

Aus der V. Medizinischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. Bernhard Krämer)

Transiente Glukose-Exposition des Nematoden *Caenorhabditis elegans*:
Ein Modell für das metabolische Gedächtnis im Diabetes mellitus

zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Katharina Murillo

aus
Hamburg
2021

Dekan: Prof. Dr. med. Sergej Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Hans-Peter Hammes

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	2
1.1 Diabetes mellitus und mikrovaskuläre Komplikationen.....	2
1.2 Das metabolische Gedächtnis.....	2
1.3 Der Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	8
1.4 Osmotischer Stress	11
1.5 Mechanismen der Insulinresistenz	12
1.6 Ziele der Arbeit	13
2 MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1 Studiendesign.....	14
2.2 <i>C. elegans</i> und <i>E. coli</i> Stämme	15
2.3 Agarmedien und Zusätze	16
2.4 Allgemeine Puffer und Chemikalien.....	16
2.5 Kultivierung von <i>C. elegans</i>	17
2.6 Optimierung der <i>C. elegans</i> Kulturbedingungen für Massenkultur	17
2.7 Biochemische Parameter in <i>C. elegans</i>	20
2.8 Funktionelle Parameter in <i>C. elegans</i>	26
2.9 Körpergröße und Länge	26
2.10 Genetische Analysen	26
2.11 Statistik.....	28
3 ERGEBNISSE	29
3.1 Optimierung der <i>C. elegans</i> Massenkultur auf Plattenmedien.....	29
3.2 Auswirkungen transienter und persistenter GE in <i>C. elegans</i>	32
3.2.1 Transiente Glukose-Exposition hat keinen Einfluss auf die Bildung von AGEs, die durch persistente Glukose-Exposition erhöht werden	32

3.2.2	Transiente und persistente Glukose-Exposition erhöhen ROS.....	34
3.2.3	Transiente und persistente Glukose-Expositionen beeinflussen die Motilität in Abhängigkeit von der Expositionszeit.....	36
3.2.4	Transiente und persistente Glukose-Exposition reduziert die Wachstumsrate.....	39
3.2.5	Transiente Glukose-Exposition verlängert die Lebensspanne.....	41
3.2.6	Transiente und persistente Glukose-Exposition induzieren vergleichbare Signalwege	43
3.2.7	Transiente und persistente Glukose-Exposition beeinflusst Gene der Glukoneogenese und Glykolyse	44
4	DISKUSSION	52
4.1	AGE-Bildung durch persistente, aber nicht durch transiente Glukose-Exposition.....	52
4.2	Transiente und persistente Glukose-Exposition induziert antioxidative Mechanismen.....	53
4.3	Motilität und Wachstumsrate werden durch kurzfristige Glukose-Exposition reduziert wohingegen langfristige GE protektiv auf die Motilität wirkt.....	54
4.4	Die „Gene Set Enrichment Analyse“ identifiziert anhaltende Veränderung verschiedener Signalwege durch transiente GE.....	55
4.5	Einordnung Transkriptomdaten und alternative Mechanismen.....	58
4.6	Mitohormese – Lebensverlängerung durch transiente Glukose-Exposition .	58
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	65
6	SUMMARY	67
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	69
8	ANHANG	77
9	LEBENS LAUF	80
10	DANKSAGUNG.....	81

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AGEs	„Advanced Glycation Endproducts“
adj.	adjustiert
ANOVA	„Analysis of Variance“
BSA	Bovines Serumalbumin
CEL	Nε-(1-carboxyethyl)-L-lysin
CGC	Caenorhabditis Genetics Center
c _{iz} (Gik)	intrazelluläre Glukosekonzentration
CML	Nε-(carboxymethyl)-lysin
daf-2	Dauer aktivierender Faktor-2 (Homolog des Insulin-/IGF-Rezeptors)
daf-16	Dauer aktivierender Faktor-16 (Homolog von FoxO)
DB	Diaminobenzen
DCCT	„Diabetes Complications and Control Trial“
DHE	Dihydroethidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
FL	Fructosyllysin
FoxO	„Forkhead-Box-Protein O“
FuDR	5-Fluoro-2'-deoxyuridin
GE	Glukose-Exposition
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
G-H1	Glyoxal-Hydroimidazon
Gik	Glukose
GLO-1	Glyoxalase-1
gst-4	Glutathion-S-Transferase
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish-Peroxidase/ Meerrettich-Peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
LB	„Lysogeny Broth“
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
ME	Mannitol-Exposition
MG	Methylglyoxal
MG-H1	Methylglyoxal-Hydroimidazon
Mntl	Mannitol
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
NGM	„Nematode Growth Medium“
NOX	NADPH-Oxidase
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
nom.	nominal
PI3K/ AKT	Phosphoinositid-3-Kinase/ Proteinkinase-B
RAGE	Rezeptor für AGE
RLUs	„Relative Light Units“
ROS	reaktiver oxidativer Stress
RT	Raumtemperatur
SD	Standard deviation/ Standardabweichung

1 EINLEITUNG

1.1 Diabetes mellitus und mikrovaskuläre Komplikationen

Diabetes mellitus gehört weltweit zu den am stärksten zunehmenden nicht übertragbaren Krankheiten mit aktuell über 420 Millionen Betroffenen und fast einer Verdoppelung der Prävalenz seit 1980 (Männer von 4,3% auf 9,0%, Frauen von 5,0% auf 7,9%)¹. Obwohl die häufigsten Typen des Diabetes mellitus, Typ 1 und Typ 2, sich substantiell in ihrer Pathogenese unterscheiden, führen beide Erkrankungen im Verlauf zur Entstehung multipler diabetischer Komplikationen. Neben makrovaskulären Komplikationen, die eine starke Erhöhung der kardiovaskulären Mortalität zur Folge haben, beeinflussen mikrovaskuläre Komplikationen wie diabetische Nephropathie, Neuropathie, sowie Retinopathie die Lebensqualität sowie die Mortalität aufgrund chronischen Nierenversagens, Amputationen oder Erblindung².

Aktuelle Therapiemöglichkeiten des Diabetes adressieren vor allem die Senkung des Blutzuckerspiegels, welcher wiedergespiegelt im Langzeitblutzucker HbA_{1c} nur einen kleinen Teil der Entstehung mikrovaskulärer Komplikationen erklären kann. In einer großen klinischen Studie an Typ-1 Diabetikern, dem „Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)“ und seiner Follow-Up Studie über die „Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC)“, konnten am Beispiel der diabetischen Retinopathie nur 11% der Progression anhand der Hyperglykämie erklärt werden³. Zu strenge Einstellung der erhöhten Blutzuckerwerte hat zudem einen mortalitätssteigernden Effekt⁴. Durch große klinisch-pharmazeutische Studien an Typ-2 Diabetikern wurde das Potential von Antidiabetika entdeckt, die die kardiovaskuläre Mortalität senken sowie die Progression mikrovaskulärer Komplikationen verlangsamen können trotz häufig geringer Senkung des HbA_{1c}^{5, 6}. In der „EMPA-REG OUTCOME“ Studie konnte neben einer Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse auch eine Verlangsamung der Inzidenz und Progression diabetischer Nephropathie durch Empagliflozin, einem Hemmer des tubulären Natriumchlorid-Glukose-Transporters-2 (SGLT-2), im Vergleich zur Standardtherapie erreicht werden⁶. Die Mechanismen dieser protektiven Wirkungen sind nicht gänzlich bekannt⁷.

Zur weiteren Entwicklung erfolgreicher Therapien ist eine genauere Erforschung und Differenzierung der irreversiblen glukose-abhängigen und –unabhängigen Mechanismen von Langzeitkomplikationen notwendig, sowie eine Charakterisierung besserer Krankheitsmodelle für die Austestung potenzieller Therapien.

1.2 Das metabolische Gedächtnis

In großen klinischen Studien wie dem „Diabetes Complications and Control Trial (DCCT)“ und der anschließenden Beobachtungsstudie „Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC)“ an Typ-1 Diabetikern sowie der „United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)“ an Typ-2 Diabetikern konnte bei der initial glykämisch schlechter eingestellten Gruppe trotz nachfolgender guter glykämischer Einstellung anhaltend eine höhere Inzidenz diabetischer Komplikationen festgestellt werden im Vergleich zu der Gruppe, die direkt eine gute glykämische Einstellung erhielt. Dieses Phänomen wird als „metabolisches Gedächtnis“ oder „Legacy Effect“ bezeichnet und ist rückführbar auf persistierende Schäden, die durch Normalisierung der Blutglukosespiegel nicht mehr reversibel sind^{3, 8}.

Vor den klinischen Studien konnte bereits in Hunden gezeigt werden, dass eine 2,5-jährige Phase schlechter glykämischer Kontrolle gefolgt von einer 2,5-jährigen Phase

guter Kontrolle weiterhin zu einer verstärkten Progression diabetischer Retinopathie beiträgt⁹. Aktuelle Auswertungen der DCCT/EDIC zeigen nach 15-18 Jahren eine sich nicht mehr unterscheidende jährliche Zunahme der Inzidenz der Retinopathie zwischen den beiden Behandlungsgruppen im Vergleich zu früheren Zeiträumen¹⁰. Reversible epigenetische Veränderungen, dessen Rolle im „metabolischen Gedächtnis“ aktuell untersucht werden, stellen potentielle Mechanismen für diesen Effekt dar. Anstatt „metabolischem Gedächtnis“ wird mittlerweile auch die Entstehung diabetischer Komplikationen durch einen kumulativen Schaden gemessen an Monaten über einem bestimmten HbA_{1c}-Wert, sogenannte „A1c-Monate“, diskutiert¹¹.

Unabhängig der Bezeichnung sind die Mechanismen dieser jahrzehntelangen Episode höherer Inzidenz diabetischer mikrovaskulärer Komplikationen in der initial schlecht glykämisch eingestellten Gruppe nicht geklärt. Das Konzept des metabolischen Gedächtnisses stellt somit den glukozentrischen Blick auf die Pathogenese des Diabetes und seiner Komplikationen in Frage und führte zur intensiven Erforschung weiterer Stoffwechselalterationen.

Pathobiochemisch gehört die irreversible Bildung von „Advanced Glycation Endproducts (AGEs)“ zu den Modifikationen, die auf zellulärer Ebene das metabolische Gedächtnis ausbilden. Im Gegensatz zu anderen metabolischen Veränderungen wie die Hexosamin- und Diacylglycerin-Phosphokinase C Stoffwechselwege verursachen AGEs nach initialer transientser Hyperglykämie anhaltende Veränderungen trotz Euglykämie. In den letzten Jahren wurden weitere Mechanismen untersucht wie die persistente Bildung von ROS und epigenetische Modifikationen der DNA und Histone sowie Regulation der Translation durch nicht-kodierende Mikro-RNAs¹². In der Pathogenese der Retinopathie führt die Überaktivierung und folgende Überexpression eines AGE-Rezeptors (RAGE) über NOX zu erhöhter Bildung von ROS. Im Verlauf führt ROS zu mitochondrialen DNA-Schäden, welche eine Dysfunktion der Mitochondrien begünstigen und einen hyperglykämie-unabhängigen Zyklus aufrechterhalten^{13, 14}. Epigenetische Modifikationen begünstigen die Pathogenese diabetischer Komplikationen durch Aktivierung oder Inhibierung der Proteinexpression erkrankungsrelevanter Gene. Besonders in der Promoterregion von Proteinen, die Einfluss auf den Redox-Status nehmen, sind diese Modifikationen zu finden^{15, 16}.

Als früher Mechanismus des metabolischen Gedächtnisses wurde ein Feedback-Loop in makrovaskulären Zelltypen präsentiert. Hierbei führt eine transiente Hyperglykämie zur persistierenden Bildung von ROS über die Dauer der Glukose-Exposition hinaus. Mitochondriale Freisetzung von Eisenionen induziert die Bildung Wasserstoffperoxid, das eine Enzymkaskade induziert, die zur Dissoziation von Hexokinase von der äußeren mitochondrialen Membran führt und durch Erhöhung des mitochondrialen Potentials diesen Feedback-Loop aufrecht erhält. Die Entdeckung dieses und weiterer Mechanismen unterstreicht die Notwendigkeit der Erforschung besonders früher Mechanismen in der Pathogenese diabetischer Komplikationen¹⁷.

1.2.1 Pathobiochemische Veränderungen diabetischer Langzeitkomplikationen

Sowohl Diabetes mellitus Typ 1 als auch Typ 2 führen zu einer anhaltenden Hyperglykämie, die auch unter Therapie zu histologischen und zellulären Veränderungen von Gefäßen und Organen führt und so die Progression diabetischer mikrovaskulärer Komplikationen begünstigt². In der „Unifying Hypothesis“ werden mehrere Mechanismen in Endothelzellen zusammengefasst, die zur Entstehung diabetischer Komplikationen führen¹⁸. Diese beinhalten sowohl anhaltende Mechanismen wie nicht-enzymatische Glykosylierungen von Proteinen, DNA und Lipiden, den sogenannten „Advanced Glycation Endproducts (AGEs)“, sowie reversible funktionelle metabolische Veränderungen, die glykolytische Intermediärprodukte alternativen Stoffwechselwegen wie der Polyol- und Hexosaminsynthese zuführen sowie zur Aktivierung der Proteinkinase C beitragen¹⁸.

Erhöhte Glukose-Exposition induziert die mitochondriale Bildung von reaktivem oxidativem Stress (ROS), welcher im Verlauf zu einer mitochondrialen Dysfunktion führt. Die vermehrte anhaltende Freisetzung von ROS nach beenden der Glukose-Exposition konnte in Endothelzellen einen sich selbst verstärkendem Mechanismus zeigen, der zur Progression diabetischer Komplikationen führt und durch seine Persistenz dem metabolischen Gedächtnis zugeordnet werden kann^{2, 19}. Dauerhafte Hyperglykämie führt im Diabetes auch zur Bildung anhaltender epigenetischer Veränderungen wie DNA-, Histonmethylierung und -acetylierung, die nach Einstellung der Hyperglykämie persistieren. Außer primär glykämisch induzierten Mechanismen rücken weitere Schäden durch Steigerung und Perturbation der Lipolyse sowie inflammatorische Mechanismen vermehrt in den Fokus².

1.2.2 „Advanced Glycation Endproducts“ und das Substrat Methylglyoxal

„Advanced Glycation Endproducts (AGEs)“ sind eine heterogene Gruppe glykolytischer Intermediärprodukte. Sie können einerseits gebunden an zelluläre Bestandteile, aber auch frei im Plasma oder an extrazellulärer Matrix gebunden vorkommen²⁰. Ein bekannter Vertreter der frühen Glykierung von Proteinen ist das HbA_{1c}, das als Biomarker zur Verlaufskontrolle der Blutglukosespiegel der letzten Wochen routinemäßig im klinischen Alltag verwendet wird²¹. Aufgrund der längeren Halbwertszeit (Überlebenszeit) und irreversiblen Akkumulation einiger extrazellulärer AGEs wurde die Eignung dieser als Prädiktoren und Biomarker für die Entwicklung diabetischer Komplikationen untersucht. Im DCCT/ EDIC konnten in Hautbiopsien von Typ-1 Diabetikern die AGEs Nε-(carboxymethyl)-lysin (CML) und Furosin (das stabilere Produkt von Fructosyllysin) identifiziert werden, die das Risiko der Progression diabetischer Retinopathie unabhängig von der Entwicklung des HbA_{1c} voraussetzen konnten²².

Proteingebundene AGEs führen extrazellulär zu veränderten Interaktionen zwischen Matrix und Zellen sowie Zellen und AGE-Rezeptoren und beeinflussen intrazellulär die Funktion von Proteinen mit längerer Verweildauer. Durch Interaktion mit verschiedenen AGE-Rezeptoren wie RAGE kommt es außerdem zu einer vermehrten Bildung von mitochondrialen und NADPH-Oxidase generiertem ROS, sowie Induktion inflammatorischer Signalwege bis hin zu fibrotischen Umbauprozessen².

Glukose reagiert in der „Maillard Reaktion“ über Bildung einer Schiffsbasis mit einem primären Amin zu einem Amadori-Produkt wie Fruktosamin²³. Die Hauptsubstrate der weiteren AGE-Bildung sind reaktive Dikarbonyle wie Methylglyoxal (MG), die im Rahmen der Glykolyse und Lipolyse unter diabetischen Stoffwechselbedingungen vermehrt anfallen²⁰. Nach mehreren Fragmentations- und Umstrukturierungsprozessen der Amadori-Produkte und weiteren Vorstufen kommt es unter Reaktion mit Dikarbonylen zu den als AGE bezeichneten Modifikationen²⁴.

In dieser Arbeit wird die Regulation eines AGE Panels untersucht, wozu auch Fructosyllysin (FL), Methylglyoxal-Hydroimidazolone (MG-H1) und Argpyrimidin (AP) gehören. FL ist das Produkt einer Amadori-Umformung von Lysin mit der Aldehydgruppe von Glukose und wird aufgrund seiner Reversibilität als kurzlebige AGEs eingeordnet. FL (im Säurehydrolysat als Furosin gemessen) konnte in Hautproben diabetischer Patienten aus der DCCT-Studie mit veränderter Kollagenlöslichkeit gefunden werden und ist assoziiert mit dem Auftreten diabetischer Komplikationen wie Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie²⁵. In diabetischen Ratten konnte eine erhöhte Konzentration von FL in der Retina, Glomeruli, Nervengewebe und Plasma gemessen werden²⁶. MG-H1, sowie AP werden durch Bindung des hochreaktiven MGs an verschiedene Aminogruppen des Arginins gebildet und sind mit der glukose-abhängigen sowie –unabhängigen Progression mikrovaskulärer Komplikationen assoziiert^{27, 28, 29}. AGEs als persistierende Modifikationen kommt in der Pathogenese des metabolischen Gedächtnisses aufgrund der Beeinflussung verschiedener Signalwege u.a. im Redox-Haushalt, Inflammation und Fibrose eine besondere Rolle zu (Abb. 2).

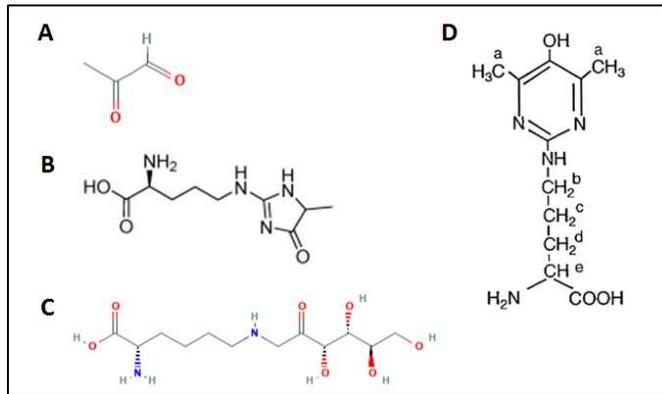


Abb. 1: Strukturformeln von (A) Methylglyoxal³⁰, (B) Methylglyoxal-Hydroimidazolone²⁰, (C) Fructosyl-lysine³¹ und (D) Argpyrimidine²⁹. Publikation mit Genehmigung des Verlags.

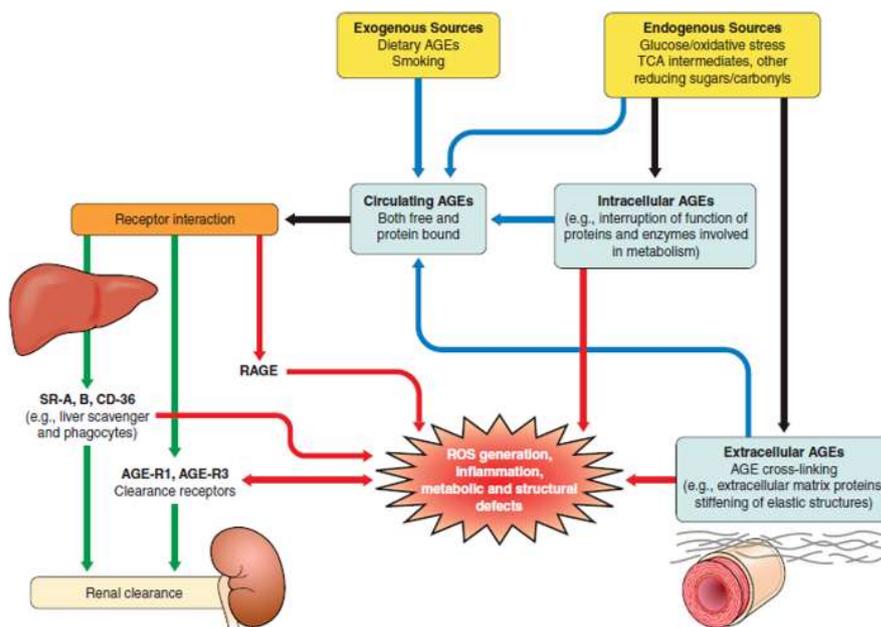


Abb. 2: Illustration der Herkunft der AGEs und rezeptorabhängige (RAGE/ AGE-R1/3) und unabhängige Beeinflussung des Organismus und einzelner Organe. Die farbliche Kennzeichnung der Pfeile dient der Übersichtlichkeit. Publikation mit Genehmigung des Verlags².

1.2.3 Oxidativer Stress

Reaktiver oxidativer Stress (ROS) kann bei Überschreiten der zellulären antioxidativen Kapazitäten zu Struktur- und Funktionsveränderung von Proteinen und Lipiden führen, was 1956 von Harman als „Free Radical Theory“ beschrieben wurde^{32, 33}. Lange wurden diese Mechanismen als schädlich für den Körper betrachtet und intensiv an antioxidativen Therapien zur Reduktion des oxidativen Stresses geforscht³⁴. Unter diabetischen Stoffwechselbedingungen werden ROS vor allem mitochondrial durch eine erhöhte Leckage von Elektronen an Komplex I und III der Atmungskette in Form von Superoxidanionen (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet. Dies führt über Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$), Schädigung der mitochondrialen DNA und Proteinen zu einer mitochondrialen Dysfunktion durch die Kohlenhydrate und Lipide nicht mehr effizient zu ATP konvertiert werden können³⁵. Zytoplasmatischer ROS wird neben vielen anderen Mechanismen auch über die Aktivierung von RAGE und nachfolgend NAD(P)H-Oxidase (NOX) durch AGEs erzeugt³⁶.

