,0007	0,0022	0,0031	0,0018
1	0,0020	0,0018	0,0013	0,0047	0,0036	0,0032
2	0,0146	0,0037	0,0050	0,0104	0,0067	0,0067
3	0,0383	0,0102	0,0104	0,0194	0,0119	0,0126
4	0,0957	0,0655	0,0507	0,0435	0,0372	0,0388
5	0,2226	0,1826	0,1228	0,1496	0,1149	0,1457
6	0,4242	0,3486	0,2465	0,3291	0,3221	0,3503
7	0,6801	0,5400	0,4087	0,5413	0,6006	0,6114
Zeit (h)	Versuch 3					
0	0,0001	-0,0002	-0,0002	0,0000	-0,0003	-0,0003
1	0,0003	-0,0010	0,0008	-0,0021	-0,0042	-0,0014
2	0,0011	-0,0005	0,0036	-0,0016	-0,0074	0,0060
3	0,0078	0,0280	0,0175	0,0075	-0,0057	0,0202
4	0,0495	0,1099	0,0801	0,0496	0,0093	0,1005
5	0,1721	0,2222	0,2125	0,1796	0,0729	0,2867
6	0,3870	0,3789	0,4078	0,3745	0,2032	0,5543
7	0,6622	0,5771	0,6581	0,6288	0,3900	0,9027

Tabelle 38: Rohdaten zu Abb. 24- Flavonole (50 μM), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm CL4176.

Zeit (h)	Versuch 1				
	CL4176 DMSO (0,1%)	CL4176 Galangin	CL4176 Fisetin	CL4176 Morin	CL4176 Myricetin
0	0,0005	0,0003	0,0003	0,0016	0,0002
1	0,0002	0,0014	0,0031	0,0014	0,0006
2	0,0070	0,0065	0,0103	0,0043	0,0034
3	0,0382	0,0255	0,0321	0,0183	0,0244
4	0,1135	0,0785	0,0827	0,0654	0,0788
5	0,2440	0,1830	0,1647	0,1700	0,1861
6	0,4386	0,3553	0,2823	0,3369	0,3537
7	0,6926	0,5928	0,4352	0,5611	0,5790
Zeit (h)	Versuch 2				
0	0,0007	0,0005	0,0004	0,0006	0,0005
1	-0,0006	-0,0005	-0,0009	-0,0007	-0,0008
2	0,0006	0,0022	-0,0001	0,0011	0,0001
3	0,0174	0,0220	0,0124	0,0154	0,0083
4	0,0796	0,0940	0,0736	0,0873	0,0512
5	0,2039	0,2587	0,2224	0,2340	0,1706
6	0,4061	0,5364	0,4716	0,4549	0,3781
7	0,6781	0,9135	0,8075	0,7363	0,6831
Zeit (h)	Versuch 3				
0	0,0006	0,0006	0,0006	0,0008	0,0013
1	0,0007	-0,0001	0,0063	-0,0018	0,0016
2	0,0046	-0,0006	0,0224	-0,0067	0,0043
3	0,0179	0,0083	0,0547	-0,0115	0,0169
4	0,0835	0,0504	0,1227	-0,0025	0,0621
5	0,2061	0,1420	0,2333	0,0370	0,1651
6	0,4042	0,2778	0,4041	0,1082	0,3433
7	0,6747	0,4525	0,6352	0,2207	0,5856

Tabelle 39: Rohdaten zu Abb. 24 und 49- Isosakurantein und Liquiritigenin (100 μM), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm CL4176. ISK = Isosakurantein, LQ = Liquiritigenin.

Zeit (h)	Versuch 1		
	CL4176 DMSO (0,1 %)	CL4176 LQ	CL4176 ISK
0	0,0005	0,0002	0,0005
1	0,0002	0,0011	0,0007
2	0,0070	0,0055	0,0051

3	0,0382	0,0307	0,0170
4	0,1135	0,0985	0,0499
5	0,2440	0,2381	0,1253
6	0,4386	0,4716	0,2435
7	0,6926	0,7781	0,4098
Zeit (h)	Versuch 2		
0	0,0007	0,0001	0,0005
1	-0,0006	-0,0004	-0,0006
2	0,0006	0,0016	0,0006
3	0,0174	0,0276	0,0098
4	0,0796	0,1281	0,0479
5	0,2039	0,3062	0,1422
6	0,4061	0,5774	0,2927
7	0,6781	0,9266	0,4923
Zeit (h)	Versuch 3		
0	0,0006	0,0006	0,0005
1	0,0007	0,0012	0,0009
2	0,0046	0,0043	0,0055
3	0,0179	0,0148	0,0180
4	0,0835	0,0478	0,0498
5	0,2061	0,1280	0,1098
6	0,4042	0,2632	0,2110
7	0,6747	0,4579	0,3500

Tabelle 40: Rohdaten zu Abb. 24 und 49 - Naringenin und prenylierte Derivate (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (8 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm CL4176. PN = Prenylnaringenin. Daten aus der Masterarbeit von Gabriel Schulz.

Zeit (h)	Versuch 1			
	CL4176 DMSO (0,1 %)	CL4176 Naringenin	CL4176 8-PN	CL4176 6-PN
0	0,0041	-0,0015	-0,0005	-0,0010
1	0,0187	0,0085	0,0052	0,0045
2	0,0841	0,0094	0,0253	0,0155
3	0,2137	0,0522	0,1098	0,0618
4	0,3836	0,1314	0,2369	0,1340
5	0,5274	0,2427	0,4133	0,2430
6	0,7123	0,3922	0,6343	0,3784
7	0,8738	0,5633	0,8940	0,5395
Zeit (h)	Versuch 2			
0	-0,0284	0,0134	-0,0111	0,0377
1	-0,0322	0,0328	-0,0213	0,0409

2	-0,0206	0,0710	-0,0129	0,0866
3	0,0223	0,2336	0,0349	0,2645
4	0,1059	0,6017	0,1493	0,5870
5	0,2567	1,1271	0,3963	1,0044
6	0,4538	1,7376	0,7207	1,5156
	0,6864	2,4286	1,0816	2,0849
Zeit (h)	Versuch 3			
0	-0,0065	-0,0071	0,0157	-0,0062
1	0,0057	0,0060	0,0329	0,0165
2	0,0116	0,0314	0,0547	0,0502
3	0,0289	0,0910	0,1865	0,1683
4	0,1132	0,3054	0,4602	0,4607
5	0,2491	0,6038	0,8584	0,8514
6	0,4708	1,0277	1,3465	1,3459
7	0,7152	1,5128	1,9129	1,8673

8.2.4 ROS-Akkumulation im Wildtypen unter thermalem Stress

Tabelle 41: Rohdaten zu Abb. 25 und 39- Quercetin (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (8 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (0,2 %)	Quercetin	DMSO (0,2 %)	Quercetin	DMSO (0,2 %)	Quercetin
0	0,0006	0,0024	0,0005	0,0008	-0,0021	0,0012
1	0,0036	0,0218	0,0144	0,0106	0,0003	0,0235
2	0,0255	0,0776	0,0598	0,0527	0,0134	0,0596
3	0,0813	0,1518	0,1273	0,1182	0,0403	0,1251
4	0,1764	0,2544	0,2217	0,1920	0,1047	0,2183
5	0,3249	0,3917	0,3341	0,2847	0,2152	0,3466
6	0,5272	0,5640	0,4917	0,4185	0,4209	0,5147
7	0,7525	0,7759	0,7324	0,5941	0,6991	0,7152

Tabelle 42: Rohdaten zu Abb. 25 - Galangin (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (8 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (0,1 %)	Galangin	DMSO (0,1 %)	Galangin	DMSO (0,1 %)	Galangin
0	-0,0001	0,0001	-0,0001	0,0011	-0,0009	0,0018
1	0,0018	-0,0002	-0,0029	-0,0039	0,0049	0,0064
2	0,0099	0,0017	-0,0107	-0,0251	0,0306	0,0383
3	0,0317	0,0048	0,0173	-0,0405	0,0990	0,1379
4	0,0904	0,0126	0,1076	-0,0361	0,1957	0,2791

5	0,2226	0,0370	0,2468	-0,0004	0,3403	0,4824
6	0,4294	0,1279	0,4369	0,0945	0,5087	0,7709
7	0,6961	0,2938	0,6858	0,2633	0,7138	1,1096

Tabelle 43: Rohdaten zu Abb. 25 - Fisetin (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (8 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2.

	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Fisetin	DMSO (0,1 %)	Fisetin	DMSO (0,1 %)	Fisetin
0	-0,0001	-0,0005	-0,0001	0,0044	-0,0009	-0,0003
1	0,0018	0,0013	-0,0029	0,0030	0,0049	0,0002
2	0,0099	0,0073	-0,0107	0,0068	0,0306	0,0180
3	0,0317	0,0179	0,0173	0,0353	0,0990	0,0667
4	0,0904	0,0478	0,1076	0,0875	0,1957	0,1319
5	0,2226	0,1269	0,2468	0,1651	0,3403	0,2231
6	0,4294	0,2866	0,4369	0,2879	0,5087	0,3548
7	0,6961	0,5105	0,6858	0,4936	0,7138	0,5552

Tabelle 44: Rohdaten zu Abb. 25 - Morin (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (8 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2.

	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Morin	DMSO (0,1 %)	Morin	DMSO (0,1 %)	Morin
0	-0,0001	-0,0012	-0,0001	-0,0078	-0,0009	0,0004
1	0,0018	0,0000	-0,0029	-0,0246	0,0049	0,0021
2	0,0099	0,0059	-0,0107	-0,0005	0,0306	0,0205
3	0,0317	0,0121	0,0173	0,0585	0,0990	0,0622
4	0,0904	0,0330	0,1076	0,1469	0,1957	0,1283
5	0,2226	0,0932	0,2468	0,2732	0,3403	0,2254
6	0,4294	0,2037	0,4369	0,4499	0,5087	0,3767
7	0,6961	0,3743	0,6858	0,7106	0,7138	0,5998

Tabelle 45: Rohdaten zu Abb. 25 - Myricetin (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (8 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2.

	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Myricetin	DMSO (0,1 %)	Myricetin	DMSO (0,1 %)	Myricetin
0	-0,0001	0,0005	-0,0001	-0,0011	-0,0009	0,0005
1	0,0018	0,0009	-0,0029	-0,0046	0,0049	0,0037
2	0,0099	0,0055	-0,0107	-0,0221	0,0306	0,0227
3	0,0317	0,0150	0,0173	-0,0356	0,0990	0,0430

4	0,0904	0,0436	0,1076	-0,0463	0,1957	0,0771
5	0,2226	0,0999	0,2468	-0,0448	0,3403	0,1271
6	0,4294	0,2179	0,4369	-0,0015	0,5087	0,1983
7	0,6961	0,3859	0,6858	0,1030	0,7138	0,3227

Tabelle 46: Rohdaten zu Abb. 39 - Q-3-M (100 µM), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (8 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2. Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (0,2 %)	Q-3-M	DMSO (0,2 %)	Q-3-M	DMSO (0,2 %)	Q-3-M
0	0,0121	0,0062	0,0156	0,0089	0,0006	0,0002
1	0,0287	0,0365	0,0556	0,0237	0,0036	0,0076
2	0,0665	0,0937	0,1292	0,0661	0,0255	0,0630
3	0,1306	0,1759	0,2203	0,1260	0,0813	0,1617
4	0,2444	0,2675	0,3234	0,1934	0,1764	0,2707
5	0,4020	0,4018	0,4716	0,2947	0,3249	0,4104
6	0,5920	0,5643	0,6516	0,4363	0,5272	0,5849
7	0,7896	0,7465	0,8245	0,5982	0,7525	0,7903

Tabelle 47: Rohdaten zu Abb. 39 - Tamarixetin (100 µM), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (8 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2, Tam = Tamarixetin.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (0,2 %)	Tam	DMSO (0,2 %)	Tam	DMSO (0,2 %)	Tam
0	0,0006	0,0007	0,0005	0,0000	-0,0021	0,0180
1	0,0036	0,0029	0,0144	0,0569	0,0003	0,0394
2	0,0255	0,0209	0,0598	0,2038	0,0134	0,1166
3	0,0813	0,0679	0,1273	0,3946	0,0403	0,2607
4	0,1764	0,1543	0,2217	0,6002	0,1047	0,4513
5	0,3249	0,2809	0,3341	0,8536	0,2152	0,6894
6	0,5272	0,4612	0,4917	1,1652	0,4209	0,9777
7	0,7525	0,6799	0,7324	1,5167	0,6991	1,3092

Tabelle 48: Rohdaten zu Abb. 39- Isorhamnetin (100 µM), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (8 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2, Isorham = Isorhamnetin.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (0,2 %)	Isorham	DMSO (0,2 %)	Isorham	DMSO (0,2 %)	Isorham
0	0,0006	0,0007	0,0005	0,0052	-0,0021	0,0069
1	0,0036	0,0121	0,0144	0,0087	0,0003	0,0136
2	0,0255	0,0572	0,0598	0,0381	0,0134	0,0303

3	0,0813	0,1368	0,1273	0,1099	0,0403	0,0839
4	0,1764	0,2429	0,2217	0,1916	0,1047	0,1755
5	0,3249	0,4061	0,3341	0,3090	0,2152	0,3163
6	0,5272	0,6202	0,4917	0,4762	0,4209	0,4996
7	0,7525	0,8569	0,7324	0,6834	0,6991	0,7135

Tabelle 49: Rohdaten zu Abb. 25 und 50 - Naringenin (100 µM), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (8 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2. Daten aus der Masterarbeit von Gabriel Schulz.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (0,1 %)	Naringenin	DMSO (0,1 %)	Naringenin	DMSO (0,1 %)	Naringenin
0	-0,0460	0,0222	0,0049	0,0058	-0,0002	-0,0036
1	-0,0364	0,0459	0,0016	-0,0005	0,0022	0,0111
2	-0,0186	0,0910	0,0056	0,0120	0,0216	0,0492
3	0,0237	0,2325	0,0126	0,0248	0,0299	0,0790
4	0,0813	0,3974	0,0504	0,0538	0,0663	0,1919
5	0,1801	0,6218	0,1499	0,1019	0,1151	0,3566
6	0,3365	0,9096	0,3118	0,1629	0,2564	0,6450
7	0,5974	1,3331	0,5985	0,3422	0,5725	1,1351

Tabelle 50: Rohdaten zu Abb. 25 - Liquiritigenin (100 µM), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (8 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2. LQ = Liquiritigenin.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (0,1 %)	LQ	DMSO (0,1 %)	LQ	DMSO (0,1 %)	LQ
0	-0,0001	-0,0008	0,0009	0,0005	0,0006	0,0022
1	0,0018	0,0087	-0,0005	-0,0044	0,0018	0,0115
2	0,0099	0,0249	0,0136	0,0003	0,0182	0,0559
3	0,0317	0,0581	0,0435	0,0075	0,0691	0,1379
4	0,0904	0,1256	0,1072	0,0188	0,1619	0,2491
5	0,2226	0,2125	0,2311	0,0609	0,3058	0,4176
6	0,4294	0,3438	0,4187	0,1301	0,4952	0,6185
7	0,6961	0,5371	0,6850	0,2654	0,7254	0,8716

Tabelle 51: Rohdaten zu Abb. 50 - Isosakuranetin (100 µM), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (8 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2. ISK = Isosakuranetin.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (0,1 %)	ISK	DMSO (0,1 %)	ISK	DMSO (0,1 %)	ISK
0	0,0034	0,0194	0,0009	0,0011	0,0006	0,0020
1	0,0151	0,0227	-0,0005	-0,0032	0,0018	0,0069

2	0,0332	0,0430	0,0136	0,0000	0,0182	0,0206
3	0,0480	0,1043	0,0435	0,0147	0,0691	0,0517
4	0,0856	0,2311	0,1072	0,0493	0,1619	0,0872
5	0,1947	0,3998	0,2311	0,1201	0,3058	0,1505
6	0,3940	0,5794	0,4187	0,2438	0,4952	0,2579
7	0,6486	0,8076	0,6850	0,4388	0,7254	0,4305

Tabelle 52: Rohdaten zu Abb. 50- 8-PN (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (8 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2. PN = Prenylnaringenin. Daten aus der Masterarbeit von Gabriel Schulz.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (0,1 %)	8-PN	DMSO (0,1 %)	8-PN	DMSO (0,1 %)	8-PN
0	-0,0460	0,0083	0,0049	0,0146	-0,0002	0,0302
1	-0,0364	0,0147	0,0016	0,0111	0,0022	0,0421
2	-0,0186	0,0625	0,0056	0,0202	0,0216	0,0779
3	0,0237	0,1745	0,0126	0,0288	0,0299	0,1055
4	0,0813	0,3171	0,0504	0,0598	0,0663	0,1601
5	0,1801	0,4859	0,1499	0,0965	0,1151	0,2114
6	0,3365	0,6903	0,3118	0,1503	0,2564	0,3430
7	0,5974	0,9506	0,5985	0,2597	0,5725	0,6493

Tabelle 53: Rohdaten zu Abb. 50 - 6-PN (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 8 h-Wert der DMSO-Gruppe, (8 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2. PN = Prenylnaringenin. Daten aus der Masterarbeit von Gabriel Schulz.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (0,1 %)	6-PN	DMSO (0,1 %)	6-PN	DMSO (0,1 %)	6-PN
0	-0,0460	0,0778	0,0049	0,0037	-0,0002	0,0137
1	-0,0364	0,0825	0,0016	0,0018	0,0022	0,0244
2	-0,0186	0,1073	0,0056	0,0098	0,0216	0,0479
3	0,0237	0,1595	0,0126	0,0234	0,0299	0,0807
4	0,0813	0,2360	0,0504	0,0488	0,0663	0,1417
5	0,1801	0,3916	0,1499	0,0837	0,1151	0,2211
6	0,3365	0,6498	0,3118	0,1597	0,2564	0,3663
7	0,5974	0,9993	0,5985	0,3051	0,5725	0,6696

Tabelle 54: Rohdaten zu Anh. Abb. 67 - Seco (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 7 h-Wert der DMSO-Gruppe, (16 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2. Seco = Secoisolariciresinol.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (0,1 %)	Seco	DMSO (0,1 %)	Seco	DMSO (0,1 %)	Seco
0	0,0026	0,0019	0,0026	0,0022	0,0028	0,0016

1	0,0071	0,0142	0,0161	0,0313	0,0279	0,0229
2	0,0552	0,0970	0,0948	0,1634	0,1030	0,1157
3	0,1660	0,2739	0,2438	0,3708	0,2309	0,2620
4	0,3272	0,4762	0,3941	0,5825	0,3809	0,4084
5	0,5265	0,7041	0,5722	0,8247	0,5594	0,5811
6	0,7488	0,9572	0,7721	1,0889	0,7640	0,7890

Tabelle 55: Rohdaten zu Anh. Abb. 67 - Pino (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 7 h-Wert der DMSO-Gruppe, (16 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2. Pino = Pinoresinol.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (0,1 %)	Pino	DMSO (0,1 %)	Pino	DMSO (0,1 %)	Pino
0	0,0034	0,0027	0,0026	0,0023	0,0028	0,0025
1	0,0216	0,0239	0,0071	0,0145	0,0279	0,0212
2	0,0909	0,0842	0,0552	0,1057	0,1030	0,0992
3	0,2198	0,1859	0,1660	0,2753	0,2309	0,2277
4	0,3892	0,3143	0,3272	0,4767	0,3809	0,3663
5	0,5835	0,4725	0,5265	0,7111	0,5594	0,5348
6	0,7898	0,6403	0,7488	0,9492	0,7640	0,7319
Zeit (h)	Versuch 4					
	DMSO (0,1 %)	Pino				
0	0,0026	0,0034				
1	0,0161	0,0197				
2	0,0948	0,1163				
3	0,2438	0,2968				
4	0,3941	0,4802				
5	0,5722	0,6979				
6	0,7721	0,9465				