Neuere Studien zeigen, dass vor allem endogener ROS eine protektive Funktion in der Signalübertragung zur Induktion körpereigener Detoxifikationsmechanismen spielt^{37, 38}.

Ein protektiver Mechanismus, mit dem Organismen sich gegen ungünstige Wirkungen von ROS schützen, wird als Mitohormese bezeichnet. Mitohormese beschreibt weiter die Induktion protektiver antioxidativer Enzyme durch niedrige Mengen an ROS oder kurze Expositionszeiten hoher ROS-Mengen um die antioxidative Kapazität des Organismus zu erhöhen³⁷. So kann der Körper durch Mechanismen ähnlich einer Impfung den erhöht anfallenden ROS ausreichend detoxifizieren. Im Modellorganismus *C. elegans* konnte durch Induktion von ROS durch transiente GE (50-200mM) im prä-adulten Stadium eine Lebensverlängerung erreicht werden. Diese konnte durch das Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) verhindert werden konnte, was die direkte Verlängerung der Lebensspanne durch ROS beweist. Bei persistenter hoher GE der gleichen Konzentration dekompensiert dieses System jedoch und es kommt zu einer Verkürzung der Lebensspanne, was auf einen frühen Mechanismus in der Pathogenese chronischer Erkrankungen wie Diabetes hinweist³⁹.

Diese unterschiedlichen Mechanismen veranschaulichen die pleiotropen konzentrationsabhängigen Auswirkungen von ROS im physiologischen und pathologischen Stoffwechsel, dessen Rolle im metabolischen Gedächtnis noch nicht abschließend erforscht wurde.

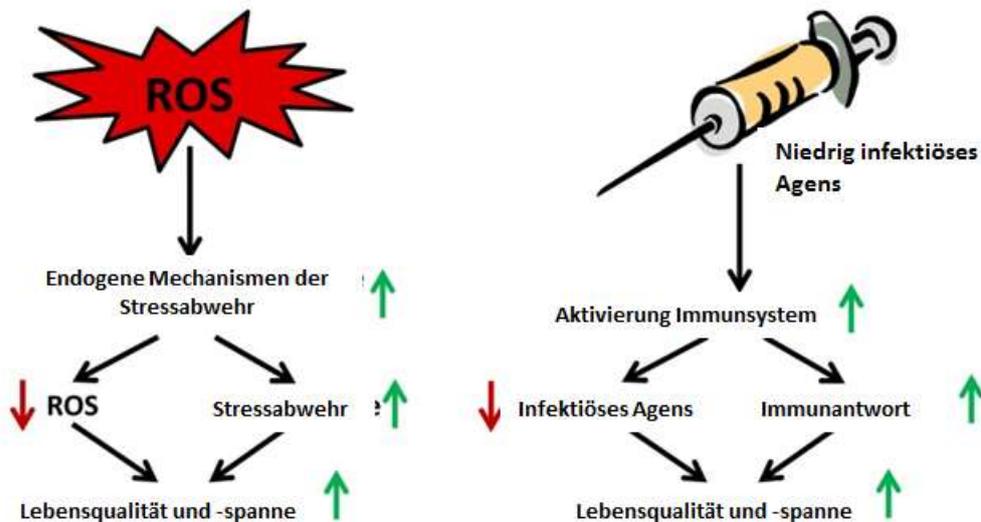


Abb. 3: Illustration der protektiven Signalwirkung von ROS zur Induktion endogener Stressmechanismen um die Lebensspanne und -qualität zu erhöhen. Diese sind vergleichbar mit einem Impfschutz. Publikation der modifizierten Abb. mit Genehmigung des Verlags³⁷.

1.2.4 Experimentelle Modelle des metabolischen Gedächtnisses

Diabetes mellitus ist eine komplexe systemische Erkrankung des Stoffwechsels, die multiple Organe betrifft und verschiedene metabolische Veränderungen hervorruft. Zur Erforschung der Mechanismen und Entwicklung erfolgreicher Therapien bedarf es der Etablierung von adäquaten tierischen und zellulären Modellen, die die Komplexität dieser Mechanismen widerspiegeln. Eine besondere Herausforderung stellt hier die Modellierung des metabolischen Gedächtnisses dar aufgrund der aufwendigen Einstellung normaler Blutglukosewerte nach Induktion des Diabetes sowie der Entwicklung diabetischer Komplikationen im Verlauf.

1987 konnten Engerman et al. bereits eine anhaltend erhöhte Inzidenz diabetischer Retinopathie durch eine initiale Episode schlechter glykämischer Einstellung in Hunden mit Alloxan-induziertem Typ-1 Diabetes mellitus nachweisen⁹. Streptozotocin (STZ)-behandlung zerstört beta-Zellen des Pankreas, erzeugt also einen insulinopenen Diabetes (Typ 1 Diabetes ohne Autoimmunkomponente) und eignet sich zur Modellierung früher Vorgänge diabetischer Retinopathie in Ratten und Mäusen^{40, 41}. Zur Normalisierung der Blutglukosespiegel reichen in diesem Modell subkutane Insulininjektionen im Gegensatz zu Menschen mit Diabetes nicht aus, sodass eine aufwändige Inselzelltransplantation aus porcinen Betazellen notwendig ist⁴¹. Zebrafische entwickeln unter STZ-induziertem Diabetes Retinopathie und Nephropathie. Sie besitzen plastische Beta-Zellen, die sich nach Zerstörung mit STZ wieder regenerieren können und stellen somit ebenfalls ein geeignetes Modell zur Untersuchung des metabolischen Gedächtnisses dar⁴².

Um Mechanismen der in-vivo gewonnenen Erkenntnisse zu untersuchen, ist es oft hilfreich die Signalwege in in-vitro Modellen aus einzelnen Zelllinien weiter zu differenzieren. Hier kann die Regulation einzelner Komponenten der Signalwege besser beeinflusst und untersucht werden, bevor weitere in-vivo Versuche erfolgen. Die Übertragbarkeit wird allerdings durch artifizielle Versuchsbedingungen reduziert, da einzelne Zelltypen aus ihrem Zellverband entfernt werden und aufgrund der geringen Verfügbarkeit primärer diabetischer Zelllinien häufig glukose-naive Zellen verwendet werden, dessen Stoffwechsel und Responsivität sich von diabetischen Zellen grundsätzlich unterscheidet⁴³. Auch der Einsatz einer osmotischen Kontrolle zur Differenzierung osmotischer und glukose-spezifischer Effekte sollte in Experimenten mit hohen Glukose-Expositionen bedacht werden.

Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* stellt eine sinnvolle Brücke zwischen Zell- und Tierversuchen dar, um in-vitro Erkenntnisse tier- und zeitsparend in-vivo zu untersuchen oder die Mechanismen von Beobachtungen aus klinischen Studien weitergehend zu differenzieren⁴⁴.

1.3 Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans ist ein 1-2 mm langer transparenter Nematode, der seit Einführung von Sydney Brenner in den 1960er Jahren in der biomedizinischen Forschung intensiv vor allem zur Modellierung und Erforschung chronischer Erkrankungen und des Alterungsprozesses eingesetzt wurde. Taxonomisch steht *C. elegans* weit vor den Säugetieren wie der Labormaus *Mus musculus* und besteht zu einem großen Teil aus neuronalen Zellen und Zellen des digestiven Trakts⁴⁵. Die Nematoden haben einen kurzen Lebenszyklus von ca. 21 Tagen, was sie für longitudinale Studien interessant macht, und können in einem sporenhähnlichen Zustand auch

„Dauer“ genannt viele Monate ohne Nährstoffe überleben. Kultiviert werden die Nematoden auf angereichertem Agarmedium, sog. „Nematode Growth Medium“ und werden mit dem *E. coli* Stamm OP50 als primäre Nährstoffquelle versorgt.

In genetischen Analysen konnten bis zu 40% homologe und viele orthologe Gene zum humanen Genom charakterisiert werden, was den Nematoden zu einem geeigneten Modell für mechanistische Studien macht⁴⁶.

Seit seiner Einführung in die biomedizinische Forschung konnte *C. elegans* bereits in verschiedenen Bereichen wie Toxizitätsstudien eingesetzt werden um so die Anzahl an Säugetieren in späteren Studien zu verringern⁴⁷. Aufgrund der einfachen und kostengünstigen Haltung, des kurzen Lebenszyklus und der bereits intensiven Charakterisierung von Genom und Metabolismus stellt *C. elegans* ein sinnvolles Bindeglied zwischen Zell- und Tierversuchen dar. Anwendungen bestehen hier in der Entwicklung und Charakterisierung von Krankheitsmodellen und daran anknüpfend die Untersuchung potenzieller Therapien, deren Mechanismen durch die einfache Generation von Knockouts gezielter erforscht werden können.

1.3.1 Metabolisches Gedächtnis in *C. elegans*

In der Pathogenese des Diabetes mellitus entsteht durch autoimmune Zerstörung der Betazellen im Pankreas (Typ 1) oder Insulinresistenz peripherer Gewebe (Typ 2) eine anhaltende Hyperglykämie, die in *C. elegans* durch Exposition hoher Glukosekonzentrationen (GE) modelliert werden kann⁴⁸.

Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus stellen konservierte Vorgänge in *C. elegans* dar. Glukosetransporter, Glukoseabbau durch Glykolyse, Zitratzyklus und oxidative Phosphorylierung, sowie die intrazelluläre Speicherung als Glykogen sind weitergehend erforscht⁴⁹.

Abhängig von Dauer und Höhe der transienten und persistenten GE sowie weiterer Versuchsbedingungen konnten hierbei teilweise gegensätzliche Regulationen gefunden werden. Transiente GE (50-200mM) während der prä-adulten Phase konnte im Gegensatz zu persistenter GE einen lebensverlängernden Effekt bewirken durch die Induktion der „mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt})“, einem protektivem, detoxifizierendem Mechanismus. Diese Lebensverlängerung konnte durch das Antioxidans N-Acetylcystein aufgehoben werden, was für eine Involvierung von ROS in Mechanismen des metabolischen Gedächtnisses spricht³⁹.

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu früherer Forschung an Modellen, die unter Exposition derselben Glukosekonzentration (100mM), keinen Einfluss präadultler GE auf die Lebensspanne zeigen konnte⁵⁰. In dieser Studie wurden die GE nicht bis zum Larvenstadium L4 wie in der vorher beschriebenen Studie, sondern einen Tag länger durchgeführt und zur Sterilität der Nematoden in allen Gruppen 5-Fluoro-2'-deoxyuridin (FudR) in den Agar hinzugefügt.

Persistente GE in einer Konzentration von 50mM (ca. 1%) über den gesamten Versuch konnte eine Verkürzung der Lebensspanne und eine Erhöhung von mitochondrialem ROS und MG-H1 nach 12 Tagen verursachen⁴⁸.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expositionsbedingungen und der Zeitraum in der Modellierung des Diabetes mellitus in *C. elegans* eine entscheidende Rolle spielen und bei der Konzeption des Projektes sowie der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden sollte. Bisher wurde versucht die Plasmaglukosespiegel diabetischer Patienten in *C. elegans* zu modellieren. Zu der Auswirkung sehr hoher, glukose-spezifischer transienter und persistenter GE auf die Lebensspanne, oxidativem Stress und weiteren Parametern ist noch wenig bekannt.

In ersten Versuchen zum metabolischen Gedächtnis wurde die GE bereits in der präadulten Entwicklung der Nematoden durchgeführt, was eher einen juvenilen Diabetes modelliert. Erkenntnisse zur transienten GE in adulten *C. elegans* liegen bisher nicht vor.

1.3.2 Modellspezifische Parameter und „Aging“

Seitdem Cynthia Kenyon 1993 einen transgenen *C. elegans* Stamm charakterisierte, der 50% länger lebt als der Wildtyp, hat sich der Modellorganismus *C. elegans* in der Alterungsforschung etabliert⁵¹. Viele Charakteristika des Alterungsprozesses wie die Bildung von ROS und AGEs, Neurodegeneration resultierend in einer Abnahme der Lebensspanne⁵² spielen auch eine Rolle in der Pathogenese chronischer Erkrankungen wie Diabetes mellitus⁵³. Die Entstehung dieser Erkrankungen korreliert mit dem Alter der Patienten, weshalb es hier sinnvoll ist krankheitsspezifische Veränderungen des metabolischen Gedächtnisses bzw. transients und persistenter GE von denen des physiologischen Alterns abzugrenzen.

Neben der Lebensspanne, die bei dem kurzlebigen Nematoden einfach untersucht werden kann, stellt die Motilität einen Funktionsparameter dar, der einerseits zur Einschätzung der allgemeinen Vitalität in Anlehnung an die „Health Span“/„Activities of daily living (ADL)“⁵⁴ andererseits spezifischer als Repräsentant der neuronalen Funktion dienen kann.

Die Veränderung der Motilität oder neuronalen Funktion von *C. elegans* ist darüber hinaus für die Modellierung diabetischer Komplikationen wie der Neuropathie und Retinopathie interessant, weil AGEs und ROS hier zu neuronalen Schäden beitragen⁴⁸. Die mikrovaskuläre Genese dieser Komplikationen führt im Verlauf auch zur Schädigung neuronaler Zellen u. A. durch Hypoxie. Beide Komplikationen zeigen daneben auch Merkmale einer von mikrovaskulären Schäden abgrenzbaren neuronalen Komponente^{2, 55}. *C. elegans* besteht zu einem Drittel aus neuronalen Zellen und besitzt keine Gefäße, wodurch sich hier nicht-vaskuläre Mechanismen untersuchen lassen.

1.3.3 Massenkultur

Die am häufigsten angewendeten Kulturverfahren sind die Kultur auf festen Agarplattenmedien und die Flüssigkultur. Die Agarkultur eignet sich besser zur Analyse einzelner Würmer, der zeitaufwändige manuelle Transfer einzelner Würmer mittels Platindraht führt allerdings zu einer begrenzten Größe der Versuchspopulation. In der Flüssigkultur können größere Mengen an *C. elegans* kultiviert werden. Hier wird die direkte Vergleichbarkeit der beiden Kulturverfahren durch eine verringerte Eiablage und Ausbildung eines längeren, sowie dünneren Phänotyp der Nematoden jedoch eingeschränkt und die Untersuchung einzelner Nematoden gestaltet sich schwieriger⁵⁶.

Der vermehrte Einsatz von *C. elegans* in der biomedizinischen Forschung hat zur Entwicklung verschiedener „Hochdurchsatz“ Methoden geführt, die zur Beschleunigung und Standardisierung der Erforschung neuer Therapien beitragen⁵⁷. Aufgrund der beschriebenen Vorteile ist *C. elegans* ein beliebter Modellorganismus auch in kleineren Forschungslaboren mit limitierten Mitteln. „Hochdurchsatz“ Methoden bedeuten häufig eine Investition in teure Geräte und Verbrauchsmaterial. Daraus ergibt sich ein Bedarf an einfach etablierbaren, kostengünstigen Protokollen zur Massenkul-

tur um ausreichend Material für Messungen, die mehrere Milligramm an Material benötigen wie Protein- und mRNA-Bestimmungen zu erhalten. Auch zur Erhöhung der Anzahl der Parameter, die in einer Versuchspopulation parallel untersucht werden können, trägt ein solches Protokoll bei.

Der Transfer der Nematoden in Flüssigkeit zwischen festen Agarplatten stellt hier einen direkten, simplen Ansatz dar, der die Möglichkeit der Auswertung einzelner Nematoden und die Kultivierung größerer Mengen von *C. elegans* vereint. Die Methode führte in Vorversuchen zu diesem Projekt zu einer Übersterblichkeit und Verlust einer großen Anzahl von Nematoden durch Adhäsion an herkömmlichen Plastikpipettenspitzen, weshalb eine Optimierung dieser Methode notwendig ist. Der entstehende Flüssigkeits-Scher-Stress könnte durch erhöhte Bildung von oxidativem Stress aufgrund Induktion der Expression von epithelialen Natrium-Kanälen (ENaC) eine mögliche Erklärung für diese verkürzte Lebensspanne liefern, sowie eine potentielle Verfälschung metabolischer Analysen darstellen⁵⁸. Durch Optimierung des Protokolls sollten diese Störfaktoren substantiell reduziert werden um mithilfe dieser Methode ausreichende Mengen an *C. elegans* für die weiteren Versuche kultivieren zu können.

1.4 Osmotischer Stress

Die den Diabetes charakterisierende Hyperglykämie zeigt osmotische Auswirkungen auf Zellen und Organe. Durch die erhöhte intravasale Osmolarität kommt es insbesondere in Zuständen kurzzeitig stark erhöhter Blutglukosespiegel zur zellulären Exsikkose aufgrund der relativen Hypotonizität der Zellen gegenüber dem Intravasalraum. Das dadurch und durch die Stimulierung des Durstempfindens erhöhte intravasale Volumen führt weiterhin zu einer Polyurie. Zellulär hat diese gestörte Flüssigkeitshomöostase Einfluss auf Interaktionen der Bestandteile des Zytoplasmas miteinander wie die Förderung der Aggregation von Proteinen⁵⁹.

In der „Unifying Hypothesis“ wird als pathogenetisches Merkmal diabetischer Komplikationen die Akkumulation von Sorbitol durch Hochregulation des Polyolstoffwechselweges beschrieben¹⁸. Sorbitol fungiert als organisches Osmolyt und wird intrazellulär sowohl durch hohe Glukose als auch osmotischen Stress gebildet⁶⁰. Klinische Studien an Nicht-Diabetikern konnten Hinweise auf einen Zusammenhang erhöhter Plasmaosmolarität mit verstärkter Entwicklung eines Diabetes finden⁶¹. Ein weiterer pathologisch hochregulierter Stoffwechselweg durch erhöht anfallende glykolytische Intermediate stellt die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) dar. Aktivierung von PKC führte in *Xenopus* zu vermehrter Expression von Aquaporin-1 (AQP-1) Kanälen und vermehrtem Wassereinstrom in die Zellen, was für eine Involvierung osmotischer Mechanismen im Diabetes mellitus spricht⁶².

Osmotischer Stress in *C. elegans* zeigte bereits Auswirkungen auf die hier untersuchten Parameter wie eine Verlängerung der Lebensspanne⁶³, sodass aufgrund der hier sehr hohen GE zur Modellierung einer Glukotoxizität und zum besseren Verständnis der Pathogenese in diesem Modell es sinnvoll ist zu versuchen osmotische von glukose-spezifischen Mechanismen des metabolischen Gedächtnisses abzugrenzen.

1.5 Mechanismen der Insulinresistenz

Im Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 überschneiden sich trotz unterschiedlicher Pathogenese viele Stoffwechselalterationen, die die Entwicklung von mikrovaskulären Komplikationen bedingen sowie Teil des metabolischen Gedächtnisses darstellen. In diesem Modell wird eine Hyperglykämie durch hohe GE simuliert ohne experimentell Einfluss auf die Insulinausschüttung zu nehmen. GE wurde sowohl zur Modellierung des Diabetes mellitus Typ 1⁴⁸ als auch Typ 2⁶⁴ in *C. elegans* in unterschiedlichen Konzentrationen bereits eingesetzt.

Insulinresistenz geht der Entwicklung verschiedener Untertypen des Diabetes mellitus Typ 2 voraus wie dem Cluster 3 nach Ahlqvist⁶⁵. Als Ursache ist nutritiver Stress durch Überernährung bei genetischer Prädisposition bekannt⁶⁶. Insulin ist ein anaboles Hormon, das sowohl metabolische Signalwege wie den Glukose-, Fett- und Proteinstoffwechsel beeinflusst als auch mitogen auf Zellwachstum und -teilung wirkt. Glukose wird durch den Glukosetransporter 4 (GLUT-4) insulinabhängig in Leber, Skelettmuskeln und Fettgewebe aufgenommen, die insulinunabhängige Glukoseaufnahme erfolgt über GLUT-1 bis -3.

Die Insulinresistenz betrifft hauptsächlich den Glukosestoffwechsel, die anabole Wirkung auf den Fettstoffwechsel bleibt überwiegend bestehen⁶⁷. Erhöhte Plasmalevel von verzweigtkettigen Aminosäuren wurden bereits mit Diabetes mellitus Typ 2 in Verbindung gebracht, jedoch ist noch wenig bekannt über die Auswirkung der Insulinresistenz auf den Proteinstoffwechsel.

Unter insulinresistenten Bedingungen wird durch Autophosphorylierung der Insulinrezeptor aktiviert. Nachfolgende Signalwege wie die Phosphoinositid-3-kinase (PI3K) und Proteinkinase B (AKT) werden aktiviert und können weiter mitogene und metabolische Effektoraskaden induzieren. Metabolisch kann über den mechanistischen Effektor von Rapamycin (mTOR) die Lipidsynthese sowie Zellwachstum und -teilung aktiviert und über die Phosphorylierung und nachfolgenden Abbau des Transkriptionsfaktors „Forkhead Box Protein O1 (FoxO1)“ die Glukoneogenese gehemmt werden. AKT hemmt über Aktivierung der Glykogensynthasekinase 3 (GSK3) die Glykogensynthese⁶⁸.

Im Insulin/ IGF („Insulin-Growth-Factor“)/ *daf-2* Signalweg in *C. elegans* konnten bereits viele funktionierende Komponenten analog zum humanen Metabolismus charakterisiert werden. Aktivierung des Insulinrezeptorhomologs *daf-2* verhindert die Translokation von FOXO/ *daf-16* vom Zytoplasma in den Nukleus durch Inaktivierung mittels Phosphorylierung. Durch 2%ige GE (100mM im Agar) konnte der *daf-2* Signalweg aktiviert werden, was über eine Verminderung von *daf-16* zu einer Verkürzung der Lebensspanne führte⁵⁰. *Daf-16* beeinflusst verschiedene antioxidative Enzyme wie die Superoxiddismutase. Humaninsulin, welches im Gegensatz zum humanen Metabolismus in *C. elegans* eine antagonistische Wirkung auf *daf-2* hat, konnte unter hoher GE (400mM als Lösung) eine Protektion der Lebensspanne, neuronalen Struktur und Funktion in Abhängigkeit von *daf-16* und *daf-2* zeigen ähnlich einer Reduktion von *ins-7*, das eine agonistische Rolle am Rezeptor einnimmt^{69, 70}. Zur Erklärung der hier untersuchten Auswirkungen hoher GE sollte aufgrund der Beeinflussung antioxidativer Signalwege der Insulinrezeptorsignalweg in Betracht gezogen werden. Die Beteiligung von Mechanismen des Diabetes Typ 2 wie der Insulinresistenz im metabolischen Gedächtnis wurde bisher nicht untersucht. Dieses Modell könnte zur Untersuchung der Rolle der Insulinresistenz im metabolischen Gedächtnis beitragen.

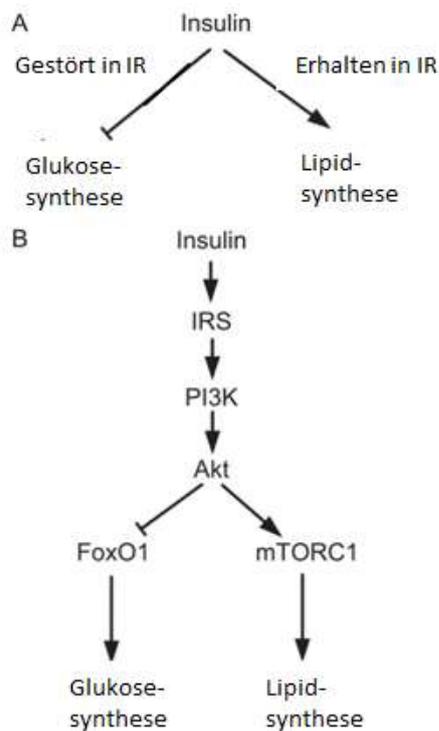


Abb. 4: Illustration der Hauptbestandteile des Insulinrezeptor-Signalwegs. (A) Bei Insulinresistenz ist die hemmende Wirkung des Insulins auf die Glukoseproduktion aufgehoben, die stimulierende auf die Lipidsynthese nicht. (B) Proximale Signalkaskade des Insulins: Insulin aktiviert den Insulinrezeptor und dessen Substrate (IRS) worauf PI3K und AKT aktiviert werden. Über Hemmung von FoxO1 wird die Glukoseproduktion beeinflusst und über Stimulation des mTOR-Komplex 1 (mTORC1) die Lipidsynthese. Publikation der modifizierten Abb. mit Genehmigung des Verlags⁶⁸.

1.6 Ziele der Arbeit

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Einflusses hoher transienter im Vergleich zu hoher persistenter Glukose-Exposition in *C. elegans* sowie die Evaluation als Modell für das metabolische Gedächtnis des Diabetes mellitus. Besonders frühe Mechanismen, die nicht im HbA_{1c} abgebildet werden, sind bisher unzureichend charakterisiert. Pathobiochemisch wird der Einfluss auf die Bildung von ROS und AGEs untersucht zusammen mit funktionellen Parametern wie der Lebensspanne und Motilität. Zur Abgrenzung osmotischer von glukose-spezifischen Mechanismen aufgrund der sehr hohen GE wurden zusätzlich osmotische Kontrollen untersucht.

Erste Erkenntnisse über mögliche beteiligte Mechanismen dieses Modells wurden in einer Analyse des Transkriptomts gewonnen.

Um die technische Durchführung dieser Experimente gewährleisten zu können, wurde zunächst eine einfache Methode optimiert um große Populationen schonend auf Platten kultivieren zu können um eine Übersterblichkeit der Nematoden zu vermeiden und die reproduzierbare Untersuchung mehrerer materialintensiverer Parameter aus einer Population gewährleisten zu können.

Die Arbeit fokussiert sich auf das DIAMAP Ziel 5.01.04⁷¹.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign

Um den Einfluss transienter GE auf biochemische und funktionelle Parameter in *C. elegans* zu untersuchen, wurden zunächst Versuche zur Dosisfindung und Eingrenzung der Behandlungsdauer anhand ausgewählter Parameter durchgeführt. Das in Abb. 5 beschriebene Studiendesign fasst die unterschiedlichen Versuchsgruppen, die in diesem Projekt untersucht wurden, zusammen.

Alle Nematoden der einzelnen Versuchsgruppen in einem Experiment gehörten derselben alterssynchronisierten Population an. Alle Versuchsplatten beinhalteten 400 μM 2'-Desoxy-5-fluorouridin (FUdR) um die Entwicklung der nach der Synchronisierung abgelegten Eier zu Larven zu inhibieren und damit die Ausgangsversuchspopulation zu erhalten. Die GE und ME erfolgten auf Versuchsplatten, welche die Glukose bzw. Mannitol bereits im Agar enthielten. Bei den Versuchsgruppen, die transient mit Glukose oder Mannitol exponiert wurden, erfolgte nach der Exposition ein Transfer der Nematoden auf Versuchsplatten ohne Glukose oder Mannitol wie im Kapitel „Transfer und Probensammlung größerer Mengen an *C. elegans*“ beschrieben. Im Gegensatz zum Metabolismus der meisten Säugetiere benötigt *C. elegans* unter Standardbedingungen keine Glukosesupplementation. In Vorexperimenten zur Validierung der LC-MS/MS als geeignete Methode in diesem Projekt wurden Versuchsgruppen über 12 Tage 50mM MG (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) exponiert und sowohl die intrazelluläre MG-Konzentration als auch die AGE-Spiegel gemessen⁷². Diese Konzentration induzierte in vorherigen Experimenten eine Erhöhung des AGE Argpyrimidin, die mittels Immunfluoreszenz (IF) nachgewiesen wurde⁷². Zur Dosisfindung wurde die Bildung von AGEs als Marker des metabolischen Gedächtnisses unter 200 und 400mM persistierender GE massenspektrometrisch untersucht und daraufhin die weitere GE von 400mM festgelegt. Bildung von ROS, sowie der Induktion eines antioxidativen Reporterenzym wurde nach transienter als auch persistenter GE gemessen. Die Körpergröße, Länge, Glukose- und Proteingehalt, sowie die Entwicklung der Motilität wurden longitudinal erfasst, um die Entwicklung über die Versuchsdauer beurteilen zu können. Um Hinweise auf involvierte Mechanismen zu erhalten wurde das Transkriptom nach transienter sowie persistenter GE untersucht.

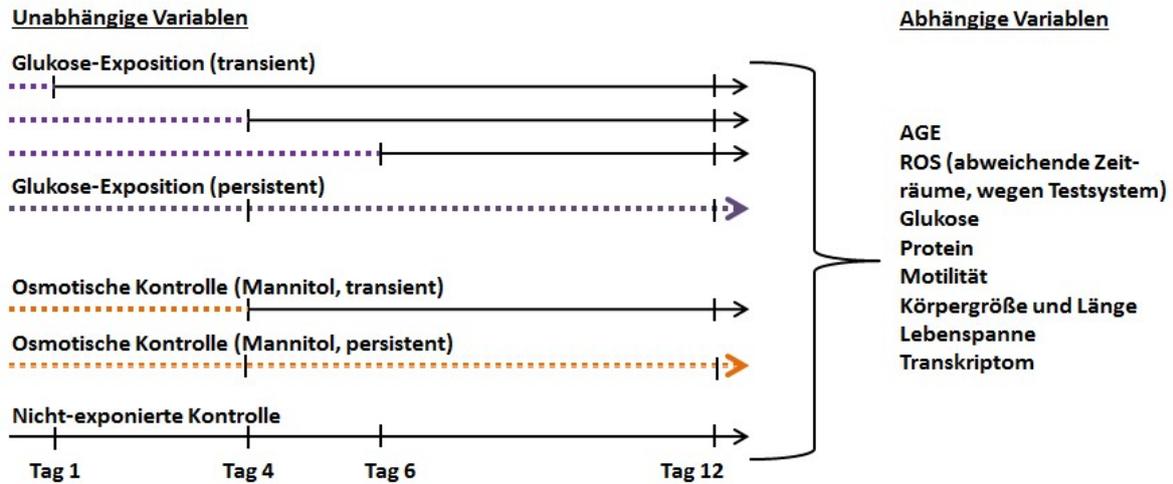


Abb. 5: Studiendesign: Nematoden erhielten unterschiedlich lange transiente hohe Glukose-Expositionen (GE) über 1, 4 und 6 Tage (violette gestrichelte Linie). Anschließend wurde bis Versuchsende keine weitere GE mehr durchgeführt (schwarze durchgezogene Linie). Die persistente GE wurde über den gesamten Versuchszeitraum bis zum Ende des Versuchs nach 12 Tagen oder bei Untersuchung der Lebensspanne bis zum Tod fortgeführt. Analog erhielten Nematoden in der osmotischen Kontrollgruppe transient über 4 Tage hohe Mannitol-expositionen (ME) (orange gestrichelte Linie) und erhielten anschließend bis zum Versuchsende keine ME mehr (schwarze durchgestrichene Linie). Zugunsten der Machbarkeit und sinnvollen statistischen Auswertung wurde hier nur ein Expositionszeitraum untersucht. Die persistente ME wurde über den gesamten Versuchszeitraum bis zum Ende des Versuchs nach 12 Tagen oder bei Untersuchung der Lebensspanne bis zum Tod fortgeführt. Die nicht-exponierten Kontrollgruppen erhielten über den gesamten Versuchszeitraum keine GE oder ME. Vertikale Markierungen auf den horizontalen Zeitstrahlen geben die jeweiligen Expositionszeiträume an.

2.2 *C. elegans* und *E. coli* Stämme

In den hier gezeigten Experimenten wurden neben dem Wildtyp *C. elegans* Stamm Bristol N2 (CGC, Universität Minnesota, Twin Cities, USA) ebenfalls der transgene Stamm CL2166, *dvIs19* [(pAF15)*gst-4p::gfp::nls*] (CGC, Universität Minnesota, Twin Cities, USA) verwendet. Als Nahrungsquelle der Nematoden wurde in allen Experimenten der *E. coli* Stamm OP50 (CGC, Universität Minnesota, Twin Cities, USA) eingesetzt.

2.3 Agarmedien und Zusätze

Agarmedium	Inhaltsstoffe	Erworben von
NGM (Nematode Growth Medium)	25mM KPO ₄ Puffer (pH 6,0) in a.dest.	Eigenherstellung
	2,5g Trypton/ Pepton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	51mM NaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
	20g Agar	
	<u>Nach dem Autoklavieren hinzufügen:</u>	
	13mM Cholesterol-Lösung in EtOH	Sigma-Aldrich
	1mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O	
	1mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O	
1M KPO ₄ Puffer (pH 6,0) in a.dest.		
0,8M KH ₂ PO ₄	TCl, Tokio, Japan	
0,2M K ₂ HPO ₄		
+ FUdR	400µM FUdR	Sigma-Aldrich
+ Glukose	200-800mM Glukose	
+ Mannitol	400mM Mannitol	

Der Agar wurde wie beschrieben hergestellt⁷³ und jeweils 11ml des auf 55°C abgekühlten, autoklavierten Agars in eine Petrischale der Größe 60mm x 15mm (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gegossen. Für die Videoanalysen wurde 3ml NGM-Agar in Petrischalen der Größe 35mm x 10mm (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gegossen.

2.4 Allgemeine Puffer und Chemikalien

Puffer/ Chemikalien	Inhaltsstoffe	Erworben von
M9-Puffer (pH 7,0) in a.dest.	22mM KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
	42mM Na ₂ HPO ₄	
	86mM NaCl	
	1mM MgSO ₄ hinzufügen nach dem Autoklavieren	
Hypochlorit-Lösung in a.dest.	0,5M NaOH	Fluka Analytical, Seelze, Deutschland
	2,3mM NaOCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lysepuffer, nicht denaturierend in a.dest.	20mM Tris HCl (pH 8)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
	137mM NaCl	
	1% Triton-X	
	2mM EDTA	
LB-Medium in a.dest.	4g Bacto™ Trypton	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA
	2g Bacto™ Hefeextrakt	
	171mM NaCl	Sigma-Aldrich
S-Puffer (pH 6,0) in a.dest.	44mM KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich
	6,4mM K ₂ HPO ₄	
	100mM NaCl	

2.5 Kultivierung von *C. elegans*

Während der Kultivierung und der Experimente mit lebendigen *C. elegans* und *E. coli* OP50 wurde entweder steril unter einer Sicherheitswerkbank (Clean Air Supplies Deutschland GmbH, Haan, Deutschland) oder mit einem Gasbrenner (Camping Gaz GmbH, Hattersheim am Main, Deutschland) gearbeitet. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen zwischen unterschiedlichen Stämmen wurde auf eine räumliche Trennung der Experimente und Kulturplatten geachtet. Die *C. elegans* Stämme wurden nach Ankunft im Labor auf NGM-Platten kultiviert und im Dauerstadium auf luftdicht verschlossenen NGM-Platten in einem 10°C Inkubator (Thermostatschrank, Aqualytic, Dortmund, Deutschland) über mehrere Monate konserviert. Zusätzlich wurden gefastete L1/L2-Larven mit S-Puffer von den Platten gesammelt und das Pellet bei -80°C mit gleicher Menge S-Puffer in 30% Glycerol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in Kryotubes für längere Lagerung eingefroren. Zur langsamen Temperaturangleichung für eine höhere Überlebensrate wurden die Kryotubes für die ersten 24 Stunden in einem Einfrierbehälter (Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene, New York, USA) gelagert. Alle Nematoden wurden während der Experimente bei 20°C kultiviert entsprechend der Empfehlungen des CGC⁷⁴. Als Futterquelle wurde 400ml LB-Medium mit wenigen OP50 Kolonien inokuliert, über Nacht bei 37°C und 225 Umdrehungen/ min auf einem Schüttler (Certomat H, Sartorius, Göttingen, Deutschland) inkubiert und danach für maximal 14 Tage in Aliquots bei 4°C luftdicht verschlossen gelagert. Zur Aufkonzentrierung der OP50 zur Fütterung der adulten Nematoden wurden 70% des LB-Mediums nach vollständiger Sedimentierung der Bakterien entfernt.

Für die hier gezeigten Experimente wurden abhängig von der Besiedlungsdichte zwei 0,5cm x 1cm große Agarstücke mit Nematoden im Dauerstadium mittels Einmalskalpell (Braun, Melsungen, Deutschland) ausgeschnitten und auf frische OP50-beschichtete NGM-Platten übertragen. Zur Synchronisierung der Population wurden nach Eiablage (ca. 2,5 Tage) die Nematoden und Eier mit 2 x 1ml M9-Puffer von den Platten gesammelt und in 15ml Zentrifugenröhrchen (Falcon Tube, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gesammelt. Nach Pelletierung der Nematoden und Eier durch 2-minütiges Zentrifugieren bei 800 x g (Minifuge, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) wurde der überschüssige Puffer abgenommen. Durch Behandlung mit 10ml Hypochloritlösung für 5-7 min (max. 15 min) wurden die Nematoden getötet und aufgelöst, die Eier blieben durch ihre harte Schale intakt. Nach dreimaligem Waschen mit 10ml M9-Puffer und jeweiligem Zentrifugieren für 2 min bei 800 x g wurden 150µl Ei-Suspension auf frischen OP50-beschichteten NGM-Platten ausgesät. Nach mikroskopischer Kontrolle (Leica M60, Leica, Wetzlar, Deutschland) sollte die Anzahl der Eier pro Platte 200-300 betragen, ansonsten wurde die Suspension aufkonzentriert oder mit M9-Puffer verdünnt. Die weitere Handhabung wurde aufgrund der benötigten größeren Probenmengen optimiert und wird im nächsten Kapitel erläutert.

2.6 Optimierung der *C. elegans* Kulturbedingungen für Massenkultur

Um eine größere Probenmenge derselben Versuchspopulation zu erzeugen und somit mehr Parameter analysieren zu können, wurde die *C. elegans* Handhabung vom Transfer einzelner Nematoden mit einem Platindraht zum Transfer einer großen Anzahl in Flüssigkeit etabliert. Technische Probleme wie die initiale Übersterblichkeit, sowie Verlust der Nematoden während des Transfers wurden durch Anpassung des Protokolls eliminiert. Zur leichteren Adaptation des Protokolls empfiehlt es sich zusätzlich dem Video, welches der Publikation dieses Verfahrens anhängt, zu folgen⁷⁵.

2.6.1 Massenkultur auf Agarplatten

Nach Aussäen der Ei-Suspension entwickelten sich die Nematoden innerhalb von 2-2,5 Tagen zu adulten Würmern. Vor Eiablage wurden sie mithilfe einer leicht abgeschnittenen 100-1000 μ l Pipettenspitze und 2ml M9-Puffer vorsichtig von den NGM-Platten durch leichtes kreisförmiges Schwenken aufgenommen und in einem 15ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Das Schwenken und die größere Öffnung der Pipettenspitze verringerten die Scherkräfte und die mechanische Verletzung der Nematoden. Abhängig von der Dichte der Suspension wurde M9-Puffer nach Sedimentation der Nematoden abgenommen. Vor dem Auftragen der Suspension auf die Versuchsplatten sollte das Zentrifugenröhrchen vorsichtig ggf. mehrfach invertiert werden um eine gleichmäßige Verteilung der Nematoden auf den Platten zu gewährleisten. Makroskopische und mikroskopische Beispiele für eine gewünschte Dichte von 50-100 Nematoden pro Versuchsplatte sind in Abb. 6 zu sehen. Nach Erreichen der gewünschten Dichte wurden ca. 150 μ l der Nematodensuspension pro Platte auf die mit konzentriertem OP50 beschichteten Versuchsplatten aufgetragen und die Suspension alle vier bis fünf Platten erneut invertiert aufgrund der raschen Sedimentation der Nematoden. Während der Versuche wurden die adulten Tiere alle 1-2 Tage mit 200 μ l konzentriertem OP50 gefüttert abhängig von der Populations- und OP50 Dichte auf den Agarplatten. Dabei wurde auf eine gleichmäßige Flüssigkeitsverteilung zwischen den Gruppen geachtet und die OP50 Konzentration anstatt des Volumens ggf. angepasst. Somit konnte eine Verzerrung der Ergebnisse durch vermehrte Bildung von oxidativem Stress aufgrund von Scherkräften verringert werden⁵⁸. Ebenfalls wurde aus diesem Grund darauf geachtet die Flüssigkeit vollständig in den Agar einziehen zu lassen und die Nematoden von der Pipettenspitze langsam am Innenrand des Röhrchens hinein zu pipettieren.

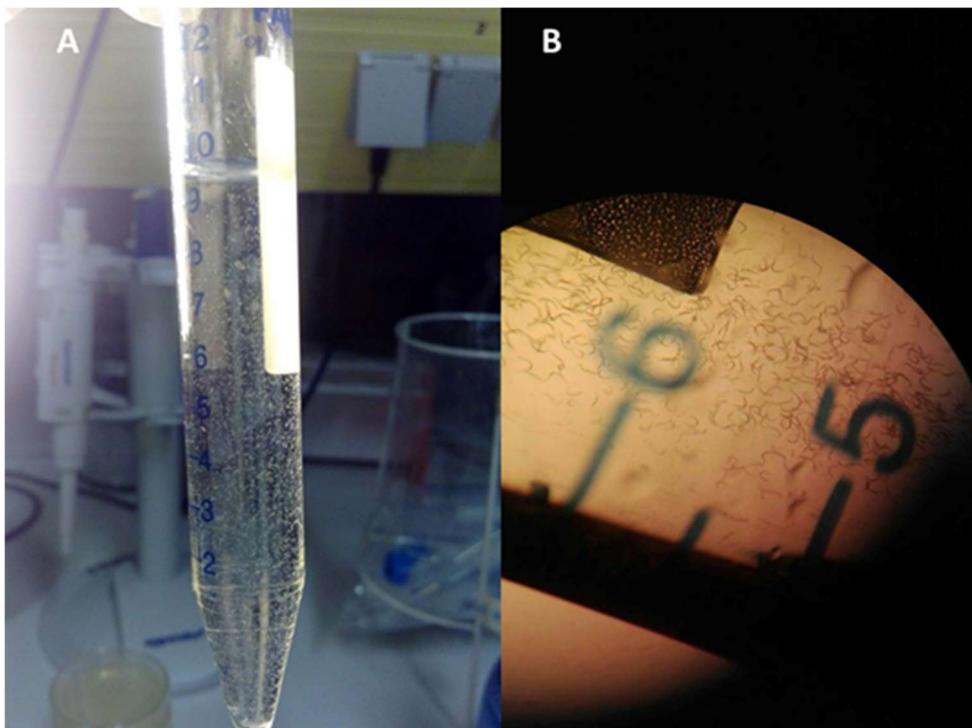


Abb. 6: (A) Makroskopische und (B) mikroskopische Verteilung der Nematoden für eine Dichte von 50-100 Nematoden in 150 μ l Suspension pro Versuchsplatte.

2.6.2 Flüssigkeitstransfer und Probensammlung größerer Mengen an *C. elegans*

Exposition mittels einer im Agar befindlichen Substanz bietet Vorteile wie die Gewährleistung anhaltend gleicher Konzentrationen im gesamten Agar und die Reduktion des Flüssigkeitsstresses durch Vermeidung täglicher Behandlungen mit Substanzlösung. Zum Beenden der Exposition zum Erreichen transienter Expositionsbedingungen ist allerdings ein Transfer auf Kontrollagar ohne diese Substanz notwendig. Technische Probleme wie der Verlust eines Großteils der Nematoden aufgrund von Adhäsionskräften herkömmlicher Plastikpipettenspitzen sowie eine Schädigung der Nematoden durch den Transfer, die in einer Übersterblichkeit nach wenigen Tagen resultierte, erforderten eine Optimierung der Standardmethoden.