Tabelle 56: Rohdaten zu Anh. Abb. 67 - SB (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 7 h-Wert der DMSO-Gruppe, (16 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2. SB = Schisandrin B.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (1 %)	SB	DMSO (1 %)	SB	DMSO (1 %)	SB
0	0,0012	0,0019	0,0022	0,0020	0,0044	0,0047
1	0,0110	0,0059	0,0165	0,0118	0,0335	0,0402
2	0,0791	0,0313	0,0802	0,0552	0,1200	0,1360
3	0,2099	0,1027	0,2002	0,1603	0,2549	0,2737
4	0,3726	0,2353	0,3521	0,3130	0,4232	0,4406
5	0,5654	0,3999	0,5441	0,4915	0,6087	0,6203
6	0,7717	0,5760	0,7662	0,6813	0,8001	0,8115

Tabelle 57: Rohdaten zu Anh. Abb. 67 - Sesamin (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 7 h-Wert der DMSO-Gruppe, (16 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm N2.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (1 %)	Sesamin	DMSO (1 %)	Sesamin	DMSO (1 %)	Sesamin
0	0,0034	0,0024	0,0012	0,0019	0,0044	0,0044
1	0,0216	0,0124	0,0110	0,0076	0,0335	0,0535
2	0,0909	0,0410	0,0791	0,0500	0,1200	0,1652
3	0,2198	0,1120	0,2099	0,1483	0,2549	0,3184
4	0,3892	0,2197	0,3726	0,2870	0,4232	0,4934
5	0,5835	0,3519	0,5654	0,4632	0,6087	0,6755
6	0,7898	0,5004	0,7717	0,6675	0,8001	0,8643

8.2.5 ROS-Akkumulation in der *mev-1* Mutante unter thermalem Stress

Tabelle 58: Rohdaten zu Anh. Abb. 68 - Seco (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 6 h-Wert der DMSO-Gruppe, (16 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm TK22. Seco = Secoisolariciresinol.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (0,1 %)	Seco	DMSO (0,1 %)	Seco	DMSO (0,1 %)	Seco
0	0,0063	0,0019	0,0027	0,0038	0,0032	0,0022
1	0,0302	0,0188	0,0274	0,0246	0,0247	0,0190
2	0,0941	0,0597	0,0766	0,0651	0,0717	0,0580
3	0,1959	0,1442	0,1610	0,1464	0,1509	0,1299
4	0,3388	0,2828	0,2958	0,2920	0,2868	0,2431
5	0,5258	0,4677	0,4885	0,5053	0,4744	0,3967
6	0,7519	0,6927	0,7273	0,7746	0,7106	0,6097
Zeit (h)	Versuch 4					
	DMSO (0,1 %)	Seco				
0	0,0030	0,0026				
1	0,0296	0,0241				
2	0,0758	0,0751				
3	0,1551	0,1719				
4	0,2762	0,3393				
5	0,4533	0,5691				
6	0,6997	0,8657				

Tabelle 59: Rohdaten zu Anh. Abb. 68 - Pino (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 6 h-Wert der DMSO-Gruppe, (16 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm TK22. Pino = Pinoresinol.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (0,1 %)	Pino	DMSO (0,1 %)	Pino	DMSO (0,1 %)	Pino
0	0,0063	0,0103	0,0027	0,0031	0,0032	0,0027
1	0,0302	0,0324	0,0274	0,0219	0,0247	0,0170
2	0,0941	0,0751	0,0766	0,0528	0,0717	0,0449
3	0,1959	0,1557	0,1610	0,1062	0,1509	0,1012
4	0,3388	0,2843	0,2958	0,1869	0,2868	0,1924
5	0,5258	0,4617	0,4885	0,3085	0,4744	0,3321
6	0,7519	0,6881	0,7273	0,4815	0,7106	0,5397
Zeit (h)	Versuch 4					
	DMSO (0,1 %)	Pino				
0	0,0030	0,0028				
1	0,0296	0,0271				
2	0,0758	0,0928				
3	0,1551	0,2125				
4	0,2762	0,3750				
5	0,4533	0,5890				
6	0,6997	0,8617				

Tabelle 60: Rohdaten zu Anh. Abb. 68 - SB (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 6 h-Wert der DMSO-Gruppe, (16 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm TK22. SB = Schisandrin B.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (1 %)	SB	DMSO (1 %)	SB	DMSO (1 %)	SB
0	0,0039	0,0039	0,0028	0,0047	0,0030	0,0023
1	0,0274	0,0341	0,0232	0,0162	0,0127	0,0118
2	0,0779	0,0928	0,0622	0,0468	0,0343	0,0343
3	0,1538	0,1935	0,1317	0,1135	0,0861	0,0854
4	0,2622	0,3632	0,2421	0,2549	0,2072	0,1883
5	0,4129	0,6297	0,4260	0,4920	0,4149	0,3453
6	0,6584	1,0116	0,6733	0,8287	0,6848	0,5573

Tabelle 61: Rohdaten zu Anh. Abb. 68 - Sesamin (100 μ M), angegeben sind die normalisierten Mittelwerte der DCF-Fluoreszenz bezogen auf den 6 h-Wert der DMSO-Gruppe, (16 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm TK22.

Zeit (h)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	DMSO (1%)	Sesamin	DMSO (1%)	Sesamin	DMSO (1%)	Sesamin
0	0,0039	0,0035	0,0028	0,0033	0,0030	0,0027

1	0,0274	0,0235	0,0232	0,0227	0,0127	0,0149
2	0,0779	0,0898	0,0622	0,0616	0,0343	0,0420
3	0,1538	0,2119	0,1317	0,1220	0,0861	0,0890
4	0,2622	0,3905	0,2421	0,2254	0,2072	0,1687
5	0,4129	0,6473	0,4260	0,4033	0,4149	0,3010
6	0,6584	1,0183	0,6733	0,6589	0,6848	0,4930

8.2.6 Bestimmung der radikalfangenden Kapazität (TEAC-Methode)

8.2.6.1 Substanzscreening: 100 μM

Tabelle 62: Rohdaten zu Abb. 27, 51 und Anh. Abb. 69 – angegeben sind Absorptionswerte bei 734 nm: Trolox-Verdünnungsreihe, Flavonole und Flavanone, methylierte und prenylierte Derivate. Q-3-M = Quercetin-3-Methylether, ISK = Isosakuranetin, LQ = Liquiritigenin, Pino = Pinoresinol, PN = Prenylnaringenin, SB = Schisandrin B, Seco = Secoisolariciresinol.

Versuch	Trolox				
	0 μM	5 μM	10 μM	15 μM	20 μM
1	0,572	0,468	0,344	0,231	0,087
2	0,559	0,445	0,335	0,187	-0,010
3	0,565	0,458	0,352	0,201	0,058
Versuch	Quercetin	Galangin	Fisetin	Morin	Myricetin
	100 μM	100 μM	100 μM	100 μM	100 μM
1	-0,003	0,001	-0,003	-0,001	-0,002
2	0,001	0,003	0,000	0,000	0,000
3	0,001	0,004	0,001	0,001	0,003
Versuch	Rhamnetin	Q-3-M	Tamarixetin	Isorhamnetin	
	100 μM	100 μM	100 μM	100 μM	
1	-0,003	0,001	0,003	0,143	
2	0,056	0,003	0,000	0,099	
3	0,010	0,008	0,003	0,322	
Versuch	Naringenin	LQ	ISK	8-PN	6-PN
	100 μM	100 μM	100 μM	100 μM	100 μM
1	0,446	0,416	0,510	0,345	0,345
2	0,518	0,452	0,506	0,427	0,447
3	0,567	0,547	0,548	0,541	0,525
Versuch	Seco	Pino	SB	Sesamin	
	100 μM	100 μM	100 μM	100 μM	
1	-0,001	0,005	0,573	0,564	
2	0,000	0,011	0,571	0,561	
3	0,003	0,042	0,583	0,584	

8.2.6.2 konzentrationsabhängige Betrachtungen für stark antioxidative Substanzen

Tabelle 63: Rohdaten zu Abb. 26 und 40 - angegeben sind Absorptionswerte bei 734 nm: Trolox-Verdünnungsreihe, Flavonole, methylierte Quercetinderivate und Lignane. Pino = Pinoresinol, .Q-3-M = Quercetin-3-Methylether, Seco = Secoisolariciresinol.

Versuch	Trolox					
	0 μM	5 μM	10 μM	15 μM	20 μM	
1	0,568	0,454	0,312	0,177	0,021	
2	0,574	0,471	0,328	0,186	0,053	
3	0,568	0,462	0,331	0,219	0,039	
Versuch	Galangin			Fisetin		
	10 μM	25 μM	50 μM	10 μM	25 μM	50 μM
1	0,346	0,103	0,022	0,257	0,059	0,001
2	0,355	0,101	0,039	0,250	0,016	0,001
3	0,366	0,124	0,022	0,252	0,060	0,001
Versuch	Quercetin			Morin		
	10 μM	25 μM	50 μM	10 μM	25 μM	50 μM
1	0,039	0,000	0,001	0,312	0,040	0,000
2	0,045	0,001	0,000	0,326	0,123	0,000
3	0,063	0,001	0,001	0,318	0,040	0,001
Versuch	Myricetin					
	10 μM	25 μM	50 μM			
1	0,004	0,002	0,001			
2	0,002	0,001	0,001			
3	0,003	0,000	0,000			
Versuch	Q-3-M			Isorhamnetin		
	10 μM	25 μM	50 μM	10 μM	25 μM	50 μM
1	0,352	0,057	0,008	0,505	0,407	0,220
2	0,348	0,056	0,014	0,500	0,399	0,227
3	0,361	0,093	0,006	0,472	0,394	0,229
Versuch	Tamarixetin			Rhamnetin		
	10 μM	25 μM	50 μM	10 μM	25 μM	50 μM
1	0,334	0,007	0,001	0,125	0,002	0,000
2	0,325	0,042	0,000	0,109	0,001	0,003
3	0,335	0,056	0,000	0,151	0,001	0,000
Versuch	Seco			Pino		
	10 μM	25 μM	50 μM	10 μM	25 μM	50 μM
1	0,176	0,039	0,003	0,243	0,141	0,059
2	0,177	0,025	0,005	0,280	0,133	0,060
3	0,178	0,024	0,002	0,214	0,081	0,030

8.2.6.3 konzentrationsabhängige Betrachtungen für stark antioxidative Substanzen im niedermolaren Bereich

Tabelle 64: Rohdaten zu Abb. 26 - angegeben sind Absorptionswerte bei 734 nm: Trolox-Verdünnungsreihe, Quercetin und Myricetin.