Um Versuchsgruppen nach transienter GE auf eine andere Versuchsplatte zu transferieren, wurden die Nematoden mit 500µl M9-Puffer mit einer abgeschnittenen 100-1000µl Pipettenspitze von der Agarplatte aufgenommen. Ggf. wurde der Waschschrift mit demselben Puffer wiederholt und die Suspension direkt auf die neue Versuchsplatte transferiert. Die angegebene Puffermenge wurde bei trockenen Platten ggf. nur leicht erhöht, da eine höhere Flüssigkeitsbelastung zu Rissen in den Agarplatten führt, in welche die Nematoden eindringen können.

Zur Probensammlung wurde unsteril gearbeitet. Alle Platten einer Gruppe wurden mit jeweils 1ml M9-Puffer vorsichtig geschwenkt, abgewaschen und in einem 15ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Das vorsichtige Schwenken gewährleistete, dass vereinzelte bereits tote Nematoden und Eier weiter auf dem Agar hafteten und die Probe nicht verunreinigten. Für den Transfer wurde eisgekühlter M9 Puffer zur Stoffwechselferlangsamung verwendet. Die Probe wurde kurz bei 800 x g anzentrifugiert (Minifuge, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) oder sedimentieren gelassen und dreimal mit 10ml M9-Puffer gewaschen um alle *E. coli* zu entfernen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das max. 1ml große Pellet mit einer 10ml Glaspipette aufgenommen und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Um alle Nematoden aus der Glaspipette zu sammeln, wurden nun aus einem zweiten vorbereiteten 1,5ml Reaktionsgefäß ca. 500µl M9-Puffer aufgezogen um die verbleibenden Nematoden von den Glaswänden zu lösen und zur gesammelten Probe hinzuzufügen. Die Glaspipette wurde in diesem Schritt aufgrund der hohen Dichte der Nematoden verwendet, da diese stark an den Pipettenspitzen aus Plastik hafteten. Nun wurde die Probe bei 19.000 x g für 1 min zentrifugiert (5430R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), der Überstand abgenommen und das Probenpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.6.3 Proteinisolierung

Zu der gefrorenen Probe wurde das gleiche Volumen aus einem Mix aus RNase-freien 0,5 und 1 mm Zirkoniumoxid Beads (Next advance Inc., New York, USA) und mindestens das doppelte Volumen an nicht-denaturierendem Lysepuffer mit Proteinaseinhibitor Cocktail (cOmplete™, Roche, Mannheim, Deutschland) hinzugegeben. Die Proben wurden nun für 1 min auf der Geschwindigkeitseinstellung 9 im Bullet Blender™ (BBX24-CE 21380, Next advance Inc., New York, USA) homogenisiert. Falls die Proben nicht vollständig homogenisiert waren, wurde dieser Schritt wiederholt. Nun wurden die Proben für 30 min bei 19.000 x g und 4°C zentrifugiert (5430R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Proteine der Probe gingen in Lösung und wurden mit dem Überstand in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gesammelt und bei -80°C bis zur Messung aufbewahrt.

2.7 Biochemische Parameter in *C. elegans*

2.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Quantifizierung der isolierten Proteine wurde die Proteinkonzentration der Proben in einem kolorimetrischen Assay nach Bradford mittels Farbumschlag des Coomassie brilliant blue G-250 Farbstoffs anhand einer Standardkurve intrapoliert⁷⁶.

Für die Standardkurve wurde eine Stammlösung aus Rinderserum-Albumin (Bovine Serum Albumin, heat shock fraction, pH 5.2, ≥96%; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in 1 x PBS (aus 10 x PBS Stammlösung, Roth, Karlsruhe, Deutschland) in einer Konzentration von 1mg/ml gelöst und die Standards unterschiedlicher Konzentration, wie in Tab. 1 gezeigt, angesetzt. Die Proben wurden vor der Proteinbestimmung 1:5 mit 1 x PBS und das Detektionsreagenz (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad, Hercules, USA) 1:5 mit a. dest. verdünnt. Für die Pellets der hier gezeigten Experimente ergab sich eine Proteinkonzentration von 2-7mg/ml, sodass zusätzlich eine Verdünnung von 1:10 mit 1 x PBS (also insgesamt 1:50) erfolgte. Nun wurden jeweils 10µl von Standard und verdünnter Probe in Doppelbestimmung in eine transparente 96-well Mikrotiterplatte aus Polystyrol (Brand, Wertheim, Deutschland) pipettiert und 200µl verdünntes Detektionsreagenz dazugegeben. Nach 10 min lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Proteinkonzentration bei 595 nm an einem Spektrophotometer (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Schweiz) anhand der optischen Dichte bestimmt werden. Die Reaktion blieb mindestens 30 min stabil und messbar.

Standard	1 x PBS Puffer (µl)	Protein BSA 1 mg/mL (µl)	Endkonzentration mg/mL	Reagenz mit a. dest. 1:5 verdünnt
S 0 = Blank	30	0	0	200 µl
S 1	27	3	0,1	200 µl
S 2	24	6	0,2	200 µl
S 3	21	9	0,3	200 µl
S 4	18	12	0,4	200 µl
S 5	12	18	0,6	200 µl
S 6	6	24	0,8	200 µl
S 7	0	30	1,0	200 µl

Tab. 1: Verdünnungsreihe der Standardkurve

2.7.2 LC-MS/MS von intrazellulärem MG

Kultur und Probensammlung:

Die Nematoden wurden einmal täglich über 12 Tage 150µl 50mM MG exponiert. Die Proben wurden an Tag 12 weniger als zwei Stunden nach der MG-Exposition gesammelt um einer Abreaktion dieses reaktiven Metabolits soweit wie möglich vorzubeugen.

Probenvorbereitung:

Zur Messung von intrazellulärem MG erfolgte zunächst eine Derivatisierung mit 1,2-Diaminobenzen (DB)⁷⁷. Eine Probe wurde von ca. 15-20 Versuchsplatten gesammelt. Die Proben wurden zunächst zur Enteiweißung mit 20µl eiskalter 20% (wt/vol) Trichloressigsäure in 0,9% (wt/vol) Natriumchlorid und 80µl a. dest. in einem 1,5ml Reaktionsgefäß homogenisiert. Daraufhin wurde jeweils 5µl des internen Standards (¹³C₃-MG; 400nM) hinzugefügt, auf dem Vortex vermischt und bei 21.000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Nun wurde ein HPLC Probengefäß mit einem 200µl Glaseinsatz mit 35µl des Überstandes beschickt. Zur Inhibierung jeglicher Peroxidaseaktivität wurde zu jeder Probe 5µl einer 3%igen Natriumazidlösung (wt/vol) hinzu pipettiert. Nun wurden 10µl einer 0,5mM DB in 200mM HCl mit 0,5mM Diethylentriaminpentaessigsäure (DETAPAC) in a. dest. hinzugegeben und die Proben bei Raumtemperatur für vier Stunden lichtgeschützt inkubiert. Dieser Schritt wurde zur Ionisierung der Proben für die anschließende Analyse mittels LC-MS/MS benötigt⁷⁷. Die Probenvorbereitung sowie die massenspektrometrische Analyse wurde größtenteils von Thomas Fleming und Elisabeth Kliemank (AG Nawroth, Medizinische Fakultät Heidelberg) durchgeführt.

Prinzip der Messung:

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Elektronenspray-Ionisation und anschließender Messung und Analyse durch Tandem-Quadrupolmassenspektrometrie (LC-MS/MS) ist ein hochsensitives Verfahren zur Detektion von Proteinen und deren Modifikationen⁷⁸. Zunächst wurden hierzu die Proteine, der wie beschrieben vorbereiteten Proben, durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie in feinen Kapillaren aufgetrennt und mittels Elektronenspray-Ionisation in kleine stark geladene Tröpfchen vernebelt (Abb. 7(B)). Nach der Evaporation der Tröpfchen gelangen die stark protonisierten Peptide und Aminosäuren in das Magnetfeld des ersten Quadrupolmassenspektrometers und ein Normalmassenspektrum der Probe wird erzeugt. Nun werden die einzelnen Peptide nacheinander in einer Kollisionszelle durch energetische Gaskollision fragmentiert und die so entstandenen Proteinfragmente in einem zweiten Quadrupolmassenspektrometer gemessen (Abb. 7(C)). Die Messungen beider Massenspektrometer werden mit Proteinsequenzierungs-Datenbanken abgeglichen und die Komposition der Probe daraus bestimmt.

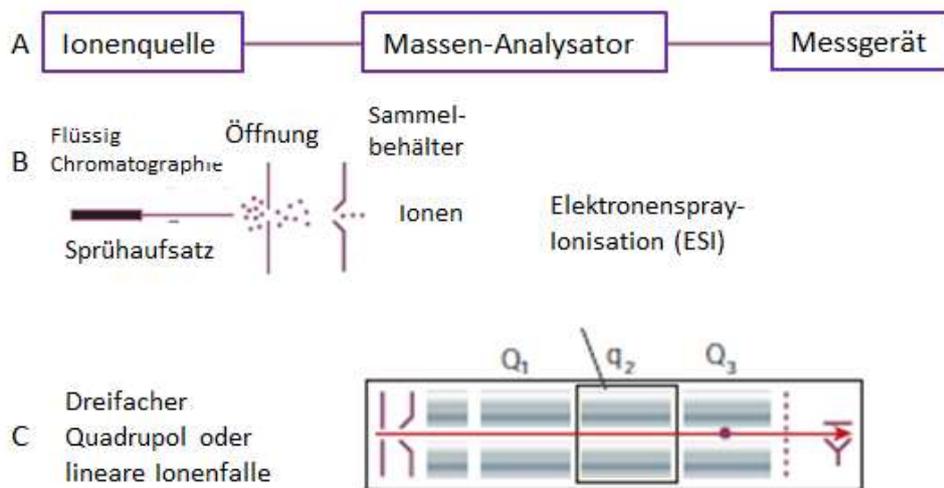


Abb. 7: (A) Generelleres Prinzip der Massenspektrometrie, (B) Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Elektronenspray-Ionisation, (C) Detektion der protonierten Peptide mittels Tandem-Quadrupolmassenspektrometrie (Q1+Q3) mit zwischengeschalteter Kollisionszelle (q2). Publikation der modifizierten Abb. mit Genehmigung des Verlags⁷⁸.

2.7.3 LC-MS/MS von AGEs

Vor der LC-MS/MS Analyse der AGEs wurde ein mehrstufiger Probenverdau durchgeführt zur Freilegung der AGEs. Dazu wurden Proteinproben von ca. 200µg eingesetzt, die von 15-20 Versuchsplatten gesammelt wurden. Zunächst wurden die Proteinextrakte dreimal mit a. dest. mittels Ultrazentrifugation in Zentrifugen-Filtereinsätzen mit einem 10 kDa Filtrationslimit (Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit, Merck Millipore, Massachusetts, USA) gewaschen um die proteinfreien von den proteingebundenen Modifikationen zu separieren. Zur Spaltung der Proteine der proteingebundenen Modifikationen in Peptide wurden 10µl einer 100mM Salzsäure (HCl), 10µl Pepsin (2mg/ml in 20mM HCl) und 10µl Thymol (2mg/ml in 20mM HCl) zu dem gereinigten Protein (ca. 100µl) hinzugegeben und bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Als nächster Schritt wurden die Proben auf einen pH von 7,4 mit 12,5µl eines 0,5M Kaliumphosphatpuffers (pH 7,4) und 5µl einer 260mM Kalilauge neutralisiert und gepuffert. Zur Spaltung der Peptide in einzelne Aminosäuren am N-Terminus wurden 10µl Pronase E [2mg/mL in 10mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4)] hinzugegeben und 10µl Penicillin-Streptomycin Lösung zur Inhibierung bakterieller Aktivität. Die Proben wurden nun bei 37°C für weitere 24 Stunden inkubiert. Als letzten Verdauungsschritt wurden 10µl Aminopeptidase [2mg/ml in 10mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4)] und 10µl Prolidase [2mg/mL in 10mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4)] (alle Reagenzien von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) hinzugegeben um den Abbau der Peptide zu katalysieren. Die Proben wurden nun bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. Das Hydrolysat wurde wie beschrieben mittels LC-MS/MS analysiert^{79, 80} (ausführliche Beschreibung unter „LC-MS/MS von intrazellulärem Methylglyoxal“). Die Probenvorbereitung sowie die massenspektrometrische Analyse wurde größtenteils von Thomas Fleming und Elisabeth Kliemank (AG Nawroth, Medizinische Fakultät Heidelberg) durchgeführt.

2.7.4 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies mittels Dihydroethidium

C. elegans wurden mittels Dihydroethidium (DHE, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) angefärbt, einem mitochondrienspezifischen Redoxindikator, der nach Oxidation zu Ethidium einen Farbumschlag von blau nach rot zeigt⁸¹. In ein 1,5ml Reaktionsgefäß mit M9-Puffer wurden 50 Nematoden pro Gruppe einzeln mittels Platindraht transferiert und nach Sedimentation einmal mit M9-Puffer gewaschen. Aus einer bei -20°C gelagerten Stammlösung von 20mg/ml DHE (entspricht 63,4µM DHE) in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, wurde das Arbeitsreagenz von 300nM kurz vor Zugabe zu den Proben angesetzt. Hierbei wurden zu 5µl Stammlösung 5µl DMSO und 990µl M9-Puffer gegeben. Die Proben wurden mit 500µl Reagenz für 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde der Überstand abgenommen und die Proben zweimal mit 1ml M9-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in 50µl Einbettmedium (VECTASHIELD® Hardset™ Antifade Mounting Medium, Vector Laboratories Ltd., Peterborough, United Kingdom) aufgenommen und auf einem Objektträger verteilt, sodass die Nematoden einzeln beurteilt werden konnten. Die mikroskopische Analyse der Fluoreszenzemission erfolgte nach Aushärtung des Einbettmediums am konfokalen Mikroskop (TCS SP8, Leica, Wetzlar, Deutschland). Die Exzitation erfolgte bei 535 nm und die Emission wurde bei 610 nm gemessen. Der Helligkeitskontrast der erstellten Bilddateien wurde in ImageJ 1.49v (National Institute for Health, Bethesda, USA) quantifiziert. Diese Experimente wurden von Kübra Özer (AG Hammes, Medizinische Fakultät Mannheim) durchgeführt⁷².

2.7.5 Detektion von ROS mittels GFP-Reporter

Um die Sensitivität der Detektion der reaktiven Sauerstoffspezies zu erhöhen⁸² wurde die Bildung von ROS ebenfalls mithilfe des transgenen *C. elegans* Stamm CL2166 *dvls19[(pAF15) gst-4p::gfp::nls]* untersucht. CL2166 besitzt ein nukleär lokalisiertes, transkriptionelles Reportergenkonstrukt (Abb. 8(A)), das für ein durch oxidativen Stress induzierbares GFP kodiert. Die Lokalisation des Konstruktes liegt unter der Kontrolle des Promotors der Glutathion-S-Transferase 4 (*gst-4*), was eine Expression des GFP ohne Bindung an das *gst-4* Protein zur Folge hat. In eine Kavität einer schwarzen 96-well Mikrotiterplatte mit transparentem, flachem Boden (Brand, Wertheim, Deutschland), in der 100µl 1 x PBS (aus 10 x PBS Stammlösung, Roth, Karlsruhe, Deutschland) pro Kavität vorgelegt waren, wurden 50 Nematoden mittels Platindraht transferiert. Es wurden jeweils drei technische Replikate pro Gruppe eingesetzt. Die Expression des GFP wurde an einem Fluoreszenzspektrometer (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Schweiz) bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 538 nm gemessen.

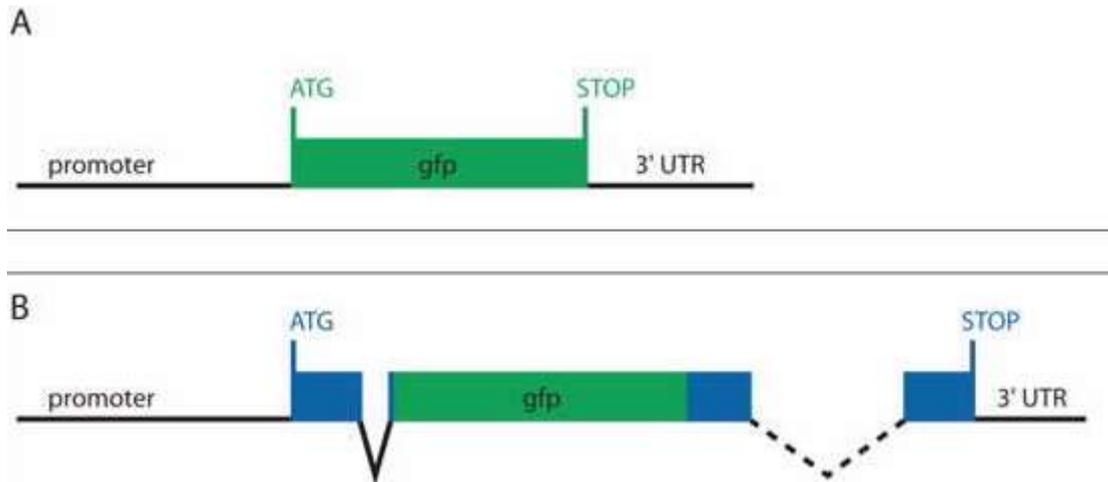


Abb. 8: (A) transkriptioneller Reporter, (B) translationeller Reporter⁸³. Publikation mit Genehmigung des Verlags.

2.7.6 Fluoreszenz-basierte Glukosemessung von *C. elegans* und Agar

Zur Probengewinnung wurden die Nematoden in einem 1,5ml Reaktionsgefäß mit 1ml M9-Puffer einzeln mit einem Platindraht gesammelt und dreimal mit M9-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die erste Messung nach 12 Tagen GE wurden 1600 *C. elegans* in 250 μL Puffer gesammelt. Aufgrund ausreichenden Materials und zugunsten der Durchführbarkeit des Versuches wurde für die weiteren Messungen an Tag 1, 4 und 6 weniger Material gesammelt (800 *C. elegans* in 200 μL Puffer). Um die Zeitpunkte miteinander zu vergleichen wurden die Ergebnisse von Tag 12 mittels Korrekturfaktor multipliziert und angeglichen ($(800\text{ CE} / 200\text{ }\mu\text{L}) / (1600\text{ CE} / 250\text{ }\mu\text{L}) = 0,625$). Zur Proteinisolation und Glukosemessung wurden die Proben wie im Kapitel „Proteinisolation“ beschrieben aufgeschlossen.

Für die Agarprobe wurden mit einem Skalpell 1cm² große Agarstücke mittig von den gewaschenen Versuchsplatten entnommen (Abb. 9(A)), in 1,5ml Reaktionsgefäßen gesammelt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Analyse gelagert. Vor der Glukosemessung wurden die Agarproben mit silanisierter Glaswolle (SupelcoTM über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) homogenisiert wie in Abb. 9(B) gezeigt. Dazu wurde am Boden eines 1,5ml Reaktionsgefäßes mit einer heißen Nadel ein Loch gestochen, dieses Gefäß mit dichtgepackter Glaswolle beschickt und in ein weiteres 1,5ml Reaktionsgefäß gesteckt. Die aufgetauten Agarstücke wurden nun auf die Glaswolle gelegt und das geschlossene Reaktionsgefäß bei 8000 x g 10 min zentrifugiert (5430R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Danach wurde das mit Glaswolle gefüllte Reaktionsgefäß verworfen und die verflüssigte Agarprobe in den Assay eingesetzt.

Zur quantitativen Bestimmung der intrazellulären Glukosekonzentration in den Nematoden sowie im eingesetzten Agar wurde der Amplex[®] Red Glukose/ Glukose Oxidase Assay Kit (Invitrogen, Kalifornien, USA) gemäß den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Hierbei reagiert zunächst die Glukose-Oxidase mit der in der Probe vorhandenen D-Glukose zu D-Gluconolacton und H₂O₂. Das Amplex[®] Red Reagenz (10-Acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazin) bildet mit H₂O₂ mittels Meerrettich Peroxidase (HRP) das rot-fluoreszierende Resorufin. Die Quantifizierung erfolgt über eine Standardkurve (Abb. 9(C)), die eine Intrapolation im linearen Bereich von 3,15-100 μM

Glukose zulässt. Die Standards wurden seriell mit 1 x Reaktionspuffer herunterverdünnt. Die Nematodenproben wurden 1:2 und 1:20 verdünnt, die Glukoseagarproben 1:10.000 verdünnt und die Kontrollagarproben 1:2 verdünnt eingesetzt. Standards und Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Kübra Özer (AG Hammes, Medizinische Fakultät Mannheim) durchgeführt⁷². In eine schwarze 96-well Mikrotiterplatte mit flachem, transparenten Boden (Brand, Wertheim, Deutschland) wurden jeweils 50µl des Standards oder der Probe pipettiert. Dazu wurden 50µl des Testreagenzes (Amplex® Red Reagenz/ HRP/ Glukose Oxidase) hinzugegeben, die Reaktion für 30 min lichtgeschützt inkubiert und anschließend fluorospektroskopisch bei 530 nm angeregt und die Emission bei 590 nm gemessen (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Schweiz).

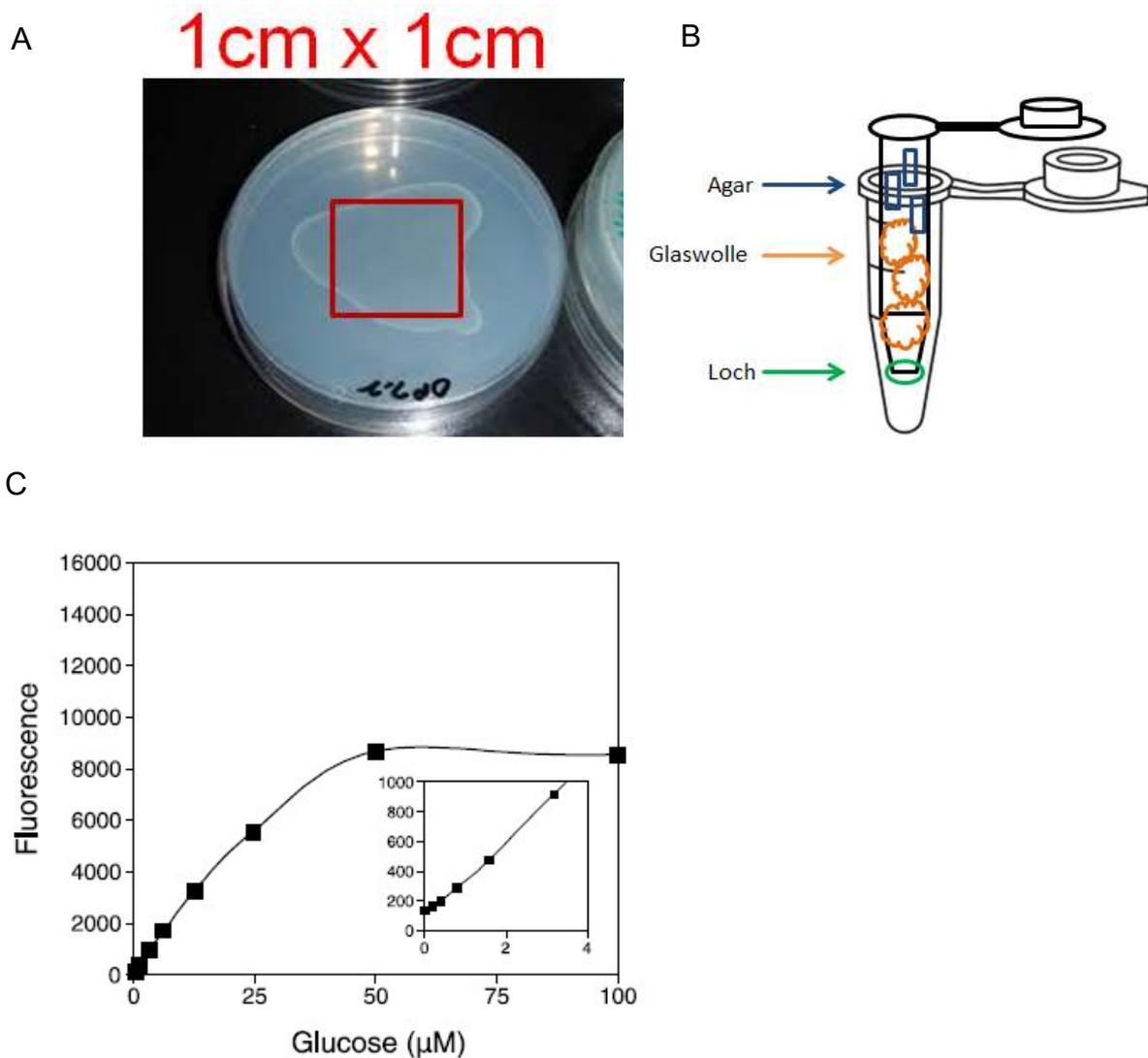


Abb. 9: (A) standardisierte Fläche der Agarplatte zur Glukosemessung, (B) Schematischer Aufbau der Agarhomogenisierung, (C) Glukosestandardkurve nach Testmanual

2.8 Funktionelle Parameter in *C. elegans*

2.8.1 Motilität

Zur Bestimmung der Motilität wurden 10-15 Nematoden einzeln nacheinander auf kleine OP50-beschichtete NGM-Platten (35 mm x 10 mm) gesetzt und in einer Auflösung von 640 x 512 Pixel mindestens 15 s lang gefilmt (Moticam 1000, Beyersdörfer GmbH, Mandelbachtal, Deutschland). In der computergestützten Videoanalyse wurden die Videosequenzen mittels Software (WormTracker v2.0.25, Thomas Bornhaupt, Neustadt adW, Deutschland) zunächst in Einzelbilder unterteilt und die Kopf- sowie Schwanzposition der einzelnen Nematoden lokalisiert. Mit diesen Daten wurde die Geschwindigkeit des ganzen Körpers in Relation zur Plattenmitte (absolut) als auch zur Körpermitte (relativ) gemessen und in mm/s angegeben⁸⁴. Der Krümmungswinkel wurde anhand der Winkelabweichung zur Körpermitte der Nematoden in °/s und die Körpermotilität in mm/s berechnet.

2.8.2 Lebensspanne

Zur Bestimmung der Lebensspanne wurden pro Versuchsgruppe 50 jung adulte Nematoden einer Population gleichmäßig mittels Platindraht auf zwei Versuchsplatten einer Gruppe verteilt. Im Verlauf des Versuchs wurden die Nematoden täglich unter mikroskopischer Sichtkontrolle gezählt und die Verstorbenen dokumentiert. Unbewegliche Nematoden wurden hierzu mit einem Platindraht stimuliert und bei fehlender Bewegungsreaktion als verstorben klassifiziert. Nematoden, die sich in den Agar eingruben oder vom Agar wegbewegten, wurden zensiert.

2.9 Körpergröße und Länge

Durch Videoanalyse mittels WormTracker Software wurde ebenfalls die Körpergröße in mm² und die Länge der Nematoden in mm berechnet.

2.10 Genetische Analysen

2.10.1 RNA-Isolierung und RIN Qualitätskontrolle

Zur Isolierung der RNA wurden zunächst große Mengen an *C. elegans* mittels optimierter Massenkultur kultiviert, in 1,5ml Reaktionsgefäßen gesammelt und mindestens 3 x mit 1ml eiskaltem M9-Puffer gewaschen, um eine Kontamination mit der Futterquelle OP50 *E. coli* zu vermeiden. Die Proben wurden jeweils dazwischen 1 min bei 19.000 x g (5430R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die gewaschene Probe am Ende in flüssigem Stickstoff kryo-konserviert, sowie bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die RNA wurde im nächsten Schritt mittels Trizol™ Methode isoliert. Zu der gefrorenen Probe wurde das gleiche Volumen an einem Mix aus RNase-freien 0,5 und 1 mm Zirkoniumoxid Beads (Next advance Inc., New York, USA) und 300µl Trizol™ (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) hinzugegeben. Die Proben wurden nun für 1 min auf der Geschwindigkeitseinstellung 9 im Bullet Blender™ (BBX24-CE 21380, Next advance Inc., New York, USA) homogenisiert. Falls die Proben nicht vollständig homogenisiert waren, wurde dieser Schritt wiederholt. Danach wurde das Probengefäß mit 700µl

Trizol™ aufgefüllt und mehrmals über Kopf vermischt. Nach diesem Schritt bestand die Möglichkeit die Proben erneut bei -80°C zu lagern und zu einem späteren Zeitpunkt zu isolieren. Ansonsten wurden nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei RT 200µl Chloroform hinzugefügt, erneut für 15 s vermischt und dann 3 Minuten bei RT inkubiert. Nun wurden die Proben für 15 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert (5430R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und nach Phasentrennung die wässrige, obere Phase, in der sich die RNA gelöst hatte, in ein neues, beschriftetes 1,5ml Gefäß überführt. Abhängig von der erhaltenen Probenmenge wurde dasselbe Volumen an Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) zum gelartigen Ausfällen der RNA dazugegeben, sowie 2 µl Glykogen (Roche, Basel, Schweiz) zum Sichtbarmachen des RNA-Pellets und mit der Probe durch Schwenken vermischt. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die Proben erneut 20 Minuten bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 1ml eiskaltem 80 %igem Ethanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen. Nach einer letzten 10-minütigen Zentrifugation bei 7.500 x g und 4°C wurde der Überstand entfernt und das Pellet für 5-10 min bei RT getrocknet. Danach wurde das Pellet mit 20µl RNase-freiem Wasser (Qiagen, Hilden, Deutschland) gelöst und bei nicht vollständig gelösten Pellets weitere 10µl RNase-freies Wasser hinzugegeben. Einige unlösliche Pellets wurden zusätzlich 10 Minuten auf dem Wärmeblock (ThermoMixer F1.5, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 55°C erhitzt und mehrmals währenddessen durch Pipettieren resuspendiert.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm im Microplate Reader (Tecan Spark, Männedorf, Schweiz) gemessen und zur Beurteilung der Kontamination zusätzlich die Absorption bei 280 nm bestimmt. Dabei wurde ein Quotient von 260 nm zu 280 nm von 1,8-2,0 angestrebt.

Zur Beurteilung der Stabilität wurde die RNA Integritätsnummer (RIN) mittels Kapillarelektrophorese am Agilent 2100 Bioanalytiker (Agilent, Santa Clara, CA, USA) bestimmt.

2.10.2 Transkriptomanalyse mittels Microarray

Genexpressionsanalysen wurden mittels GeneChip EleGene-1_0-st (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Dazu wurde zunächst biotinylierte antisense cDNA gemäß dem standardisierten Markierungsprotokoll mit dem GeneChip® WT Plus Reagent Kit und dem GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit (beide von Thermo Fisher Scientific) aus der isolierten RNA hergestellt. Die Hybridisierung auf die Chips erfolgte im GeneChip-Hybridization oven 640, die Anfärbung in der GeneChip Fluidics Station 450 und das Einscannen der gefärbten Chips mittels GeneChip Scanner 3000 (alle Geräte von Affymetrix, High Wycombe, UK).

2.10.3 Bioinformatik Microarray

Zur Annotierung der Arrayergebnisse wurde Custom CDF Version 22 mit Entrez-basierten Gendefinitionen verwendet. Die Intensität der Fluoreszenzsignale wurde mittels quantiler Normalisierung und RMA Background-Korrektur normalisiert. OneWay ANOVA Analysen wurden durchgeführt um differentiell exprimierte Gene mittels dem Softwarepaket SAS JMP Genomics v10 von SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA) zu bestimmen. Als Signifikanzniveau wurde ein Anteil falsch positiver Ergebnisse von $\alpha=0,05$ FDR-korrigiert akzeptiert.

„Gene Set Enrichment Analysen (GSEA)“ wurden verwendet um zu untersuchen, ob ein statistisch signifikanter Unterschied von definierten Gen-Sets aufgrund ihrer Verteilung innerhalb einer geordneten Genliste besteht. Dazu wurde das fgsea Paket in R-Programmiersprache mittels der Open-Source Computersoftware R v3.4.0 (R Core Team, 2017) und RStudio v1.1.456 (<http://www.rstudio.org>) verwendet. Die gezeigten Stoffwechselwege wurden über öffentliche Datenbanken ermittelt (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg>).

2.10.4 DAVID Signalweganalyse

Mittels einer weiteren Software der „Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)“ v6.8 wurden die jeweils differentiell regulierten Gene der einzelnen Gruppen analysiert und die regulierten KEGG-Signalwege ausgewertet. Diese Analyse wurde als Ergänzung zur GSEA durchgeführt um ein besseres Verständnis unklarer Signalwegregulationen zu erhalten.

2.11 Statistik

Die statistischen Analysen (außer Analyse des Microarrays) wurden mittels GraphPad Prism v7.03 (GraphPad Software, LaJolla, USA) durchgeführt. Es wurden jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichungen einzelner Gruppen angegeben, wenn nicht anders beschrieben. Für Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden ungepaarte zweiseitige t-Tests verwendet. Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen wurden mittels One-Way ANOVA durchgeführt in Kombination mit Dunnett's oder Tukey's Korrektur für multiple Tests. Um zwei oder mehr Gruppen über mehrere Parameter hinweg zu vergleichen, wurden Two-Way ANOVAs mit Sidak's post-hoc Korrekturen angewendet.

Das Signifikanzniveau α wurde bei 5% angesetzt, ein $p < 0,05$ also als signifikant angesehen. Die statistische Auswertung der Experimente zur Lebensspanne erfolgte mittels Kaplan-Meier Kurven und One-Way ANOVA. Dabei wurden aufgrund der Empfehlungen zur Erhöhung der Validität mehrere statistische Analysen durchgeführt⁸⁵. In der ersten Analyse wurden alle Nematoden derselben Versuchsgruppe über die vier Experimente gepoolt und gesammelt ausgewertet. In der zweiten Analyse wurden wie bei Auswertung der übrigen Parameter die Mittelwerte der Versuchsgruppen der einzelnen Experimente miteinander verglichen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Optimierung der *C. elegans* Massenkultur auf Plattenmedien

3.1.1 Proteinmenge korreliert mit der Nematodenanzahl

Um eine verlässliche Relation der Proteinmenge zur Zahl der Nematoden zu erhalten und damit die Ergebnisse auf einen Nematoden darstellen zu könne anstatt eher abstrakt auf eine Einheit Protein, wurden nach 12 Versuchstagen unterschiedlich große Proben gesammelt, in denen die Anzahl der Nematoden erfasst und die Proteinmenge mittels Bradford Assay quantifiziert wurde. Beide Parameter wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt (Abb. 10).

Die Proteinmenge zeigte sich nach 12 Versuchstagen linear abhängig von der Nematodenanzahl, sodass für zukünftige Experimente kein aufwendiges Zählen der Nematoden mehr notwendig ist, sondern von der Proteinmenge direkt auf die Anzahl geschlossen werden kann. Auch die geringste Probengröße von 500 Nematoden zeigte eine reproduzierbare Messung. Somit konnte eine Funktion erstellt werden um in weiteren Experimenten die Nematodenanzahl aus der Proteinkonzentration errechnen zu können und so die zeitaufwändige Quantifizierung der Nematoden zu vermeiden (Abb.10). Bei einer Probengröße von 1500 Nematoden ging eine Probe pro Gruppe in die Messung ein. Durch die Optimierung der Methode konnte der Verlust von Nematoden aufgrund technischer Probleme wie Adhäsion an Pipettenspitzen oder Schädigung der Nematoden durch Scherkräfte mit nachfolgender Übersterblichkeit, eliminiert werden und somit eine reproduzierbare Kultivierung und Einsatz in Experimenten gewährleistet werden.

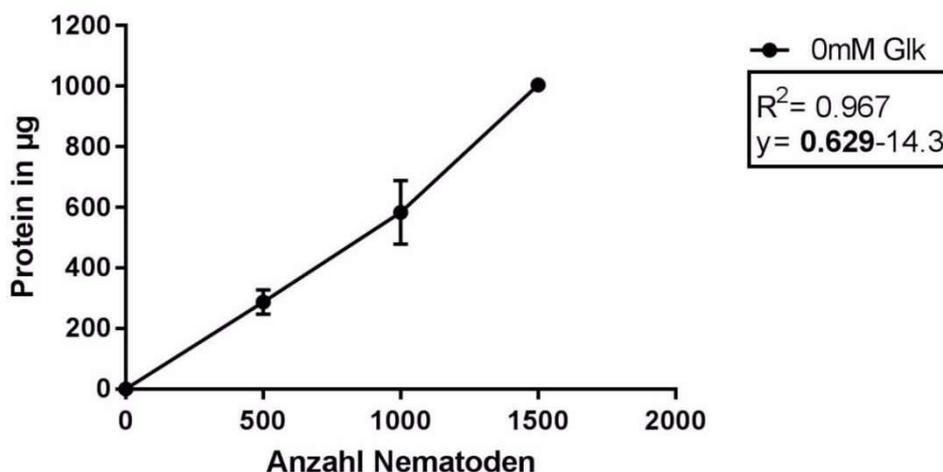


Abb. 10: Korrelation der Proteinmenge in µg im Lysat zur Nematodenanzahl des *C. elegans* Wildtyp N2 nach 12 Tagen (Lysat von 500 Nematoden, n = 3; Lysat von 1000 Nematoden, n = 3; Lysat von 1500 Nematoden, n = 1). Die Nematoden wurden zur Quantifizierung einzeln gesammelt und die Gesamtproteinkonzentration anschließend mittels Bradford Assay bestimmt. Dargestellt ist der MW±SD.

3.1.2 Detektion von MG, MG-H1 und AP – Ein Beitrag zur Reproduzierbarkeit

Um zu untersuchen, ob mit der nach dem hier etablierten Protokoll erhaltenen Probenmenge reproduzierbare Ergebnisse mittels LC-MS/MS gewonnen werden können, wurde nach 50mM MG-Exposition einmal täglich über 12 Tage sowohl die intrazelluläre MG-Konzentration als auch die Bildung von MG-H1 und AP, die durch MG gebildet werden, gemessen. Unter dieser Konzentration konnte in vorherigen Experimenten mittels Immunfluoreszenz-Detektion eine Erhöhung von AP über 12 Tage Behandlung beobachtet werden (K. Acunman, AG Hammes, persönliche Mitteilung). Mittels dieser Detektionsmethode erhobene Daten zeigten eine relevante Varianz aufgrund schneller Ausbleichung der Fluoreszenzfärbung, weshalb in dieser Arbeit die Verwendung von LC-MS/MS als hochsensitive Detektionsmethode angestrebt wurde.

Mittels LC-MS/MS konnte nach 12 Tagen 50mM MG-Exposition eine Erhöhung sowohl der intrazellulären MG-Konzentration (Abb. 11(B); n=3) als auch der MG-H1- und AP-Menge im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle festgestellt werden (Abb. 11(C), Abb. 11(D); n=3). Somit konnten durch die hier erzeugte Probenmenge und den Einsatz von 200µg Totalprotein Messungen der AGEs und MG mit geringer Varianz mittels LC-MS/MS durchgeführt werden.

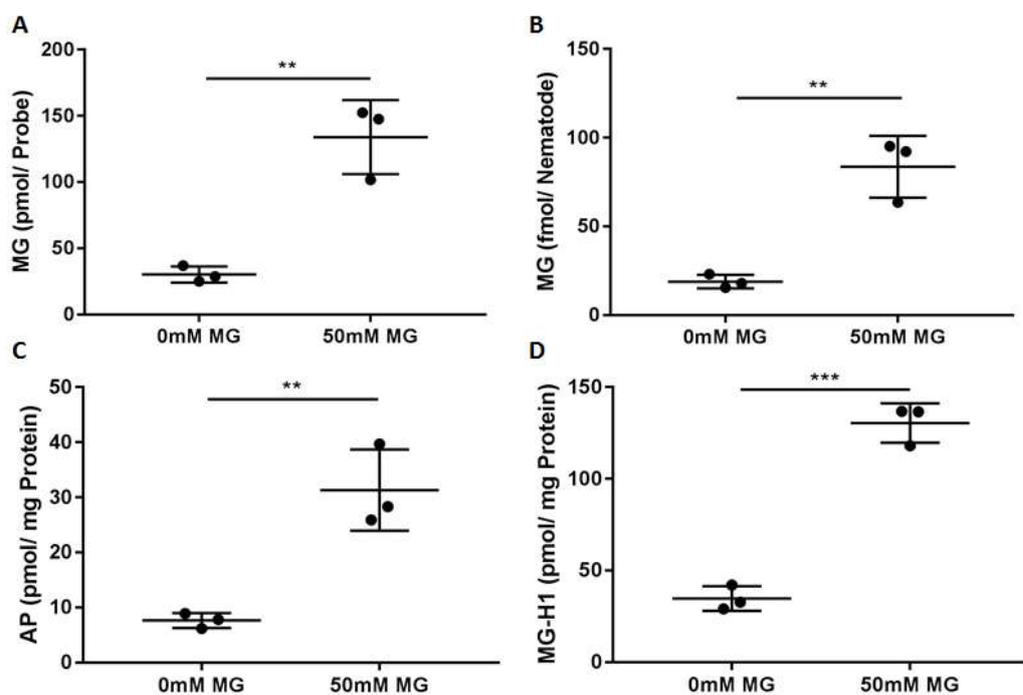


Abb. 11: Intrazelluläre MG-Spiegel nach 50mM MG-Exposition über 12 Tage bezogen auf eine Probe (A) oder auf einen Nematoden (B). AP- (C), sowie MG-H1-Spiegel (D) nach 50mM MG-Exposition über 12 Tage. Gezeigt sind MW±SD, **p<0,01, ***p<0,001; n=3. Intrazelluläre MG-Level, MG-H1 und AP sind nach 12 Tagen 50mM MG-Exposition erhöht.

3.1.3 Flüssigkeitstransfer hat keinen Einfluss auf die Bildung von ROS

Aufgrund der bisher auftretenden Übersterblichkeit der Nematoden beim Flüssigkeitstransfer zwischen Versuchsplatten wurde unter Anwendung des optimierten Protokolls die Bildung von ROS als Ursache der auftretenden Übersterblichkeit untersucht. Die GFP-Expression des Reporterstamms CL2166 unter GE wurde als indirekte Messung von erhöhtem ROS bestimmt. Nicht-transferierte Nematoden wurden hierbei nach zwei Tagen mit Nematoden, die nach einem Tag auf neue GE-Platten transferiert und darauffolgend einen weiteren Tag kultiviert worden sind, verglichen. Durch Bildung von ROS wird unter dem Promoter der Glutathion-S-Transferase 4, einem antioxidativem Enzym, ebenfalls die Transkription eines GFP-Proteins induziert, was hier zur Quantifizierung des ROS herangezogen wurde.

Die Induktion von GFP durch ROS war unter GE unabhängig vom Flüssigkeitstransfer gleichermaßen erhöht im Vergleich zu den nicht-exponierten Kontrollen (Abb.12). Die GFP-Erhöhung unterschied sich in den GE-Gruppen nicht, was für ein schonenderes Protokoll ohne zusätzliche Induktion von ROS aufgrund des Flüssigkeitstransfers spricht.