Versuch	Trolox			
	0 μM	1,25 μM	2,5 μM	5 μM
1	0,529	0,477	0,442	0,391
2	0,545	0,492	0,449	0,399
3	0,543	0,482	0,457	0,385

Versuch	Quercetin			Myricetin		
	1,25 μM	2,5 μM	5 μM	1,25 μM	2,5 μM	5 μM
1	0,397	0,290	0,173	0,367	0,274	0,100
2	0,386	0,302	0,150	0,360	0,281	0,103
3	0,359	0,287	0,154	0,319	0,293	0,075

8.2.7 thermalen Stressresistenz im Wildtypen

Tabelle 65: Rohdaten zu Abb. 28 - Flavonole (100 μM), angegeben sind die virtuellen Todeszeitpunkte, X = zensiert. Stamm N2.

Versuch	DMSO (0,1 %)	Galangin	Morin	Fisetin	Myricetin
1	6,00	3,00	6,25	3,75	5,75
	6,50	4,75	6,50	5,75	6,50
	6,75	6,25	6,75	5,75	7,00
	6,75	6,75	6,75	7,00	7,00
	7,00	7,00	7,00	7,50	7,25
	7,00	7,25	7,50	7,50	7,25
	7,25	7,50	7,50	7,50	7,50
	7,75	7,50	7,75	8,00	8,50
	2	6,00	5,75	6,50	4,75
6,25		7,00	6,75	6,25	6,75
6,50		7,25	7,25	6,75	6,75
7,00		7,25	7,25	6,75	6,75
7,00		7,50	7,50	7,00	6,75
7,50		7,50	7,75	7,00	7,00
7,50		7,75	7,75	7,25	7,00
X		7,75	8,00	7,50	7,00
3		6,50	6,00	6,25	6,75
	6,75	6,25	6,75	6,75	6,75
	6,75	7,00	7,00	6,75	6,75
	7,00	7,00	7,25	7,00	7,00
	7,00	7,25	7,50	7,25	7,00
	7,00	7,50	8,00	7,25	7,50

	7,25	7,50	8,00	7,25	7,50
	7,75	8,00	X	8,50	7,50

Tabelle 66: Rohdaten zu Abb. 28 und 41 - Quercetin und methylierte Quercetinderivate (100 μ M), angegeben sind die virtuellen Todeszeitpunkte, X = zensiert. Stamm N2.

Versuch	DMSO (0,2 %)	Quercetin	Tamarixetin	Isorhamnetin
1	5,50	6,75	5,25	7,00
	5,75	6,75	6,00	7,00
	6,00	7,00	6,25	7,00
	6,50	7,00	6,25	6,75
	6,75	7,50	6,50	6,75
	7,50	7,50	6,50	6,50
	7,50	7,50	6,75	6,50
	7,50	7,75	6,75	6,00
2	4,50	5,50	4,50	4,50
	5,50	6,25	4,50	5,25
	5,75	6,75	5,25	6,00
	5,75	6,75	5,75	6,00
	6,25	6,75	6,00	6,25
	6,25	6,75	6,25	6,50
	6,50	X	6,25	6,50
	7,00	X	6,25	7,00
3	5,75	5,50	6,00	3,75
	6,00	5,50	6,00	5,00
	6,00	5,75	6,25	6,00
	6,25	5,75	6,25	6,25
	6,50	6,25	6,50	6,25
	6,50	6,25	6,75	6,50
	6,75	6,50	6,75	6,50
	6,75	3,50	7,00	6,75

Tabelle 67: Rohdaten zu Abb. 41 - methylierte Quercetinderivate (100 μ M), angegeben sind die virtuellen Todeszeitpunkte, X = zensiert. Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

Versuch	DMSO (0,2 %)	Q-3-M	Rhamnetin
1	5,5	5,50	5,5
	6	5,75	6,75
	6,25	6,25	7,25
	6,25	6,25	7,25
	6,25	6,25	7,25
	6,25	7,00	7,75
	6,5	X	7,75
	7,25	X	12
2	4,75	5,25	5,25
	5,00	5,50	6,00

	5,50	5,75	7,50
	5,75	6,00	7,50
	6,00	6,00	8,00
	6,00	6,25	8,00
	6,25	6,50	8,25
	6,75	6,75	8,25
3	5,50	6,50	6,50
	5,75	6,75	7,50
	6,00	7,25	7,50
	6,50	7,50	7,50
	6,75	7,50	7,50
	7,50	7,75	7,75
	7,50	8,00	8,00
	7,50	8,50	9,00

Tabelle 68: Rohdaten zu Abb. 18 und 52 - Flavanone (100 µM), angegeben sind die virtuellen Todeszeitpunkte, X = zensiert. Stamm N2. ISK = Isosakuranetin, LQ = Liquiritigenin.

Versuch	DMSO (0,1 %)	LQ	ISK
1	3,50	5,75	6,25
	5,50	5,75	6,75
	5,75	6,00	7,00
	6,50	6,50	7,25
	6,75	6,50	7,50
	6,75	7,00	7,50
	X	7,25	7,75
	X	X	8,00
2	7,75	6,75	6,00
	7,50	7,00	6,50
	7,25	7,25	7,00
	7,25	7,25	7,00
	7,00	7,50	7,00
	7,00	8,50	7,25
	6,25	8,50	8,25
	5,50	9,25	8,75
3	4,75	6,25	6,25
	6,25	6,25	6,50
	6,50	6,75	6,75
	6,75	6,75	6,75
	7,00	7,00	6,75
	7,00	7,50	7,00
	7,25	7,75	7,75
	7,25	X	8,25

Tabelle 69: Rohdaten zu Abb. 18 und 52- Naringenin und prenylierte Derivate (100 μM), angegeben sind die virtuellen Todeszeitpunkte. Stamm N2. PN = Prenylnaringenin. Daten aus der Masterarbeit von Gabriel Schulz.

Versuch	DMSO (0,1 %)	8-PN	6-PN	Naringenin
1	5,75	8,00	7,50	7,75
	9,50	8,50	7,75	8,00
	9,50	8,50	7,75	8,00
	9,75	8,50	8,00	8,25
	10,00	9,00	8,50	8,50
	10,25	9,50	8,75	8,50
	10,50	9,75	9,50	8,75
	10,75	10,00	9,50	9,00
2	7,75	7,50	6,50	7,50
	8,50	8,00	8,00	7,50
	8,50	8,00	8,00	8,00
	8,75	8,50	8,50	8,50
	8,75	8,75	8,50	8,50
	8,75	8,75	8,50	8,50
	9,00	9,00	8,50	8,75
	9,75	9,00	10,00	9,00
3	5,50	6,50	6,75	6,25
	5,75	6,75	6,75	6,25
	6,75	6,75	7,00	6,50
	6,75	7,25	7,25	6,50
	7,00	7,50	7,50	7,00
	7,25	7,75	7,75	7,50
	7,50	8,00	7,75	7,75
	7,75	8,50	8,50	7,75

Tabelle 70: Rohdaten zu Anh. Abb. 70 – Lignane (100 μM) 1, angegeben sind die virtuellen Todeszeitpunkte, X = zensiert. Stamm N2. Pino = Pinoresinol, Seco = Secoisolariciresinol.

Versuch	DMSO (0,1 %)	Seco	Pino	DMSO (1 %)	Sesamin
1	2,25	2,00	3,00	1,75	2,25
	2,75	2,25	3,00	2,25	2,75
	3,00	2,75	3,25	2,50	2,75
	3,25	4,50	3,25	2,50	3,00
	3,25	4,75	3,75	2,75	3,25
	3,50	5,00	3,75	3,00	3,50
	3,50	5,25	4,25	3,00	3,75
	4,50	5,50	4,50	4,25	3,75
	5,00	5,50	4,50	4,25	3,75
	5,00	5,75	4,75	5,00	4,00
	5,25	5,75	5,25	5,50	4,50
	5,25	5,75	5,50	5,50	5,00
	6,00	6,00	5,50	5,75	5,25

	6,75	6,50	6,25	6,00	5,50
	X	7,50	6,25	6,75	5,50
	X	7,50	7,25	7,00	6,75
2	2,00	2,00	2,00	2,50	2,50
	2,25	2,50	2,50	2,75	3,00
	2,50	2,75	2,75	3,50	3,50
	3,00	3,00	3,00	3,75	3,50
	3,00	3,50	3,00	4,00	3,50
	3,75	3,75	3,00	4,00	3,75
	3,75	4,50	3,75	4,25	4,50
	3,75	4,75	3,75	4,25	4,75
	4,25	5,00	4,00	4,25	4,75
	5,00	5,00	4,00	4,75	5,00
	5,00	5,00	4,75	4,75	5,00
	5,25	5,25	4,75	4,75	5,25
	5,25	5,25	5,25	5,00	5,50
	5,75	5,75	6,25	5,50	5,50
	5,75	6,00	6,25	5,50	5,75
	6,25	6,25	6,75	6,00	6,25
3	2,25	2,00	2,25	2,50	2,25
	2,50	2,50	2,25	3,00	2,50
	2,50	2,75	2,25	3,25	2,50
	2,75	2,75	2,50	3,75	2,75
	3,25	3,25	2,50	4,00	3,25
	3,50	3,25	2,50	4,25	3,25
	3,75	3,25	2,75	4,50	3,25
	3,75	4,00	3,25	4,50	4,00
	3,75	4,00	3,25	4,50	4,50
	3,75	4,50	3,75	4,75	5,00
	4,00	4,50	3,75	5,00	5,00
	4,50	5,00	4,50	5,50	5,25
	4,75	5,00	4,50	5,75	5,25
	4,75	5,25	4,50	6,25	5,50
	5,50	5,25	4,75	6,25	5,50
	6,75	5,75	5,25	6,50	5,50

Tabelle 71: Rohdaten zu Anh. Abb. 70 – Lignane (100 μ M) 2, angegeben sind die virtuellen Todeszeitpunkte. Stamm N2. SB = Schisandrin B.