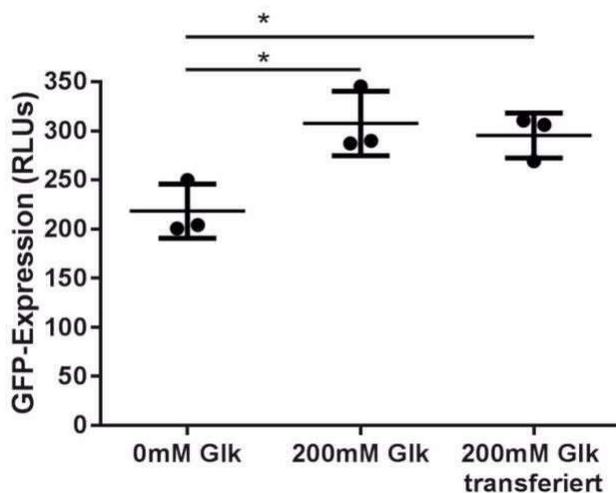


Abb. 12: GFP-Expression durch ROS im transgenen *C. elegans* Stamm CL2166 (*gst4::GFP*) unter 200mM GE. Die Nematoden wurden entweder zwei Tage lang unter 200mM GE oder nach einem Tag GE mittels Flüssigkeitstransfer auf eine neue Glukoseplatte transferiert und einen weiteren Tag kultiviert. Diese Gruppen wurden mit nicht-exponierten Kontrollen am Ende des Versuches nach zwei Tagen verglichen. Gezeigt sind MW \pm SD; * $p < 0.05$; $n=3$.

3.2 Auswirkungen transienter und persistenter GE in *C. elegans*

3.2.1 Transiente Glukose-Exposition hat keinen Einfluss auf die Bildung von AGEs, die durch persistente Glukose-Exposition erhöht werden

Um zu untersuchen, ob persistente GE die Bildung von AGEs induziert, wurde mittels LC-MS/MS der Einfluss persistenter GE mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen im Vergleich zu persistenter MG-Exposition über 12 Tage auf die Bildung verschiedener AGEs untersucht. Hier dargestellt sind AP, MG-H1 und FL. Glyoxal-Hydroimidazolone (G-H1), N ϵ -(carboxymethyl)-lysin (CML) und N ϵ -(1-carboxyethyl)-L-lysin (CEL) wurden durch MG- oder Glukose-Exposition nicht vermehrt gebildet (nicht dargestellt).

Persistente MG-Exposition (50mM) und persistente GE (400mM) konnten eine Erhöhung von AP bewirken (Abb. 13(A)). MG-H1 wurde vermehrt nach MG-Exposition gebildet, aber auch nach GE (400mM) (Abb. 13(B)). FL konnte nur nach GE (400mM), nicht nach MG-Exposition erhöht gemessen werden (Abb. 13(C)). Insgesamt zeigte sich eine erhöhte Bildung von MG-H1 und AP durch GE und MG-Exposition, aber eine rein glukoseabhängige Bildung von FL, was für einen differentiellen Einfluss von Glukose und Methylglyoxal auf die Bildung von AGEs spricht. Weitere Experimente wurden mit der höheren Glukosekonzentration (400mM) fortgeführt.

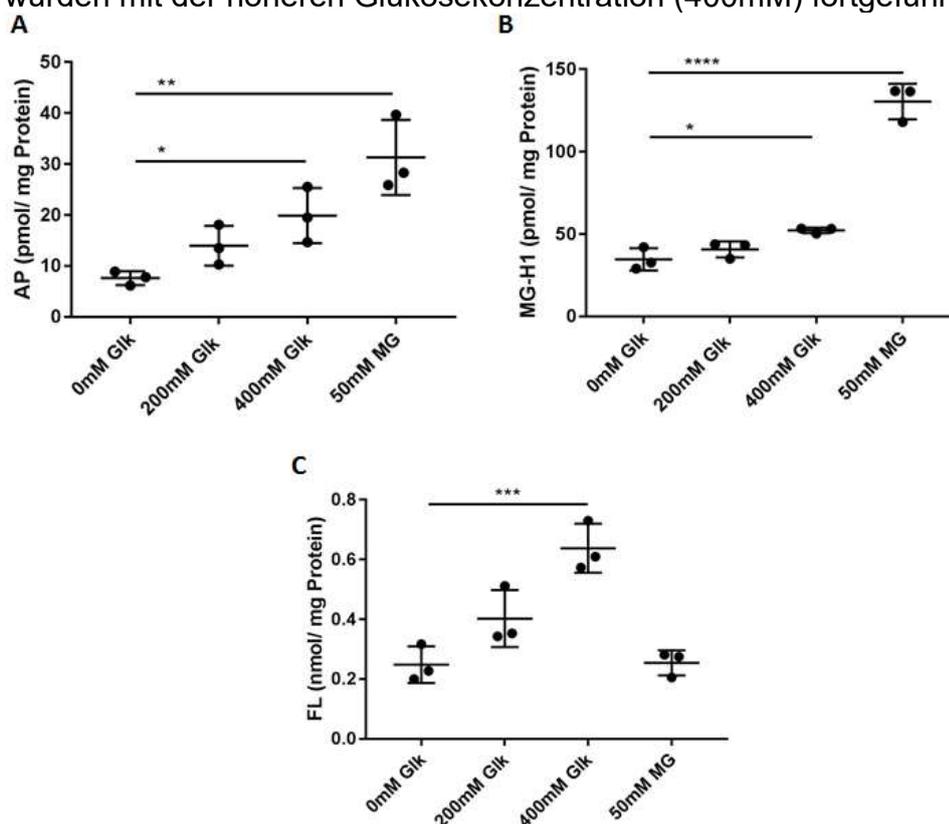


Abb. 13: Einfluss von persistenter Glukose- (200, 400mM) und MG-Exposition (50mM) auf die Bildung von AP (A), MG-H1 (B) und FL (C) nach 12 Tagen Exposition. Gezeigt sind MW \pm SD; *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001; n=3. Glukose- und MG-Exposition erhöht die AP und MG-H1 Bildung. FL wird nur nach Glukose-, aber nicht nach MG-Exposition erhöht gemessen.

Um zu untersuchen, welche Auswirkung transiente GE auf die Bildung von AGEs hat, wurden Nematoden über 1, 4 und 6 Tage 400mM Glukose exponiert und am Ende des Versuchs nach 12 Tagen mit Nematoden unter persistenter hoher GE und nicht-exponierten Kontrollgruppen verglichen (Abb. 14(A)+(C)+(E)). Es zeigte sich keine Erhöhung der untersuchten AGEs am Ende des Versuchs nach 12 Tagen durch transiente GE. Bereits initial nach transientser GE konnte keine eindeutige Erhöhung der AGEs beobachtet werden (Abb. 14(B)+(D)+(F)).

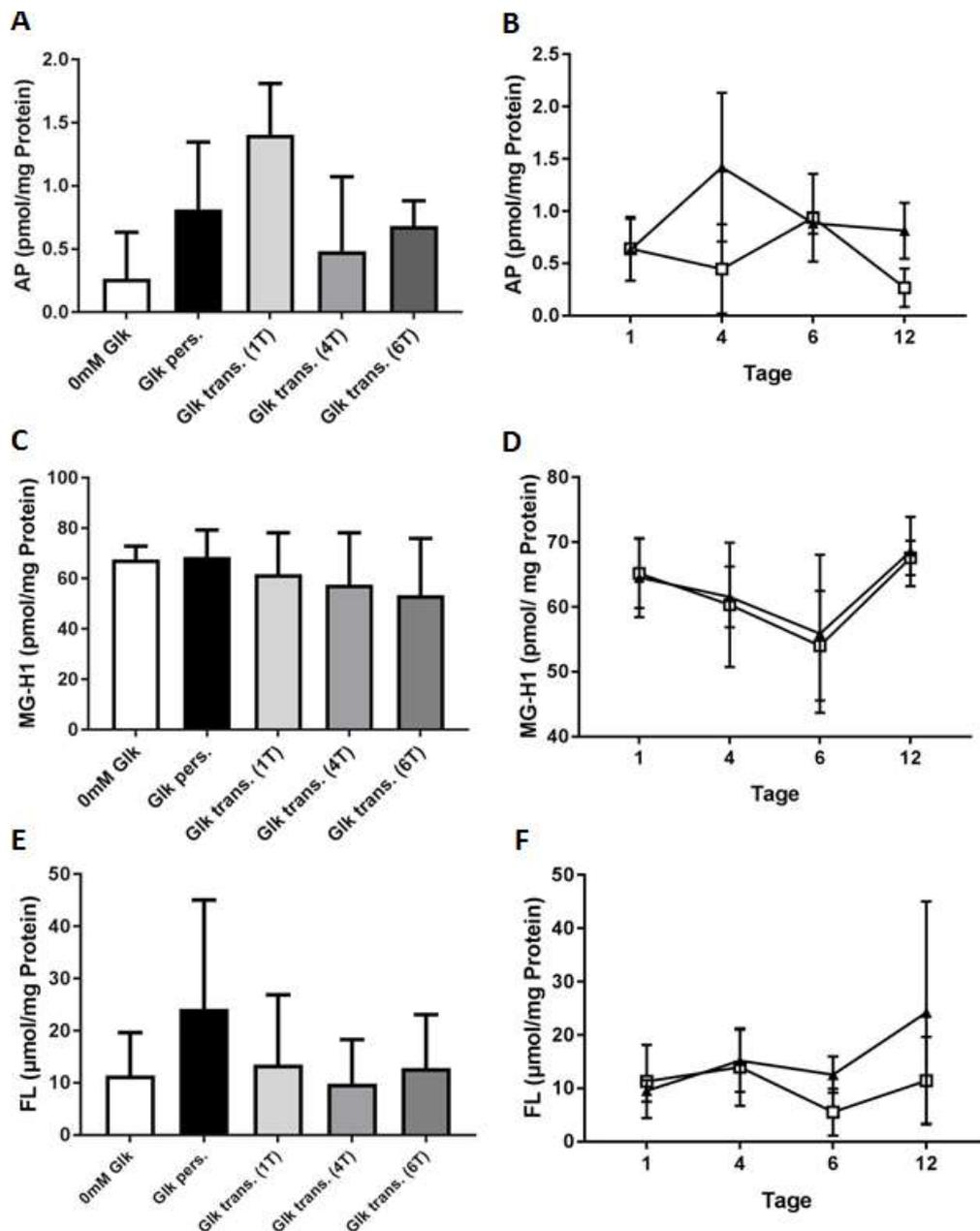


Abb. 14: Einfluss transientser GE (400mM) auf die Bildung von AP (A), MG-H1 (C) und FL (E) nach 12 Tagen im Vergleich zu persistenter GE (400mM, schwarze Dreiecke) und der nicht-exponierten Kontrollgruppe (weiße Quadrate). AP (B), MG-H1 (D) und FL (F) direkt nach Ende der transientser GE im Vergleich zu nicht-exponierten Kontrollgruppen. MW±SD, n=4.

Die Bildung von MG-H1, AP und FL wird durch persistente GE induziert, aber transiente GE ist dazu nicht ausreichend. Somit zeigen sich in diesem Modell AGEs nicht anhaltend reguliert, sodass ein metabolisches Gedächtnis über AGE-Bildung nicht dargestellt werden kann.

3.2.2 Transiente und persistente Glukose-Exposition erhöhen ROS

Um die Bildung von reaktivem oxidativem Stress unter GE zu untersuchen, wurden Nematoden unterschiedlich hohen Konzentrationen von Glukose (200, 400, 600 oder 800mM) über 12 Tage kontinuierlich exponiert und ROS mit dem mitochondrienspezifischen fluoreszierenden Redoxsensor Dihydrofluorescein (DHE) gemessen (Abb. 15).

Die GE hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung von ROS im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrollgruppe (Abb. 15(A)). Aufgrund der Variabilität der Messwerte zwischen den einzelnen Experimenten, sowie in den jeweiligen Versuchsgruppen, ist diese Aussage am ehesten durch die hier festgestellte Variabilität der Messmethode zu begründen. Eine Analyse aller Einzelmesswerte der jeweiligen Versuche miteinander zeigte statistisch eine Erhöhung der ROS durch GE mit verschiedenen Glukosekonzentrationen, was durch die Anwendung stabilerer Messverfahren bestätigt werden sollte (Abb. 15 (B)).

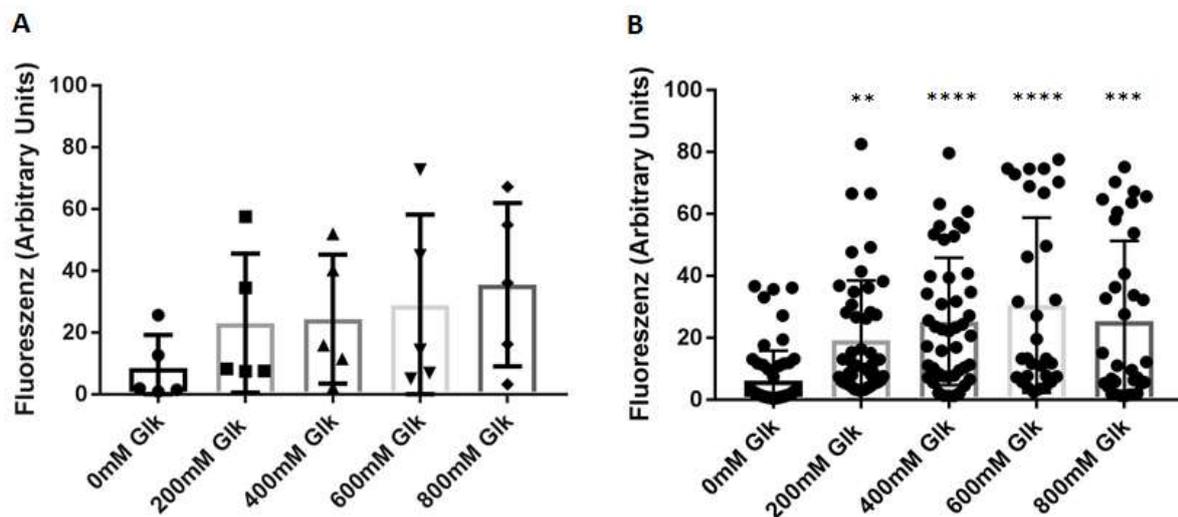


Abb. 15: Persistente GE zeigt einen Trend zur Erhöhung ROS. (A) Vergleich der Mittelwerte der Versuchsgruppen einzelner Experimente, $n=5$, n.s., (B) Vergleich aller Einzelmesswerte der Versuchsgruppen über alle Experimente hinweg, $n=30-59$; ** $p<0,05$; *** $p<0,005$; **** $p<0,0001$. Gezeigt sind $MW\pm SD$.

Um eine sensitivere und spezifischere Detektion des ROS zu gewährleisten, wurden Experimente mit einem transgenen *C. elegans* Stamm durchgeführt, der einen transkriptionellen, GFP-getaggten Reporter nach ROS-Exposition exprimiert (Stamm CL2166).

200, 400 und 600mM persistente GE konnte über den gesamten Versuchszeitraum eine konzentrationsabhängige Induktion des Reporters für ROS im Vergleich zu den nicht-exponierten Kontrollgruppen induzieren (Abb. 16: 200mM Glk vs. 0mM Glk an Tag 2: n. s., an Tag 4: ** $p<0,01$, an Tag 6: * $p<0,05$, an Tag 8: * $p<0,05$; 400mM Glk vs. 0mM Glk an Tag 2: * $p<0,05$, an Tag 4: ** $p<0,01$, an Tag 6: ** $p<0,01$, an Tag 8: * $p<0,05$; 600mM Glk vs. 0mM Glk an Tag 2: * $p<0,05$, an Tag 4: ** $p<0,01$, an Tag 6: *** $p<0,001$, an Tag 8: **** $p<0,0001$). Am Ende des Versuchs nach 8 Tagen sank in allen Versuchsgruppen die Induktion des Reporters wieder. Transiente GE (400mM) wurde über 1, 2, 3 und 4 Tage mit anschließender Inkubation über denselben Zeitraum unter nicht-exponierten Kontrollbedingungen (Messung also nach 2, 4, 6 und 8 Tagen) durchgeführt. Nach 4 Tagen GE und 4 weiteren Tagen unter nicht-exponierten Kontrollbedingungen konnte eine erhöhte Induktion des Reporters im Vergleich

zu der nicht-exponierten Kontrollgruppe gemessen werden, die sich nicht signifikant von der persistenten GE-Gruppe über die gesamten 8 Tage unterschied (Abb. 17). Transiente GE über 4 Tage erzeugten somit eine anhaltende Induktion des Reporters für ROS, die sich nicht von der durch persistente GE unterscheidet. Eine anhaltende Induktion antioxidativer Enzyme durch ROS kann hier als Mechanismus des metabolischen Gedächtnisses identifiziert werden.

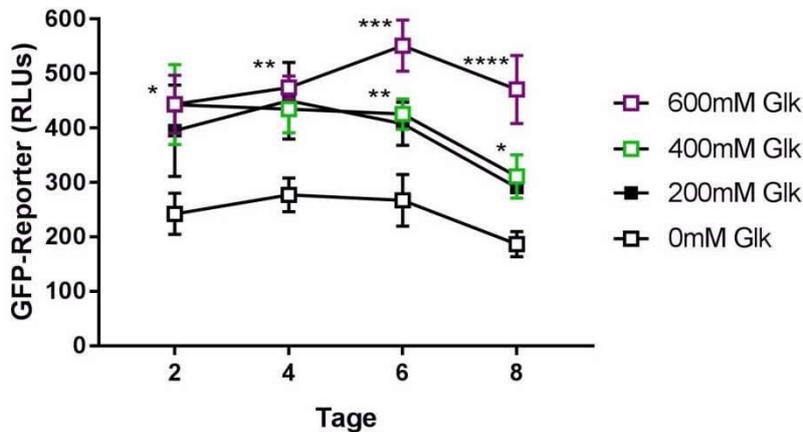


Abb. 16: Induktion des transkriptionellen GFP-getaggten Reporters des transgenen Reporterstamm CL2166 nach persistenter GE (200, 400, 600mM Glukose) über 2, 4, 6 und 8 Tage. Gezeigt sind MW±SD; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001; n=3. Persistente GE erhöht die Induktion des GFP-getaggten Reporters für ROS.

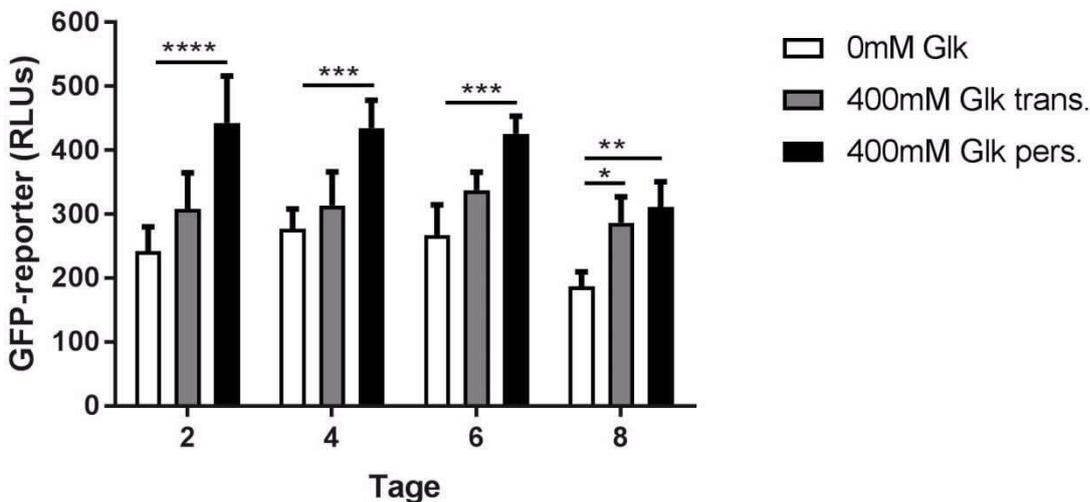


Abb. 17: Induktion des transkriptionellen GFP-getaggten Reporters nach transienter und persistenter GE (400mM Glk) im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrollgruppe. Transiente GE wurde die erste Hälfte der Inkubationszeit mit 400mM Glukose durchgeführt und die zweite Hälfte ohne GE kultiviert (z.B. Messung nach 8 Tagen: 4 Tage GE mit darauffolgenden 4 Tagen ohne GE). Gezeigt sind MW±SD; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001; n=3. Transiente GE über 4 Tage induziert anhaltend den GFP-Reporter bis Tag 8 des Experimentes.

3.2.3 Transiente und persistente Glukose-Expositionen beeinflussen die Motilität in Abhängigkeit von der Expositionszeit

Um den Einfluss persistenter GE auf die Motilität als Ausdruck von neurologischer Funktion, sowie allgemeiner Vitalität zu untersuchen, wurden die Bewegungen der einzelnen Nematoden videogestützt analysiert. Hierzu wurde in vier unabhängigen Experimenten die Körpermotilität (KM) in mm/s und der Krümmungswinkel des Körpers (KW) in Grad/s von jeweils 10-15 Nematoden analysiert (Abb. 18).

Zu Beginn des Versuches nach eintägiger Exposition zeigte sich unter GE bereits eine Reduktion der Motilität (Krümmungswinkel) (Abb. 18(B)). Über den weiteren Zeitraum des Versuches konnte unter persistenter GE weiterhin der gleiche Trend einer reduzierten Motilität im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle beobachtet werden. Zum Ende des Versuches nach 12 Tagen verringerte sich die Motilität der nicht-exponierten Kontrollen. Unter GE zeigte sich im Vergleich dazu nach 12 Tagen eine erhöhte Motilität (Krümmungswinkel) (Abb. 18(A)). Der gleiche Trend konnte in weiteren Parametern wie der Kopf- und Schwanzmotilität beobachtet werden (nicht dargestellt).

Um zu untersuchen, ob die gleichbleibende Motilität über die Zeit unter GE osmotisch reguliert wurde, erhielten die Nematoden 400mM ME. Unter hohem osmotischem Druck verringerte sich die Körpermotilität zunächst ähnlich zur GE konnte dann aber keine Protektion der Motilität an Tag 12 wie unter GE beobachtet zeigen (Abb. 18(C)+(D)).

Zusammenfassend scheint die anfänglich eingeschränkte Motilität unter GE am ehesten osmotisch reguliert zu sein. Die Protektion der Motilität über den Versuchszeitraum unter GE aber nicht in der osmotischen Kontrollgruppe macht hier glukose-spezifische Mechanismen wahrscheinlich (Abb. 18(C)).

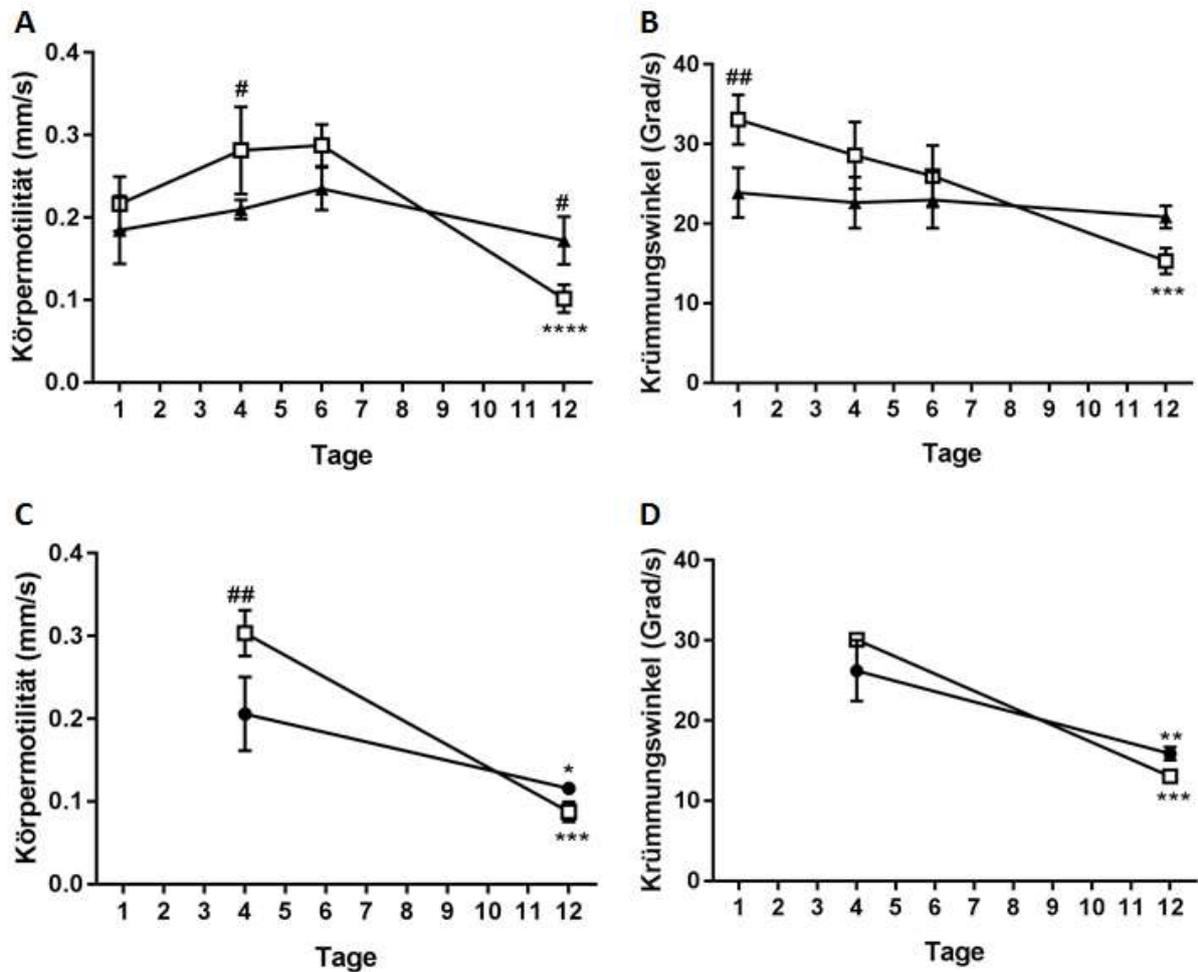


Abb. 18: Einfluss von hoher Glukose auf die neuronale Funktion und Vitalität in CE, gemessen an den Surrogaten Körpermotilität (A) und Krümmungswinkels des Körpers (B) unter 400mM GE (schwarze Dreiecke, n=4; nicht-exponierte Kontrolle (weiße Quadrate, n=4), sowie unter persistenter 400mM ME (schwarze Kreise, n=3) (Körpermotilität (C), Krümmungswinkel (D)). Gezeigt sind MW±SD; longitudinaler Vergleich eines Zeitpunktes mit dem vorherigen Zeitpunkt *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005, ****p<0,0001; horizontaler Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen an einem Zeitpunkt #p<0,05, ##p<0,005.

Um den Einfluss transienter GE auf die Motilität zu untersuchen wurden Nematoden über 1, 4 und 6 Tage 400mM Glukose exponiert und die Motilität im Vergleich zu persistenter GE und der nicht-exponierten Kontrolle nach 12 Tagen analysiert (Abb. 19). In Abhängigkeit der Expositionsdauer zeigte transiente GE einen protektiven Effekt auf die Motilität, allerdings weniger stark als persistente GE (Abb. 19(A)). Diese Beobachtung spricht für anhaltende Mechanismen eines metabolischen Gedächtnisses, die konträr zu bekannten Mechanismen eine Protektion hier auf Ebene der Motilität zeigen.

Transiente ME über 4 Tage zeigte am Versuchsende eine Protektion der Motilität im Gegensatz zu persistenter ME (Abb. 19(C)). Die Protektion der Motilität durch persistente GE in diesem Versuch könnte also teilweise durch osmotische Regulation erklärt werden. Die gegensätzliche Regulation von transientser und persistenter Behandlung unter GE und ME gibt Hinweise auf weitere glukose-spezifische Mechanismen.

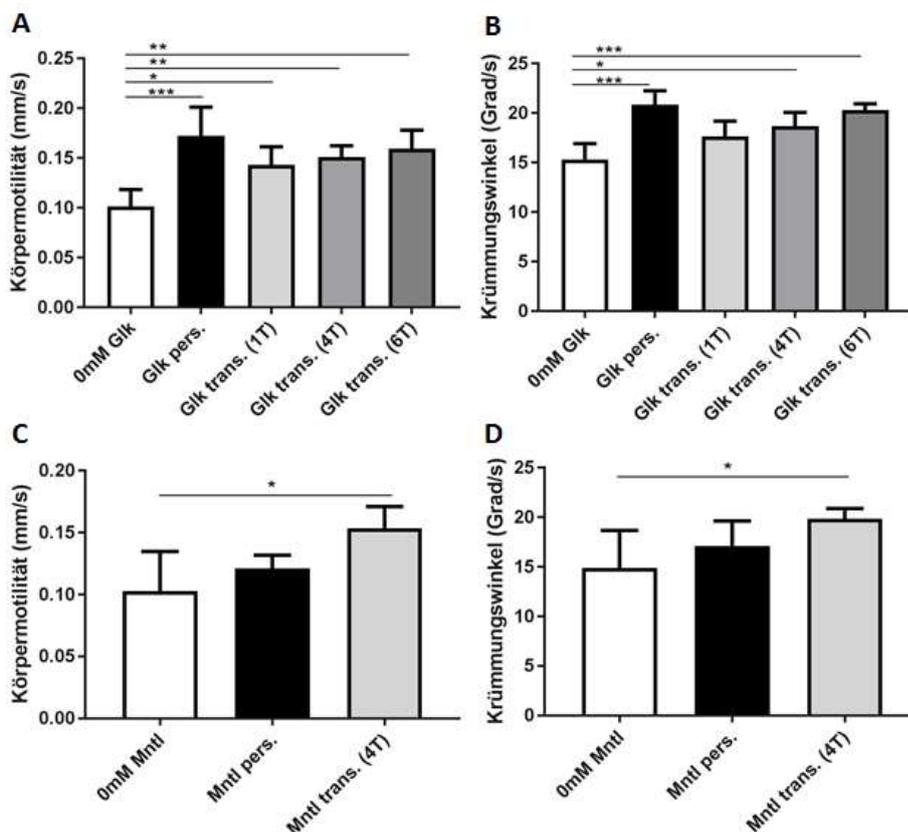


Abb. 19: Körpermotilität (A) und Krümmungswinkel des Körpers (B) der Nematoden unter persistenter und transientser 400mM GE im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle, sowie unter persistenter und transientser 400mM ME (Körpermotilität (C), Krümmungswinkel (D)) am Versuchsende nach 12 Tagen. Transiente GE erfolgte zu Beginn des Versuchs über 1, 4 oder 6 Tage, transiente ME hier über 4 Tage. Danach erhielten die Gruppen bis Tag 12 keine weitere GE/ME. Gezeigt sind MW±SD; *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005; n=4.

3.2.4 Transiente und persistente Glukose-Exposition reduziert die Wachstumsrate

Um den Einfluss persistenter und transienter GE (400mM) auf den Metabolismus von *C. elegans* zu untersuchen, wurde die Länge und Körpergröße mittels Videoanalyse sowie die Proteinkonzentration mittels Bradford Assay über den Versuchszeitraum bestimmt.

Im longitudinalen Vergleich innerhalb einer Gruppe nahm die Länge unter 400mM GE anfangs weniger zu als in der nicht-exponierten Kontrollgruppe, bis die Wachstumsrate zwischen Tag 6 und 12 stagnierte (Abb. 20(A)). Die Körpergröße unter 400mM GE nahm über den Versuchszeitraum nicht zu (Abb. 20(B)). Die nicht-exponierte Kontrollgruppe nahm über den Versuchszeitraum kontinuierlich an Länge und Körpergröße zu. Im Querschnittsvergleich der Behandlungsgruppen untereinander hatten die Nematoden unter GE nach 6 und 12 Tagen eine geringere Länge und Körpergröße (Abb. 20(A)+(B); Abb. 21: Bild).

Transiente GE führte nach 4 sowie 6 Tagen zu einer anhaltenden Reduktion der Länge und Körpergröße bis zum Ende des Versuches nach 12 Tagen abhängig von der Dauer der transienten GE im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle (Abb. 22(A)). Diese Ergebnisse zeigen eine anhaltende Reduktion der Körpergröße und Länge durch transiente GE im Sinne eines metabolischen Gedächtnisses. Persistente GE bewirkte die stärkste Reduktion der Körpergröße und Länge in allen Versuchsgruppen.

Um eine osmotische Regulation von Länge und Körpergröße unter persistenter und transientser GE zu untersuchen, wurden Nematoden 400mM Mannitol exponiert. ME zeigte im longitudinalen, sowie im Querschnittsvergleich eine gleichartige Reduktion der Länge und Körpergröße über den Versuchszeitraum wie GE (Abb. 22(A)). Somit unterliegen die Reduktion der Länge und Körpergröße der Nematoden unter GE (400mM) am ehesten einer osmotischen Regulation.

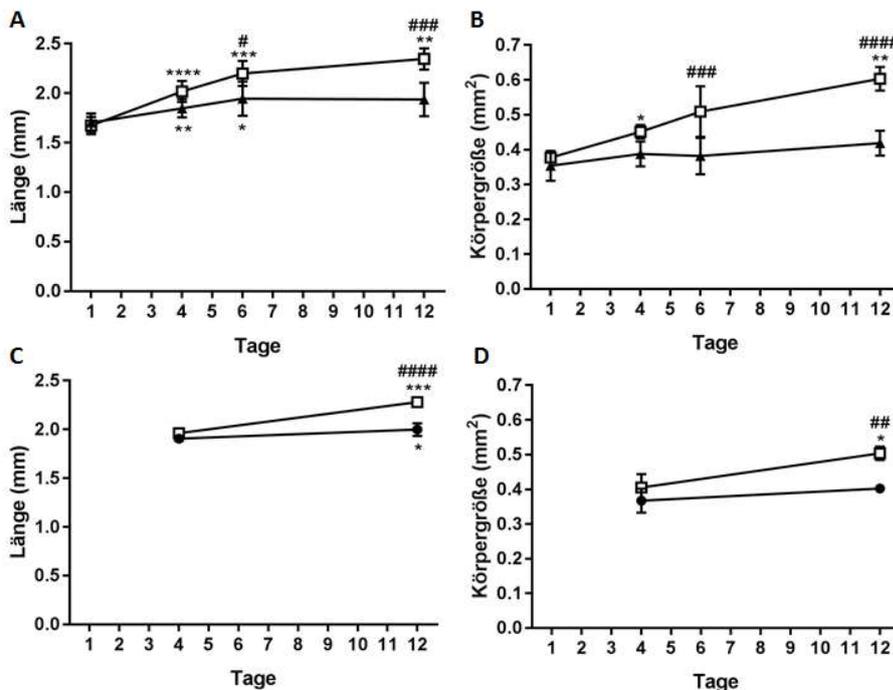


Abb. 20: Zeitlicher Verlauf der Länge (A) und Körpergröße (B) der Nematoden unter persistenter 400mM GE (schwarze Dreiecke) im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle (weiße Quadrate), sowie unter persistenter 400mM ME (schwarze Kreise) (Länge (C), Körpergröße (D)). Gezeigt sind MW \pm SD; longitudinaler Vergleich * p <0,05, ** p <0,005, *** p <0,0005, **** p <0,0001; horizontaler Vergleich # p <0,05, ## p <0,005, ### p <0,0005, #### p <0,0001; n =3.

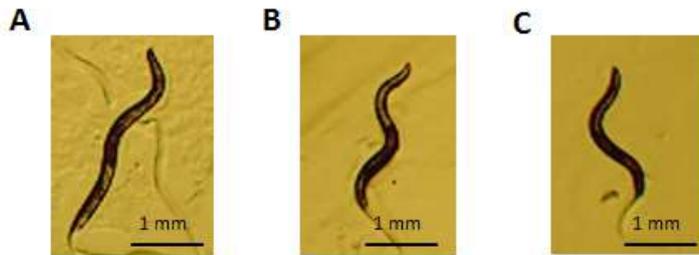


Abb. 21: Bespielaufnahmen eines nicht-exponierten Kontrollnematoden (A), eines Nematoden unter 400mM GE (B) und unter 400mM ME (C) am Ende der Versuchsdauer nach 12 Tagen.

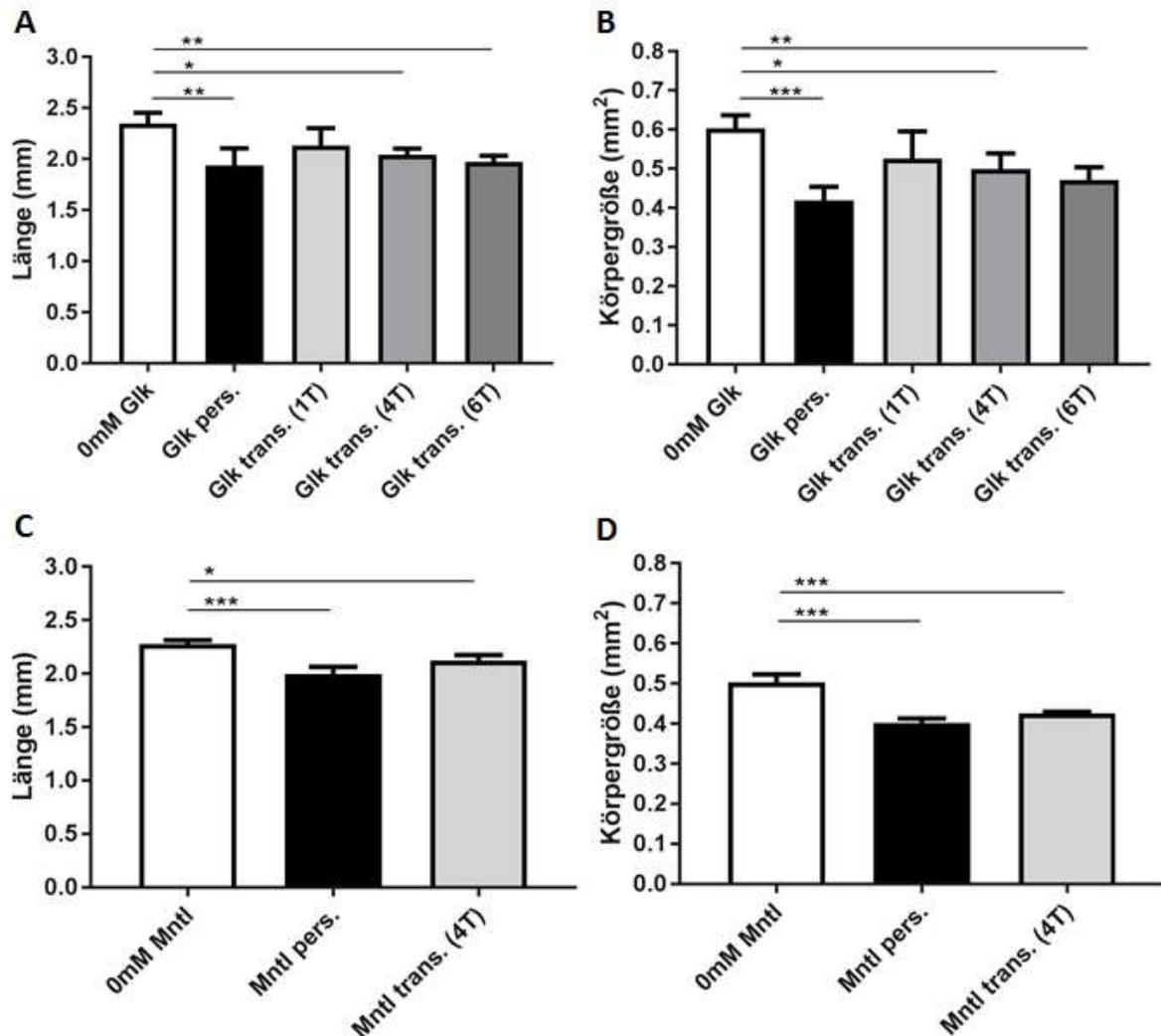


Abb. 22: Länge (A) und Körpergröße (B) der Nematoden unter persistenter und transienter 400mM GE im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle, sowie unter persistenter und transienter 400mM ME (Länge (C), Körpergröße (D)) am Versuchsende nach 12 Tagen. Transiente GE erfolgte zu Beginn des Versuchs über 1, 4 oder 6 Tage, transiente ME hier über 4 Tage. Danach erhielten die Gruppen bis Tag 12 keine weitere GE. Gezeigt sind MW±SD; *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005; n=3.

Persistente GE zeigte einen Trend zu niedrigeren Proteinmengen im Vergleich zu den nicht-exponierten Kontrollen, was mit der geringeren Körpergröße und Länge vereinbar ist (Abb. 23).

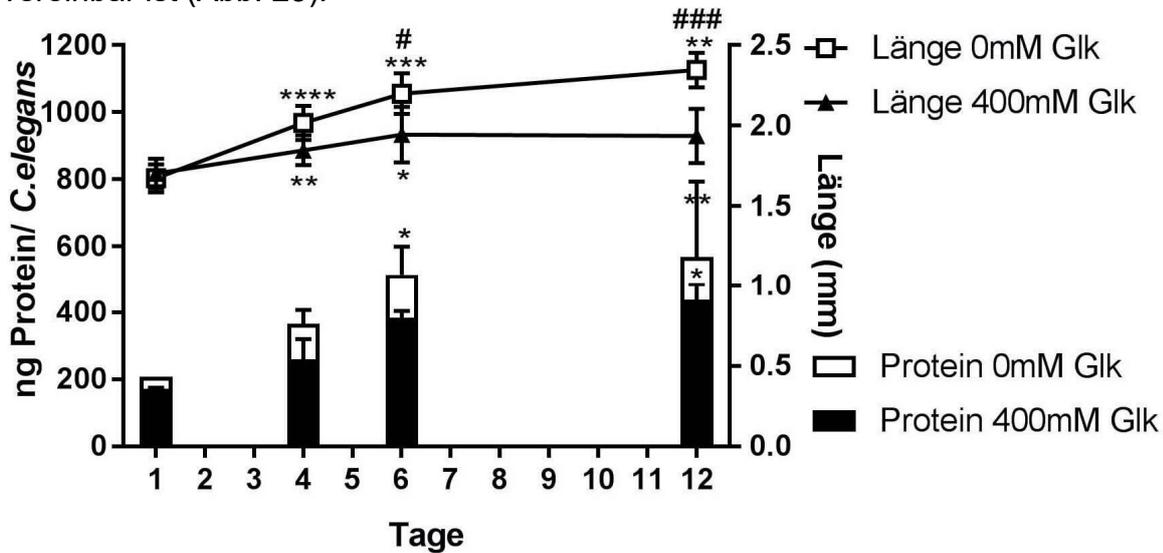


Abb. 23: Länge und Proteinmenge der Nematoden unter persistenter 400mM GE im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle. Gezeigt sind $MW \pm SD$; longitudinaler Vergleich * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$; horizontaler Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander am jeweiligen Zeitpunkt # $p < 0,05$, ### $p < 0,0005$; Länge $n = 4$, Proteinmenge $n = 3$.

3.2.5 Transiente Glukose-Exposition verlängert die Lebensspanne

Persistente 400mM GE hatte keinen Effekt auf die Lebensspanne der Nematoden im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle (Abb. 24(A), Tab. 2).