Versuch	DMSO (1 %)	SB
1	2,00	2,00
	2,25	2,25
	2,50	2,25
	3,00	2,75
	3,00	2,75
	3,75	3,00

	3,75	3,25
	3,75	3,50
	4,25	3,50
	5,00	4,25
	5,00	4,75
	5,25	4,75
	5,25	5,50
	5,75	5,50
	5,75	5,50
	6,25	5,75
2	2,50	2,75
	3,00	3,25
	3,25	3,25
	3,75	3,75
	4,00	3,75
	4,25	4,75
	4,50	4,75
	4,50	4,75
	4,50	5,00
	4,75	5,25
	5,00	5,25
	5,50	5,25
	5,75	6,00
	6,25	6,50
	6,25	6,75
	6,50	7,00

8.2.8 thermalen Stressresistenz in der *mev-1*-Mutante

Tabelle 72: Rohdaten zu Anh. Abb. 71- Lignane (100 µM) 2, angegeben sind die virtuellen Todeszeitpunkte, X = zensiert, Stamm TK22. Pino = Pinoresinol, SB = Schisandrin B, Seco = Secoisolariciresinol.

Versuch	DMSO (0,1%)	Pino	Seco	DMSO (1%)	Sesamin	SB
1	3,50	4,00	3,00	3,50	2,75	3,75
	3,50	4,50	4,50	3,75	4,00	4,00
	3,75	5,25	5,25	3,75	4,25	4,25
	4,75	5,75	5,50	4,00	4,50	4,50
	5,00	5,75	5,75	4,25	4,75	4,75
	5,25	5,75	5,75	4,50	4,75	5,25
	5,25	5,75	5,75	4,50	5,00	5,25
	5,50	6,00	5,75	4,75	5,00	5,50
	5,50	6,25	5,75	5,00	5,00	5,75
	5,50	6,50	6,00	5,00	5,25	5,75
	5,75	6,50	6,25	5,25	5,50	5,75
	5,75	6,75	6,25	5,50	5,75	6,00
	6,00	6,75	6,25	5,50	5,75	6,25

	6,25	6,75	6,25	5,75	6,00	6,50
	6,75	7,25	6,50	7,00	6,25	6,75
	X	7,50	6,75	7,25	7,00	7,00
2	3,00	4,00	2,25	4,25	3,75	3,00
	3,75	4,50	2,50	5,00	4,75	3,75
	4,00	5,25	3,00	5,00	5,00	4,25
	4,25	5,75	3,50	5,25	5,00	4,50
	4,50	5,75	3,75	5,50	5,25	4,50
	5,00	5,75	4,25	5,50	5,50	5,00
	5,00	5,75	4,25	5,50	5,50	5,00
	5,50	6,00	4,75	5,50	5,50	5,25
	5,50	6,25	4,75	5,50	5,50	5,25
	5,75	6,50	5,00	5,75	5,50	5,50
	5,75	6,50	5,25	5,75	5,50	5,50
	6,00	6,75	5,25	6,00	5,75	5,50
	6,25	6,75	5,50	6,00	5,75	5,50
	7,00	6,75	6,00	6,00	6,25	6,00
	7,00	7,25	6,25	6,00	6,75	6,00
	8,50	7,50	7,00	6,25	7,75	7,00
3	2,75	2,25	3,25	2,25	5,75	2,50
	3,00	3,00	3,25	3,25	5,75	3,25
	3,25	3,00	3,25	4,25	4,75	4,25
	3,25	3,75	3,50	4,75	6,00	5,00
	3,25	4,00	3,50	5,00	5,75	5,25
	4,00	4,00	3,50	5,25	5,50	5,75
	4,25	4,25	4,00	5,25	4,25	5,75
	4,50	4,50	4,00	5,25	4,25	5,75
	4,75	4,75	4,25	5,50	5,25	5,75
	5,00	5,00	4,50	5,50	5,50	5,75
	5,00	5,25	4,75	5,50	5,50	5,75
	5,00	5,50	5,00	5,75	2,75	6,00
	5,50	5,50	5,25	5,75	3,75	6,25
	5,50	6,00	7,00	6,50	2,75	6,50
	5,75	6,50	7,25	6,75	4,75	6,75
	6,25	6,50	X	6,75	6,25	7,00
4	0,75	1,00	1,25	3,50	3,00	2,50
	1,00	1,00	1,25	3,50	3,25	2,50
	1,00	1,25	1,75	3,75	3,25	2,75
	1,00	1,50	2,00	3,75	3,25	3,00
	1,25	1,50	2,25	4,00	3,50	3,00
	1,25	2,00	2,75	4,00	3,50	3,25
	1,25	2,00	2,75	4,25	3,75	3,25
	1,50	2,50	2,75	4,25	4,00	4,00
	1,50	2,75	3,00	4,50	4,00	4,25
	2,50	3,00	3,00	4,50	4,75	4,50
	2,75	3,50	3,75	5,25	4,75	4,75

	3,50	3,75	4,00	5,25	5,00	4,75
	4,00	4,00	4,50	5,50	5,25	4,75
	4,75	4,00	4,50	5,50	5,75	5,00
	5,00	4,50	4,75	5,50	6,50	6,00
	5,25	4,50	4,75	6,25	6,50	X

8.2.9 Lokalisation von GFP-gekoppelten Transkriptionsfaktoren

8.2.9.1 DAF-16::GFP-Lokalisation (Kurzzeitinkubation)

Tabelle 73: Rohdaten zu Abb. 30 - Flavonole (100 μ M), angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe). Stamm TJ356, PK = Positivkontrolle.

Versuch	DMSO (0,1 %)	Galangin	Fisetin	Morin	Myricetin	PK (5 min 37°C)
1	0,00	6,67	16,67	10,00	23,33	100,00
2	0,00	16,67	26,67	16,67	20,00	100,00
3	10,00	13,33	20,00	26,67	23,33	100,00

Tabelle 74: Rohdaten zu Abb. 30 und 42 - Quercetin und methylierte Quercetinderivate (50 μ M), angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe). Q-3-M = Quercetin-3-Methylether. Stamm TJ356.

Versuch	DMSO (0,1 %)	Quercetin	Q-3-M	Tamarixetin	Isorhamnetin
1	0,00	26,67	23,33	23,33	33,33
2	10,00	40,00	20,00	23,33	13,33
3	3,33	16,67	40,00	16,67	43,33
4	13,33	43,33	30,00	46,67	50,00

Tabelle 75: Rohdaten zu Abb. 30 und 53 - Flavanone (100 μ M), angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm TJ356. ISK = Isosakuranetin, LQ = Liquiritigenin, PK = Positivkontrolle.

Versuch	DMSO (0,1 %)	ISK	LQ	PK (Negletein)
1	10,00	20,00	30,00	40,00
2	10,00	30,00	50,00	70,00
3	16,67	23,33	13,33	23,33
4	13,33	23,33	56,66	0,00

Tabelle 76: Rohdaten zu Abb. 30 und 53 - Naringenin und prenylierte Derivate (100 μ M), angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm TJ356. PK = Positivkontrolle, PN = Prenylnaringenin. Daten aus der Masterarbeit von Gabriel Schulz.

Versuch	DMSO (0,1 %)	Naringenin	8-PN	6-PN	PK (Negletein)
1	33,30	26,70	16,70	43,30	73,30
2	33,30	53,30	56,70	53,30	76,70

3	16,70	30,00	13,30	26,70	50,00
----------	-------	-------	-------	-------	-------

Tabelle 77: Rohdaten zu Anh. Abb. 72- Seco (100 μ M), angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm TJ356. Seco = Secoisolariciresinol.

Versuch	DMSO (0,1 %)	Seco
1	20,00	20,00
2	13,33	30,00
3	16,67	23,33

Tabelle 78: Rohdaten zu Anh. Abb. 72- Pino (100 μ M), angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm TJ356. Pino = Pinoresinol.

Versuch	DMSO (0,1 %)	Pino
1	10,00	30,00
2	16,13	36,67
3	13,33	33,33

Tabelle 79: Rohdaten zu Anh. Abb. 72- SB (100 μ M), angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe), Stamm TJ356. SB = Schisandrin B.

Versuch	DMSO (1 %)	SB
1	10,00	20,00
2	16,13	16,67
3	6,67	10,00

Tabelle 80: Rohdaten zu Anh. Abb. 72 - Sesamin (100 μ M), angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe). Stamm TJ356.

Versuch	DMSO (1 %)	Sesamin
1	10,00	16,67
2	16,13	33,33
3	10,34	56,67
4	10,34	16,67

8.2.9.2 DAF-16::GFP-Lokalisation (Langzeitinkubation)

Tabelle 81: Rohdaten zu Abb. 31 und 43- Flavonole und Q-3-M (50 µM), angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe). Stamm TJ356. PK = Positivkontrolle, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

Versuch	DMSO (0,1 %)	Galangin	Morin	Quercetin	Q-3-M	Myricetin	PK (5 min 37°C)
1	30,00	20,00	10,00	10,00	13,33	23,33	90,00
2	10,00	16,67	33,33	6,67	26,67	16,67	90,00
3	16,67	3,33	6,67	33,33	30,00	13,33	96,67

Tabelle 82: Rohdaten zu Abb. 31 - Liquiritigenin (100 µM), angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe). Stamm TJ356. LQ = Liquiritigenin, PK = Positivkontrolle.

Versuch	DMSO (0,1 %)	LQ	PK (5 min 37°C)
1	36,67	10,00	96,67
2	23,33	10,00	100,00
3	10,00	6,67	96,67

Tabelle 83: Rohdaten zu Abb. 54- prenylierte Naringeninderivate (100 µM), angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe). Stamm TJ356. PK = Positivkontrolle, PN = Prenylnaringenin.

Versuch	DMSO (0,1 %)	8-PN	6-PN	PK (5 min 37°C)
1	3,33	26,67	16,67	90,00
2	6,67	30,00	6,67	93,33
3	16,67	30,00	40,00	96,67

8.2.9.3 SKN-1::GFP-Lokalisation (Langzeitinkubation)

Tabelle 84: Rohdaten zu Anh. Abb. 62A- Austestung der Positivkontrolle für eine nukleäre SKN-1::GFP-Lokalisation, angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP. Die Tiere wurden für 64 h in Inkubationsmedium mit 0,1 % DMSO vorbehandelt. Stamm LD001.

Behandlungsgruppen	nukleär (%)	Anzahl der Tiere
Kontrolle	13,33	30
1 h 10 mM H ₂ O ₂	83,33	30
15 min 5 mM Na-Azid	30,00	30
10 min 5 mM Azid (auf Objektträger)	62,50	16

Tabelle 85: Rohdaten zu Anh. Abb. 62B- Austestung der Positivkontrolle für eine nukleäre SKN-1::GFP-Lokalisation, angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP. Die Tiere wurden für 64 h in Inkubationsmedium mit 0,1 % DMSO vorbehandelt. Stamm LD001.

Behandlungsgruppen	nukleär (%)	Anzahl der Tiere
Kontrolle	6,67	30

1h 0,1 mM H₂O₂	16,67	30
1h 1 mM H₂O₂	26,67	30
1h 10 mM H₂O₂	80,00	30

Tabelle 86: Rohdaten zu Abb. 33 und 44- Flavonole und Q-3-M (50 µM), angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe). Stamm LD001. PK = Positivkontrolle, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

Versuch	DMSO (0,1 %)	Galangin	Morin	Quercetin	Q-3-M	Myricetin	PK (1 h 10 mM H ₂ O ₂)
1	20,00	10,00	0,00	26,67	26,67	30,00	83,33
2	16,67	16,67	13,33	6,67	6,67	10,00	56,67
3	16,67	10,00	3,33	16,67	23,33	6,67	76,67

Tabelle 87: Rohdaten zu Abb. 33- Liquiritigenin (100 µM), angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe). Stamm LD001. LQ = Liquiritigenin, PK = Positivkontrolle.

Versuch	DMSO (0,1 %)	LQ	PK (1h 10 mM H ₂ O ₂)
1	20,00	13,33	93,33
2	6,67	6,67	90,00
3	13,33	6,67	56,67
4	10,00	20,00	76,67

Tabelle 88: Rohdaten zu Abb. 55 - prenylierte Naringeninderivate (100 µM), angegeben ist der prozentuale Anteil der Nematoden mit nukleärem GFP, (30 Nematoden/Versuch und Gruppe). PK = Positivkontrolle, PN = Prenylnaringenin. Stamm LD001.

Versuch	DMSO	8-PN	6-PN	PK (1h 10 mM H ₂ O ₂)
1	10,00	0,00	3,33	66,67
2	10,00	10,00	16,67	93,33
3	13,33	6,67	16,67	73,33

8.2.10 HSP-16.2::GFP und MYOSIN-3::GFP-Expression

Tabelle 89: Rohdaten zu Anh. Abb. 63A - Vorversuch: Messung der HSP-16.2::GFP-Expression in CL2070 Tieren mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen. Angegeben sind die Mittelwerte der GFP-Fluoreszenz (20 Nematoden/Versuch), V = Versuch.

Zeit bei 35°C (min)	Körper				Kopf			
	V1	V2	V3	V4	V1	V2	V3	V4
0	488	633	774	660	682	1098	1079	1100
30	5182	10330	10425	8990	13657	20402	25821	23932
60	9776	6885	6884	8011	21783	16355	16569	17340
120	5843	8264	7212	5619	12696	13342	15615	13347

Tabelle 90: Rohdaten zu Anh. Abb. 63B - Vorversuch: Messung der Fläche der CL2070-Tiere mittels mikroskopischer Aufnahmen. Angegeben sind die Mittelwerte Fläche in Pixel/cm² (20 Nematoden/Versuch), V = Versuch.

Zeit bei 35°C (min)	Körper			
	V1	V2	V3	V4
0	119	92	71	80
30	111	58	64	74
60	52	59	78	59
120	59	59	35	44

Tabelle 91: Rohdaten zu Anh. Abb. 63C - Vorversuch: Messung der HSP-16.2::GFP-Expression in CL2070-Tieren mittels Fluoreszenzmessung im Plattenlesegerät. Angegeben sind die Mittelwerte der GFP-Fluoreszenz (20 Nematoden im Triplikate bzw. 40 Nematoden im Duplikat/Versuch), V = Versuch.

Zeit bei 35°C (min)	20 Tiere/ Well (Triplikate)			40 Tiere/ Well (Duplikate)		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3
0	24	5	53	-4	31	33
30	596	480	618	1112	873	1225
60	244	414	448	993	732	833
120	306	236	246	589	392	413

Tabelle 92: Rohdaten zu Anh. Abb. 63D - Vorversuch: Messung der HSP-16.2::GFP-Expression in CL2070-Tieren mittels Fluoreszenzmessung im Plattenlesegerät. Angegeben sind die Mittelwerte der GFP-Fluoreszenz (20 Nematoden im Triplikate bzw. 40 Nematoden im Duplikat/Versuch), V = Versuch.

Zeit bei 35°C (min)	20 Tiere/ Well (Triplikate)
	V1
0	-10
5	-7
10	-1
15	58
30	396

Tabelle 93: Rohdaten zu Anh. Abb. 64A- Vorversuch: Messung der MYOSIN-3::GFP-Expression in PD4251-Tieren mittels Fluoreszenzmessung im Plattenlesegerät. Angegeben sind die Mittelwerte der GFP-Fluoreszenz (20 Nematoden im Triplikate bzw. 40 Nematoden im Duplikat/Versuch), Fütterung mit lebenden OP50-1 *E. coli*s. V = Versuch.

Zeit (h)	20 Tiere/Well		40 Tiere/ Well	
	V1	V2	V1	V2
0	39	105	123	180
24	167	249	330	429
48	803	1070	1465	2001
72	3630	4768	7448	8646

Tabelle 94: Rohdaten zu Anh. Abb. 64B - Vorversuch: Messung der Fläche der PD4251-Tiere mittels mikroskopischer Aufnahmen. Angegeben sind die Mittelwerte Fläche in μm^2 (20 Nematoden/Versuch), Fütterung mit lebenden OP50-1 *E. colis*. V = Versuch.

Zeit (h)	V1	V2
0	115	234
24	210	526
48	544	1124
72	2278	4988

Tabelle 95: Rohdaten zu Anh. Abb. 64C - Vorversuch: Messung der MYOSIN-3::GFP-Expression in PD4251-Tieren mittels Fluoreszenzmessung im Plattenlesegerät. Angegeben sind die Mittelwerte der GFP-Fluoreszenz (20 Nematoden im Triplikot bzw. 40 Nematoden im Duplikot/Versuch), Fütterung mit hitzeinaktivierten OP50-1 *E. colis*. V = Versuch.

Zeit (h)	20 Tiere/Well	40 Tiere/ Well
	V1	V1
0	20	21
24	44	56
48	147	216
72	469	563

Tabelle 96: Rohdaten zu Anh. Abb. 64D - Vorversuch: Messung der Fläche der PD4251-Tiere mittels mikroskopischer Aufnahmen. Angegeben sind die Mittelwerte Fläche in μm^2 (20 Nematoden/Versuch), Fütterung mit hitzeinaktivierten OP50-1 *E. colis*. V = Versuch.

Zeit (h)	V1
0	28
24	61
48	148
72	366

Tabelle 97: Rohdaten zu Abb. 35 und 45 - Flavonole (50 μM), angegeben ist der Mittelwert der HSP-16.2::GFP-Fluoreszenz aus einem Triplikot mit 20 Tieren/Well (60 Tiere/Versuch und Gruppe), Stamm CL2070. Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

Versuch	DMSO (0,1 %)		Quercetin		Q-3-M		Galangin		Morin		Myricetin	
	20° C	35° C	20° C	35° C	20° C	35° C	20° C	35° C	20° C	35° C	20° C	35° C
1	1	527	11	621	12	682	48	684	14	613	25	694
2	28	638	18	614	44	806	26	677	37	718	18	631
3	17	467	13	496	10	472	-5	469	14	536	23	575

Tabelle 98: Rohdaten zu Abb. 35 und 45- Flavonole (50 μ M), angegeben ist der Mittelwert der MYOSIN-3::GFP-Fluoreszenz aus einem Triplikate mit 20 Tieren/Well (60 Tiere/Versuch und Gruppe), Stamm PD4251 Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

Versuch	DMSO (0,1 %)	Quercetin	Q-3-M	Galangin	Morin	Myricetin
1	3013	3076	3446	3478	3519	3688
2	2210	2269	2664	2589	2860	2617
3	2631	2514	2778	2863	3118	2835

Tabelle 99: Rohdaten zu Abb. 56- Flavanone (100 μ M), angegeben ist der Mittelwert der HSP-16.2::GFP-Fluoreszenz aus einem Triplikate mit 20 Tieren/Well (60 Tiere/Versuch und Gruppe), Stamm CL2070. LQ = Liquiritigenin, PN = Prenylnaringenin.

Versuch	DMSO (0,1 %)		8-PN		6-PN		LQ	
	20°C	35°C	20°C	35°C	20°C	35°C	20°C	35°C
1	45	961	15	836	20	958	20	937
2	25	983	27	686	16	851	33	757
3	3	616	15	507	24	578	24	429

Tabelle 100: Rohdaten zu Abb. 56 - Flavanone (100 μ M), angegeben ist der Mittelwert der MYOSIN-3::GFP-Fluoreszenz aus einem Triplikate mit 20 Tieren/Well (60 Tiere/Versuch und Gruppe), Stamm PD4251. LQ = Liquiritigenin, PN = Prenylnaringenin.

Versuch	DMSO (0,1 %)	8-PN	6-PN	LQ
1	2916	2920	3092	2762
2	3175	3111	3088	2931
3	2970	2770	3246	2958

8.2.11 $\text{A}\beta_{1-42}$ -Toxizität unter *daf-16* RNAi-Bedingungen

Tabelle 101: Rohdaten zu Anh. Abb. 59: Angegeben sind GFP-Fluoreszenzwerte von jedem Tier. Stamm TJ356.

Leervektor	<i>daf-16</i> (RNAi)
23184	4051
22141	8256
26307	5153
27125	7095
26445	6140
23710	5137
22709	3777
26124	3950
23020	3163
27712	4836
21817	5640

32		1		32		1	1	34		0	0
34	0	1	1	32		1	1	34		0	0
34	0	1	1	32		1	1	34		0	0
34	0	1	0	32		1	1	34		0	0
34	0	0	0	32		1	1	34		0	0
34	0	0	0	32		1	1	34		0	
34		0	0	32		1	1	34		0	
34		0		32		1		34		0	
				32		1		34		0	
				32		1		34		0	
				32		1		34		0	
				32		1		34		0	
				32		1		34		0	
				34	1	1		34		0	
				34	1	1		34		0	
				34		1					
				34		1					
				34		1					
				34		0					
				34		0					

Versuch 4

Zeit (h)	DMSO (0,1%)	Q-3-M
26	1	
28	1	1
28	1	1
30	1	1
30	1	1
30	1	1
30	1	1
30	1	1
30	1	1
30	1	1
30	1	1
30	1	
30	1	
30	1	
30	1	
30	1	
30	1	
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1

32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32		1
32		1
34	1	1
34	1	1
34	1	1
34	1	1
34	1	1
34	1	1
34	0	1
34	0	0
34	0	0
34	0	0
34	0	0
34	0	0
34	0	0
34	0	0
34		0
34		0
34		0
34		0
34		0
34		0
34		0
34		0

Tabelle 103: Rohdaten zu Abb. 46 - Quercetin und Q-3-M, unter *daf-16* RNAi-Bedingungen. Angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralysiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176. Q = Quercetin, Q-3-M = Quercetin-3-Methylether.

Versuch 1				Versuch 2				Versuch 3			
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Q	Q-3-M	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Q	Q-3-M	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	Q	Q-3-M
26	0		0	26	1			28			
26	0		0	28	1	1	1	28	1		1
26	0			28	1	1	1	30	1		
28	1	1	1	28	1	1	1	30	1	1	1
28	1	1	1	28	1	1	1	30	1	1	1
28	1	1	1	28	1	1	1	30	1	1	1
28	1	1	1	28	1	1	1	30	1	1	1
28	1	1	1	28	1	1	1	30	1	1	1
28	1		1	28		0		30	1	1	1
28	1			30	1	1	1	30	1	1	1
28	1			30	1	1	1	30		1	1
28	1			30	1	1	1	30		1	1

30	1	1
30	1	1
30	1	1
30	1	1
30	1	1
30	1	1
30	1	1
30	1	
30	1	
30	1	
30	1	
30	1	
30	1	
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1
32	1	1
34	1	1
34	1	1
34	1	1
34	1	1
34	1	1
34	0	1
34	0	1
34	0	0
34	0	0
34	0	0
34	0	0
34	0	0
34	0	0
34		0
34		0
34		0
34		0
34		0

Tabelle 104: Rohdaten zu Abb. 57 - 8-PN und 6-PN, unter Leervektor-Bedingungen. Angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyziert, 0 = zensiert), Stamm CL4176. PN = Prenylningenin. Daten aus der Masterarbeit von Gabriel Schulz.

Versuch 1				Versuch 2				Versuch 3			
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	8-PN	6-PN	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	8-PN	6-PN	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	8-PN	6-PN
26	1	1	1	26	1	1	1	26	1	0	
26	1		1	26	1		1	28	1	1	1
26	1			26			1	28	1	1	1
26	1			26			1	28	1	1	
28	1	1	1	26			1	28	1		
28	1	1	1	26			1	28	1		
28	1	1	1	26			1	28	1		
28	1	1	1	28	1	1	1	30	1	1	1
28	1	1	1	28	1	1	1	30	1	1	1
28	1	1	1	28	1	1	1	30	1	1	1
28	1	1		28	1	1	1	30	1	1	1
28	1	1		28	1	1	1	30	1	1	1
28	1	1		28	1	1		30	1	1	1
28	1	1		28	1	1		30	1	1	1
28	1	1		28	1	1		30	1	1	1
28	1	1		28	1	1		30	1	1	1
28	1	1		28	1	1		30	1	1	1
28	1	1		28	1	1		30	1	0	1
28	1			28	1	1		30	1		1
28	1			28		1		30	1		1
28	1			28		1		30			1
28	1			28		1		30			1
28	1			28		1		32	1	1	1
28	1			28		0		32	1	1	1
28	1			30	1	1	1	32	1	1	1
28	1			30	1	1	1	32	1	1	1
28	1			30	1	1	1	32	1	1	1
30	1	1	1	30	1	1	1	32	1	1	1
30	1	1	1	30	1	1	1	32	1	1	1
30	1	1	1	30	1	1	1	32	1	1	1
30	1	1	1	30	1	1	1	32	1	1	1
30	1	1	1	30	1	1	1	32		1	1
30	1	1	1	30	1	1	1	32		1	
30	1	1	1	30	1	1	1	34	1	1	1
30	1	1	1	30	1	1	1	34	1	1	1
30	1	1	1	30	1	1	1	34	1	1	1
30	0	1	1	30	1	1	1	34	1	1	1
30		1	1	30		1	1	34	1	1	1
30		1	1	30		1	1	34	1	0	1
30		1	1	30		1	1	34	1	0	0
30		1	1	30		0		34	1	0	0
30		1	1	32	1	1	1	34	0	0	0

30		1	1	32	1	1	1	34	0	0	0
30		1	1	32	1	1	1	34		0	0
30		1	1	32	1		1	34		0	0
30		1	1	32	1		1				
30		1	1	32			1				
30			1	32			1				
30			1	32			1				
30			0	32			1				
32		1	1	32			1				
32		1	1	32			0				
32		1	1	34	0	0	1				
34	1	0	1	34	0	0	1				
34	0	0	0	34	0	0	1				
34	0	0	0	34	0		1				
34	0		0	34	0		0				
34			0	34	0		0				
34			0	34	0		0				
				34	0		0				
				34	0						

Versuch 4

Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	8-PN	6-PN
28	1	1	1
28	1	1	1
28	1	1	1
28	1	1	1
28	1	1	
28		1	
28		1	
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	1
30	1	1	

30	1		
30	1		
30	1		
30	1		
30	1		
30	1		
30	0		
32	1	1	1
32	1	1	1
32	1	1	1
32	1	1	1
32	1	1	1
32	1	1	1
32	1		1
32	1		1
32	1		1
32			1
32			1
32			1
32			1
34	1	1	1
34	1	1	0
34	0	1	0
34		1	0
34		1	0
34		0	0
34		0	
34		0	
34		0	
34		0	
34		0	
34		0	

Tabelle 105: Rohdaten zu Abb. 57 - 8-PN und 6-PN, unter *daf-16* RNAi-Bedingungen. Angegeben sind Zeitpunkte, an denen ein Ereignis stattfand (1 = paralyisiert, 0 = zensiert), Stamm CL4176. PN = Prenylnaringenin. Daten aus der Masterarbeit von Gabriel Schulz.

Versuch 1				Versuch 2				Versuch 3			
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	8-PN	6-PN	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	8-PN	6-PN	Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	8-PN	6-PN
26	1	1	1	26	1			26	1		0
26	1		1	26	1			26	1		
26	1		1	26	1			28	1	1	
26	1		1	26	1			28	1	1	
26	1			26	1			28		1	
28	1	1	1	26	1			30	1	1	1
28	1	1	1	26	1			30	1	1	1

28	1	1	1	26	1			30	1	1	1
28	1	1	1	28	1	1	1	30	1	1	1
28	1	1	1	28	1	1	1	30	1	1	1
28	1	1	1	28	1	1	1	30	1	1	1
28	1	1	1	28	1	1	1	30	1	1	1
28	1		1	28	1	1	1	30	1	1	1
28	1		1	28	1	1	1	30	1		1
28	1		1	28	1	1	1	30	1		1
28	1		1	28	1	1	1	30			1
28			1	28	1	1	1	30			1
28			1	28	1	1	1	30			1
30	1	1	1	28		1	1	32	1	1	1
30	1	1	1	28		1	1	32	1	1	1
30	1	1	1	28		1	1	32	1	1	1
30	1	1	1	28		1	1	32	1	1	1
30	1	1	1	28		1		32	1	1	1
30	1	1	1	28		1		32	1	1	1
30	1	1	1	28		1		32	1	1	1
30	1	1	1	28		1		32	1	1	1
30	1	1	1	28		1		32	1	1	1
30	1	1	1	30	1	1	1	32	1	1	1
30	1	1	1	30	1	1	1	32	1	1	1
30	1	1	1	30	1	1	1	32	1	1	1
30	1	1	1	30	1	1	1	32	1	1	1
30		1	1	30	1	1	1	32	1	1	1
30		1	1	30	1	1	1	32		1	
30		1	1	30	1	1	1	34	1	1	1
30		1		30	1	1	1	34	1	1	1
30		1		30	1	1	1	34	1	1	1
30		1		30		0	1	34	1	1	1
30		1		30			1	34	1	1	1
32	1	1	1	30			1	34	1	1	1
32	1	1	1	30			1	34	0	1	0
32		1	1	32	1	1	1	34	0	0	0
32		1	1	32	1	1		34	0	0	
32		1		32	1	1		34	0	0	
32		0		32	1	1		34	0	0	
34	0	0	0	32	1			34	0	0	
34	0	0	0	32	1			34	0		
34	0	0		32	1						
34	0	0		34	0	0	0				
34	0	0		34	0	0	0				
34	0			34	0	0	0				
34	0			34	0	0	0				
34	0			34	0	0	0				
34	0			34	0	0	0				

				34	0	0				
				34			0			
Versuch 4										
Zeit (h)	DMSO (0,1 %)	8-PN	6-PN							
28	1	1	1							
28	1	1	1							
28	1	1	1							
28	1	1								
28	1	1								
28	1	1								
28	1	1								
28	1	1								
28	1									
28	1									
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1	1	1							
30	1		1							
30	1		1							
30	1									
30	1									
30	1									
32	1	1	1							
32	1	1	1							
32	1	1	1							
32	1	1	1							
32	1	1	1							
32	1	1	1							
32	1	1	1							
32		1	1							
32		1	1							
32		1	1							

32			1
32			1
32			1
32			1
32			1
32			1
34	1	1	1
34	0	1	1
34		1	0
34		1	0
34		1	
34		0	

8.2.12 Lebensspannenanalyse

Tabelle 106: Rohdaten zu Anh. Abb. 73 - Pino (100 μ M), angegeben sind Tage, an denen ein Ereignis stattfand (1 = tot, 0 = zensiert). Stamm N2. Pino = Pinoresinol.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (d)	DMSO (0,1 %)	Pino	Zeit (d)	DMSO (0,1 %)	Pino	Zeit (d)	DMSO (0,1 %)	Pino
4		0	2		0	4	0	0
7	0	0	4	0	0	4		0
7	0		4	0	0	7	1	0
9	0	0	4		0	11	1	1
9	1	0	9		0	14	1	1
9		0	10		1	14	1	1
11	1	0	10		0	14	1	0
11	0	0	10		0	14	1	0
11		0	11	1		14	0	
11		0	14	1	0	15	1	1
11		0	14	1		15	1	1
11		0	14	0		15	1	1
14		0	15	1	1	15	1	1
15	1	1	15	1	1	15	1	1
15	1	1	15		1	15		0
15	1		15		1	16	1	1
15		1	16	1	1	16	0	
17	0	1	16	1	1	17	1	1
17	0		16	1		18	1	1
18	1	1	17	1		18	1	1
18	1	0	17	1		18	1	1
18	1	0	17	1		18	1	1
21	1	1	17	1		18	1	1
21	1	1	17	1		18	1	1
21	1	1	17	0		18		1
22	1		18	1	1	21	1	1

22	1		18		1	21		1
22	1		18		0	21		1
22	1		21	1	1	21		1
22	1		21	1	1	21		1
22	1		21	1	1	21		0
22	1		21	0	1	22	1	1
22	1		21		0	22	1	1
23	1	1	22	1	1	22	1	1
23	1	1	22	1	1	22	1	1
23	1	1	22	1	1	23	1	1
23		1	22	1	1	23	1	1
23		0	22	1	1	23	1	
23		0	22	1		24	1	1
23		0	22	0		24	1	1
24	1	1	23	1	1	24	1	1
24	1	1	23		1	24	1	
24	1		23		0	25	1	1
25	1	1	24	1		25	1	1
25	1	1	25	1	1	25	1	1
25	1	1	25	1	1	25	1	1
25	1		25	1	1	25	1	1
26	1	1	25	1	1	25	1	1
26	1		25	1	1	28	1	1
26	1		25	1		28	1	1
26	1		25	1		28	1	1
26	0		26		1	28	1	1
26	0		26		1			
28	1	1	26		1			
28	1	1	26		1			
28	1	1	26		0			
28	1		27		1			
29	1	1	28	1	1			
29	1	1	28	1				
30	1	1	28	1				
30		1	28	1				
34	1	1	28	1				
34		1	28	0				
35	1	1	28	0				
36	1		29		1			
			30		1			
			31	1	1			
			31	1	1			
			31	1				
			35	1				
			35	1				

Tabelle 107: Rohdaten zu Anh. Abb. 73 - Pino (100 µM), angegeben sind Tage, an denen ein Ereignis stattfand (1 = tot, 0 = zensiert), Stamm TK22. Pino = Pinoresinol.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Zeit (d)	DMSO (0,1 %)	Pino	Zeit (d)	DMSO (0,1 %)	Pino	Zeit (d)	DMSO (0,1 %)	Pino
2		0	3	0	1	2	0	0
2		0	3	0		3		0
2		1	4		0	4	1	0
2		1	4		1	4	0	0
3	0	1	5	1	1	7	1	0
3	0		5	0		7	0	0
4	1	1	5	0		7	0	1
6	0	0	6	1	1	7	0	1
6	0	0	6		0	7	0	1
6	1	0	6		0	7		1
6	1		7	0	1	8	1	1
7	0	0	7		0	8	1	
7	0	0	7		0	8	1	
7	1	1	8	1		8	1	
7	1	1	8	0		9	1	1
7	1		9		0	9	1	1
8	0	1	10	1	1	9		1
8	1	1	10	1	1	10		1
8	1	1	10		0	10		1
8	1	1	11	1	1	10		1
8	1		11	1	1	11	1	1
8	1		11	1		11	1	
9	1		12	1	1	12		1
9	1	1	12	1	1	12		1
9	1		13	1	1	12		1
10	1	1	13	1	1	12	1	1
10	1	1	13	1	0	14	1	1
10		1	13	1		14	1	1
11	1	1	13	1		14	1	1
11	1	1	13	1		14	1	1
11		1	13	1		14	1	1
11		0	13	1		14	1	1
13	1	1	14	1	1	14	1	1
13	1	1	14	1	1	14	1	1
13	1	1	14	1	1	14	1	1
13	1	1	14	1		14	1	1
13	1	1	14	1		14	1	1
13	1	1	14	1		14	1	1
13	1	1	14	1		14	1	1
13	1	1	15	1	1	14	1	1
14	1	1	15	1	1	14	1	0
14	1		15	1	1	14	1	

14	1		17	1	1	15	1	1
15	1	1	17	1	1	15	1	1
15	1	1	17	1	1	15	1	1
15	1		17	1	1	15	1	1
16	1	1	17	1	1	15	1	1
16		1	17	1		16	1	1
16		1	17	1		16	1	1
17	1	1	18	1	1	16	1	1
17	1	1	18	1		16	1	
17		1	19	1	1	16	1	
18	1	1	19	0		17	1	1
18	1	1	20		1	17	1	1
18	1	1	21	1		17	1	
18	1		24		1	18	1	1
18	0					18	1	
20	1	1						
20	1	1						
20	1							
21	1	1						
22	1							
23		1						

9 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.

Datum / Date

Unterschrift des Antragstellers / *Signature of the applicant*

10 Publikationsliste

Publikationen

Koch K, Havermann S, Büchter C, Wätjen W (2014) *Caenorhabditis elegans* as Model System in Pharmacology and Toxicology: Effects of Flavonoids on Redox-Sensitive Signalling Pathways and Ageing. The Scientific World Journal, Vol. 2014.

Koch K, Büchter C, Havermann S, Wätjen W (2015) The Lignan Pinoresinol Induces Nuclear Translocation of DAF-16 in *Caenorhabditis elegans* but has No Effect on Life Span. Phytotherapie Research, 2015 Jun, 29 (6).

Weitere Beiträge als Mitautor:

Büchter C, Havermann S, Koch K, Wätjen W (2015) Isoxanthohumol, a constituent of hop (*Humulus lupulus L.*), increases stress resistance in *Caenorhabditis elegans* dependent on the transcription factor DAF-16. European Journal of Nutrition, Epub 2015 Feb 3.

Büchter C, Ackermann D, Honnen S, Arnold N, Havermann S, Koch K, Wätjen W (2015) Methylated derivatives of myricetin enhance life span in *Caenorhabditis elegans* dependent on the transcription factor DAF-16. Food & Function, 6.

Fischer N, Büchter C, Koch K, Albert S, Csuk R, Wätjen W (2017) The resveratrol derivatives trans-3,5-dimethoxy-4-fluoro-4'-hydroxystilbene and trans-2,4',5-trihydroxystilbene decrease oxidative stress and prolong lifespan in *Caenorhabditis elegans*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 69(1).

Vorträge

„Modulation of redox-sensitive signaling pathways by secondary plant compounds in the model organism *Caenorhabditis elegans*“ auf der „stress and aging: chances and rs“- Tagung der Deutschen Gesellschaft für Gerontologie und Geriatrie e.V. (DGGG), Deutschen Gesellschaft für Geriatrie (DGG), Schweizer Gesellschaft für Gerontologie (SGG-SSG), Schweizer Gesellschaft für Geriatrie und Österreichischen Gesellschaft für Geriatrie und Gerontologie (ÖGGG), 2014, Halle (Saale).

Posterpräsentationen

„Molecular effects of Lignans in *C. elegans*“ auf dem 80. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, 2014, Hannover und auf dem 51. Wissenschaftlichen Kongress der DGE e.V., 2014, Paderborn.

„The sesquiterpene lactone cnicin from *Cnicus benedictus* mediates toxic effects on reproduction, development, lifespan and stress resistance“ auf dem 52. Wissenschaftlichen Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) e.V., 2015, Halle (Saale).

“*Hibiscus sabdariffa* extract prolongs life span in *Caenorhabditis elegans* dependent on DAF-16 and SKN-1” auf dem 54. Wissenschaftlichen Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) e.V., 2017, Kiel.

Datum / Date

Unterschrift des Antragstellers / Signature of the applicant

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Karoline Koch
 Geburtsdatum: 02.10.1987
 Geburtsort: Leipzig
 Geschlecht: weiblich
 Wohnsitz/
 Korrespondenzanschrift: Tschaikowskistr. 27
 04105 Leipzig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

08/1998 bis 09/2004 Gymnasium Schkeuditz
 10/2004 bis 06/2005 Watertown High School, SD, USA
 08/2005 bis 07/2007 Gymnasium Schkeuditz

Studium

10/2007 bis 09/2010 Studium: Ernährungswissenschaften (Bachelor of Science)
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 10/2010 bis 11/2012 Studium Ernährungswissenschaften (Master of Science)
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Promotionsstudium

02/2013 Beginn der Dissertation am Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Wim Wätjen

Datum / Date

Unterschrift des Antragstellers / *Signature of the applicant*