Transiente 400mM GE erreichte nach allen Expositionszeiten (1, 4 und 6 Tage) eine Verlängerung der mittleren Lebensspanne von mindestens 27 % (Abb. 24(B), Tab. 2(A)). Somit wird ein anhaltender, protektiver Einfluss transientser GE auf die Lebensspanne deutlich, der durch persistente GE nicht erreicht werden kann. Diese Beobachtung deutet erneut auf protektive Mechanismen eines metabolischen Gedächtnisses hin.

Um einen potentiellen Einfluss von osmotischem Stress durch die Hypertonizität der Glukose auf den Metabolismus der Nematoden zu analysieren, wurde die Auswirkung von persistenter und transientser ME auf die Lebensspanne beobachtet. Transiente 400mM ME über 4 Tage verlängerte die mittlere Lebensspanne um 26 % vergleichbar mit der Verlängerung durch transiente GE (Abb. 24(C), Tab. 2). Persistente ME hatte den größten Einfluss aller Interventionen auf die Verlängerung der Lebensspanne von 36 %. Somit ist der Einfluss persistenter GE auf die Lebensspanne nicht durch osmotischen Stress erklärbar und am ehesten glukose-spezifisch.

Exposition	Dauer (Tage)	Lebensspanne MW±SD (Tage)	Steigerung (% von MW 0mM Glk)		n (Nematoden)
0mM Glk	persistent	16 ± 1,3			197
400mM Glk	persistent	17 ± 1,6	4	p=n.s.	196
400mM Glk	1	21 ± 2,4	27	**p<0,01	194
400mM Glk	4	22 ± 1,2	34	***p<0,001	197
400mM Glk	6	21 ± 1,4	26	**p<0,01	197
400mM Mntl	persistent	22 ± 1,9	36	***p<0,001	192
400mM Mntl	4	21 ± 1,3	26	**p<0,01	181

Tab. 2: Statistische Übersicht der Mittelwerte der Lebensspanne unter persistenter und transientser GE und ME im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle. Nematoden von denen im Verlauf des Experiments keine Daten über die Lebensspanne mehr erhoben werden konnten (in den Agar eingedrungen/vom Agar wegbewegt) wurden zensiert.

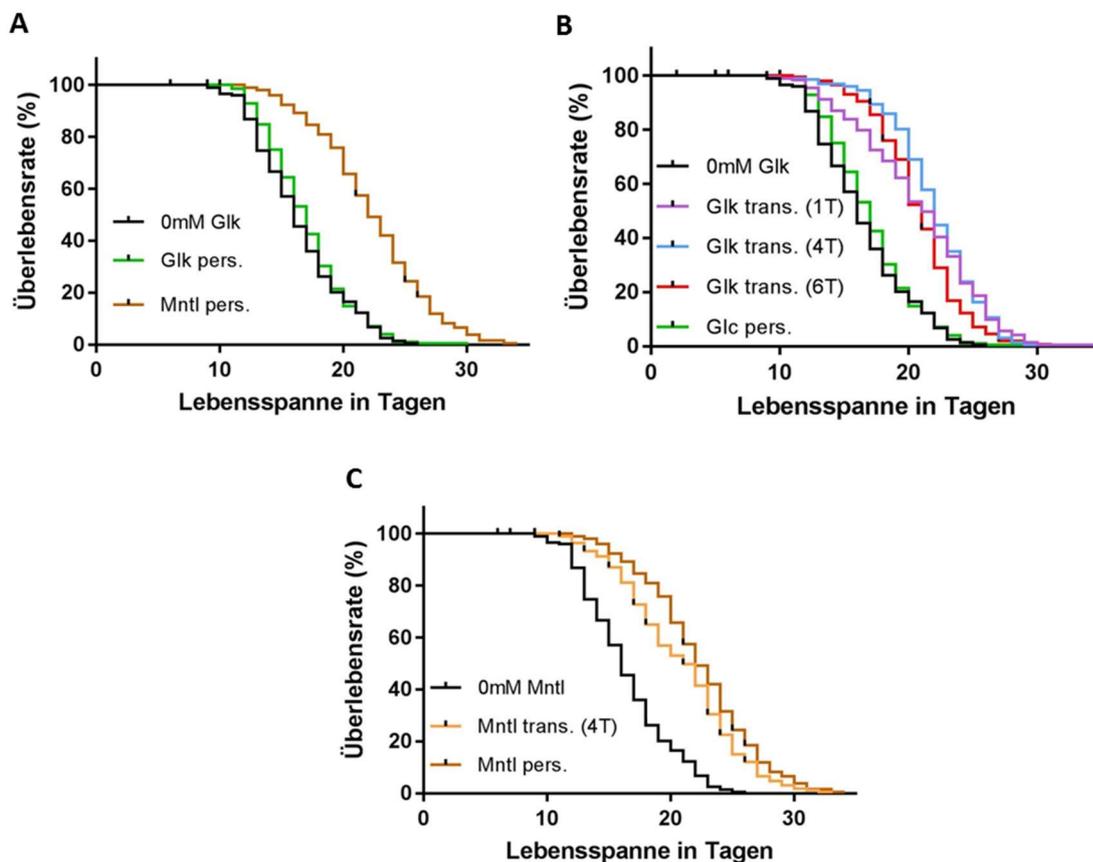


Abb. 24: Lebensspanne als Überlebensrate in Prozent unter 400mM persistenter GE und ME (A), sowie 400mM transiente GE über 1, 4 und 6 Tage (B) und transientser ME über 4 Tage im Vergleich zur jeweils persistenter Exposition (C). Alle Gruppen werden jeweils im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle dargestellt.

3.2.6 Transiente und persistente Glukose-Exposition induzieren vergleichbare Signalwege

Um auf Transkriptomebene durch persistente und transiente GE regulierte Signalwege zu charakterisieren, wurden nach 12 Tagen GE Microarrayanalysen der *C. elegans* durchgeführt. Hierbei konnten mittels „Gene Set Enrichment Analyse (GSEA)“ Signalwege identifiziert werden, die sowohl nach transienter als auch persistenter GE im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle gleichgerichtet reguliert waren und somit dem metabolischen Gedächtnis zugerechnet werden können (Abb. 25).

Unter den hochregulierten Stoffwechselwegen fand sich neben der oxidativen Phosphorylierung auch der Metabolismus verschiedener Aminosäuren. Proteine des Glutathionstoffwechsel, sowie weiterer Stoffwechselwege der Detoxifikation von Medikamenten und Xenobiotika zeigten sich ebenfalls induziert.

Die Expression ribosomaler Proteine (KEGG-Pathway „Ribosom“) war hochreguliert, wohingegen die Transkription und Reifung ribosomaler RNA (KEGG-Pathway „Ribosombiogenese“) herunterreguliert war. Des Weiteren sind auch die Endozytose, die Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum und die Axonregeneration durch transiente und persistente GE herunterreguliert. Ähnliche Signalwege in beiden Gruppen beinhalten herunterregulierte Komponenten des Insulinrezeptorsignalweges, wie PI3K/AKT-, Phosphatidylinositol*- und MAPK-Signalweg nach persistenter GE, sowie mTOR-, GPI-Anker*-, Inositolphosphatignalweg* (*zur Bereitstellung von Substraten für den PI3K/AKT-Signalweg) und nach transienter GE Gene des FoxO-Signalweges (Abb. 27+28). Diese Regulationen deuten auf eine Rolle von Stoffwechselwegen der Detoxifizierung, des Energiestoffwechsels wie der Proteinsynthese und des Insulinrezeptorsignalwegs im metabolischen Gedächtnis hin.

Arginin, Prolin, Alanin, Aspartat, und Glutamat gehören zu den glukogenen Aminosäuren. Arginin stellt neben Lysin die am stärksten von nicht-enzymatischer Glykosylierung betroffene Aminosäure in Proteinen dar. Cystein und Methionin sind an der Bildung funktioneller reaktiver Gruppen von Enzymen, wie Kinasen oder antioxidativen Enzymen beteiligt, u.a. im Glutathionmetabolismus, dessen Transkription hier ebenfalls hochreguliert ist. Unter der Bezeichnung „Ribosom“ finden sich ribosomale Proteine, deren Expression hier hochreguliert ist, wohingegen unter „Ribosombiogenese“ die Transkription und Reifung der ribosomalen RNAs zusammengefasst ist, dessen Expression herunterreguliert sind.

400mM Glk trans. + pers. vs. 0mM Glk		
Hochregulierte Stoffwechselwege	NES	
	Glk trans.	Glk pers.
cel03010: Ribosom	3,01	2,20
cel00190: Oxidative Phosphorylierung	1,94	3,27
cel00330: Arginin- und Prolinmetabolismus	1,83	2,34
cel00250: Alanin-, Aspartat- und Glutamatmetabolismus	1,75	1,72
cel00270: Zystein- und Methioninmetabolismus	1,69	1,78
cel00980: Metabolismus von Xenobiotika durch Zytochrom P450	1,61	1,59
cel00480: Glutathionmetabolismus	1,58	1,84
cel00982: Medikamentenmetabolismus	1,51	1,89

Herunterregulierte Stoffwechselwege	NES	
	Glk trans.	Glk pers.
cel04144: Endozytose	-2,61	-2,15
cel04141: Proteinprozessierung im Endoplasmatischem Retikulum	-2,56	-1,69
cel03008: Ribosombiogenese in Eukaryoten	-2,00	-1,53
cel04361: Axonregeneration	-1,54	-1,93

Abb. 25: GSEA mit Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) -Signalweganalyse und Sortierung der signifikant regulierten Signalwege nach „Normalized Enrichment Score (NES)“. Zusammengefasst sind hier in lila markiert überlappende Signalwege, dessen Genexpression durch persistente und transiente GE im Vergleich zu nicht-exponierten Kontrollen erhöht induziert wurde. Die Gruppengröße betrug n=6, dargestellt sind nur Signalwege mit adjustiertem $p < 0,05$.

3.2.7 Transiente und persistente Glukose-Exposition beeinflusst Gene der Glukoneogenese und Glykolyse

Viele Enzyme der im vorigen Kapitel durch GE regulierten Signalwege können Reaktionen in beide Richtungen katalysieren und somit differentielle Auswirkungen auf den Stoffwechsel haben. Um relevant regulierte Stoffwechselwege zu identifizieren, wurde als nächstes die Expression spezifischer Gensets untersucht. In der GSEA werden die Glykolyse und Glukoneogenese als ein KEGG-Signalweg zusammengefasst. Durch Untersuchung von Schlüsselenzymen beider Stoffwechselwege konnte durch persistente GE eine Hochregulation der Genexpression von glukoneogenetischen Enzymen wie der Pyruvatcarboxylase (FC 1,27; nom. $p < 0,05$), Phosphoenolpyruvat(PEP)-Carboxykinase (FC 1,43; adj. $p < 0,05$) und Glukose-6-Phosphatase (FC 1,37; adj. $p < 0,05$) sowie eine Herunterregulation der Phosphofruktokinase-1 (FC 0,83; nom. $p < 0,05$) in der Glykolyse im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle gesehen werden, wobei die Pyruvatcarboxylase und Phosphofruktokinase-1 nicht mehr signifikant reguliert waren (Abb. 26(A)).

Nach transientser GE konnte eine stark erniedrigte Genexpression der Hexokinase (FC 0,6; adj. $p < 0,05$) beobachtet werden im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle (Abb. 31(B)). Spezifische Enzyme des Fettstoffwechsels konnten keine eindeutige Regulation in Richtung Abbau oder Synthese zeigen (nicht dargestellt). Die anhaltende Herunterregulation der Hexokinase deutet auf eine verminderte Expression als Mechanismus des metabolischen Gedächtnisses hin und somit einen Einfluss auf die Glykolyse. Persistente GE induziert dagegen vorwiegend glukoneogenetische Enzyme, was auf einen intrazellulären Glukosemangel hindeuten könnte. Weiterhin werden hier nur transkriptomische Daten ohne Kenntnis der folgenden Proteinsynthese dargestellt, die Hinweise aber keine Beweise für die Regulation des Proteoms geben können.

			400mM Glk pers. vs. 0mM Glk		
			FC	nom. P-Wert	adj. P-Wert
A Glykolyse	Enzymname	Gen			
	Hexokinase	hxc-1	0,99	0,92	0,97
	Phosphofruktokinase-1	pfk-1.1	0,83	0,03	0,23
	Pyruvatkinase	pyk-1	1,25	0,06	0,30
Glukoneogenese	Pyruvat-Carboxylase	pyc-1	1,27	0,01	0,13
	PEP-Carboxykinase	pck-2	1,43	0,01	0,01
	Fruktose-1,6-Bisphosphatase	fbp-1	1,08	0,35	0,68
	Glukose-6-Phosphatase	gspd-1	1,37	0,01	0,01

			400mM Glk trans. vs. 0mM Glk		
			FC	nom. P-Wert	adj. P-Wert
B Glykolyse	Enzymname	Gen			
	Hexokinase	hxc-1	0,60	0,01	0,02
	Phosphofruktokinase-1	pfk-1.1	0,89	0,15	0,47
	Pyruvatkinase	pyk-1	0,94	0,58	0,83
Glukoneogenese	Pyruvat-Carboxylase	pyc-1	1,03	0,76	0,91
	PEP-Carboxykinase	pck-2	1,00	0,97	0,99
	Fruktose-1,6-Bisphosphatase	fbp-1	1,07	0,44	0,74
	Glukose-6-Phosphatase	gspd-1	1,00	1,00	1,00

Abb. 26: Genexpression von Schlüsselenzymen der Glykolyse und Glukoneogenese nach persistenter GE (A) und transienter GE (B) im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle. Mehrere Gene der Glukoneogenese sind nach persistenter, aber nicht transienter GE hochreguliert. P-Werte >0,05 sind zur Übersichtlichkeit in grau markiert. FC = Fold Change, nom. = nominal, adj. = adjustiert. Gezeigt ist der MW, n=6.

3.2.8 Transiente und persistente Glukose-Exposition induziert differentielle Regulation von Signalwegen

Unter den differentiell regulierten Stoffwechselwegen konnten unter persistenter GE überwiegend hochregulierte (Abb. 27) und unter transienter GE herunterregulierte (Abb. 28) Signalwege identifiziert werden. Persistente GE konnte im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle vor allem Gene des Glukosestoffwechsels wie der Glykolyse/ Glukoneogenese, aber auch des Lipidstoffwechsels wie der Elongation von Fettsäuren und des Fettsäuremetabolismus, sowie gemeinsam genutzter Stoffwechselwege wie des Zitratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung induzieren. Eine zusätzliche Auswertung der differentiell regulierten Gene mittels der Software „Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8“ zur funktionellen Annotation von Genen zeigte ein deutliches Überwiegen der Genexpression der Fettsäuresynthese mit einem „Fold Enrichment Score“ von 27 im Vergleich zur nicht-exponierten Gruppe. Abbau und Metabolismus der Fettsäuren waren hier in geringerem Ausmaß mit einem „Fold Enrichment Score“ von jeweils 12 hochreguliert (Anhang Tab. 1). Der „Fold Enrichment Score“ unterliegt hierbei einer anderen Berechnungsgrundlage als der für die GSEA berechnete „Normalized Enrichment Score“, dient aber ebenfalls zur Quantifizierung der Regulation der Genexpression der KEGG-Signalwege. Die DAVID-Signalweganalyse wurde ausgehend von den signifikant regulierten Genen berechnet, wohingegen sich die hier hauptsächlich verwendete GSEA auf Daten aller Gene stützte und damit aussagekräftiger ist. Neben der erhöhten Genexpression des Metabolismus verzweigtkettiger Aminosäuren, konnte die Genexpression des Metabolismus aller restlichen Aminosäuren in der GSEA den glukogenen Aminosäuren zugeordnet werden (Abb. 27+28). Abbauvorgänge wie das Proteasom und Peroxisom zeigten sich auf Transkriptionsebene hochreguliert, das Phagosom allerdings herunterreguliert. Transiente GE führte zu einer Herunterregulation der Genexpression multipler Signalwege involviert in Reparaturmechanismen und dem Nukleotidstoffwechsel. Außerdem zeigte sich eine reduzierte Expression von Genen der RNA-Kontrolle außer der t-RNA Synthese, die hochreguliert waren. Gene von Abbaumechanismen zeigten sich überwiegend herunterreguliert wie beim Proteasom und RNA-Abbau außer die des Lysosoms, welche hochreguliert waren. Des Weiteren war die Transkription mehrerer Signalwege, die die Glykansynthese betreffen, herunterreguliert.

Die Ergebnisse geben Hinweise auf die Beteiligung differentiell regulierter, bisher nicht beschriebener Mechanismen nach persistenter und transienter GE. Ein quantitativer Überblick über die Genregulation der einzelnen Versuchsgruppen ist im Anhang (Anhang Abb.1+2) dargestellt. Diese Arbeit ist auf die Identifizierung von Signalwegen zur Hypothesengenerierung und Untersuchung spezifischer Gensets begrenzt.

400mM Glk pers. vs. 0mM Glk		
Rang	Hochregulierte Stoffwechselwege	NES
1	cel00190: Oxidative Phosphorylierung	3,27
2	cel01200: Kohlenstoffmetabolismus	2,83
3	cel00620: Pyruvatmetabolismus	2,62
4	cel00010: Glykolyse, Glukoneogenese	2,61
5	cel01230: Biosynthese von Aminosäuren	2,56
6	cel00630: Glyoxylat- und Dikarboxylatmetabolismus	2,53
7	cel00020: Zitratzyklus	2,39
8	cel00330: Arginin- und Prolinmetabolismus	2,34
9	cel01100: Metabolische Signalwege	2,32
10	cel03010: Ribosom	2,20
11	cel01210: 2-Oxokarbonsäuremetabolismus	2,12
12	cel00500: Stärke- und Sukrosemetabolismus	1,97
13	cel03050: Proteasom	1,91
14	cel00480: Glutathionmetabolismus	1,89
15	cel00280: Valin-, Leucin- und Isoleucinabbau	1,89
16	cel00380: Tryptophanmetabolismus	1,86
17	cel00980: Metabolismus von Xenobiotika durch Zytochrom P450	1,84
18	cel00982: Medikamentenmetabolismus	1,78
19	cel00062: Elongation von Fettsäuren	1,78
20	cel00250: Alanin-, Aspartat- und Glutamatmetabolismus	1,72
21	cel00071: Fettsäureabbau	1,70
22	cel01212: Fettsäuremetabolismus	1,69
23	cel04146: Peroxisom	1,68
24	cel00260: Glycin-, Serin- und Threoninmetabolismus	1,63
25	cel00270: Zystein- und Methioninmetabolismus	1,59
26	cel00561: Glycerolipidmetabolismus	1,59
27	cel03040: Spliceosom	1,57

Rang	Herunterregulierte Stoffwechselwege	NES
1	cel04144: Endozytose	-2,15
2	cel04361: Axonregeneration	-1,93
3	cel04010: MAPK-Signalweg	-1,90
4	cel04141: Proteinprozessierung im Endoplasmatischen Retikulum	-1,69
5	cel04145: Phagosom	-1,67
6	cel04070: Phosphatidylinositol-Signalweg	-1,57
7	cel03008: Ribosombiogenese in Eukaryoten	-1,53

Abb. 27: GSEA mit Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) -Signalweganalyse und Sortierung der signifikant regulierten Signalwege nach „Normalized Enrichment Score (NES)“. Persistente GE über 12 Tage im Vergleich zu nicht-exponierten Kontrollen. Hochregulierte Signalwege sind in rot markiert, herunterregulierte in grün. Die überlappenden Signalwege nach transients und persistenter GE, die in Abb. 30 zusammengefasst dargestellt werden, sind in lila markiert. Die Gruppengröße betrug n=6, dargestellt sind nur Signalwege mit adjustiertem $p < 0,05$.

400mM Glk trans. vs. 0mM Glk		
Rang	Hochregulierte Stoffwechselwege	NES
1	cel03010: Ribosom	3,01
2	cel00190: Oxidative Phosphorylierung	1,94
3	cel00330: Arginin- und Prolinmetabolismus	1,83
4	cel00250: Alanin-, Aspartat- und Glutamatmetabolismus	1,75
5	cel00982: Medikamentenmetabolismus	1,69
6	cel04142: Lysosom	1,62
7	cel00270: Zystein- und Methioninmetabolismus	1,61
8	cel04020: Kalziumsignalweg	1,60
9	cel00980: Metabolismus von Xenobiotika durch Zytochrom P450	1,58
10	cel00480: Glutathionmetabolismus	1,51
11	cel00970: Aminoacyl-tRNA Biosynthese	1,47

Rang	Herunterregulierte Stoffwechselwege	NES
1	cel04144: Endozytose	-2,61
2	cel04141: Proteinprozessierung im Endoplasmatischem Retikulum	-2,56
3	cel04150: mTOR-Signalweg	-2,53
4	cel03018: RNA-Abbau	-2,49
5	cel03410: Basen-Exzisionsreparatur	-2,36
6	cel03013: RNA-Transport	-2,35
7	cel00563: Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankerbiosynthese	-2,28
8	cel00510: N- Glykanbiosynthese	-2,27
9	cel03430: Mismatch-Reparatur	-2,21
10	cel03050: Proteasom	-2,19
11	cel03440: Homologe Rekombination	-2,17
12	cel03030: DNA-Replikation	-2,04
13	cel03460: Fanconi Anämie Signalweg	-2,03
14	cel03420: Nukleotid-Exzisionsreparatur	-2,01
15	cel03008: Ribosombiogenese in Eukaryoten	-2,00
16	cel03015: mRNA Kontrollsignalweg	-1,99
17	cel00514: Andere Arten der O- Glykanbiosynthese	-1,98
18	cel00513: Verschiedene Arten der N-Glykanbiosynthese	-1,81
19	cel04120: Ubiquitin-medierte Proteolyse	-1,79
20	cel04330: Notch- Signalweg	-1,77
21	cel03020: RNA-Polymerase	-1,74
22	cel03022: Basale Transkriptionsfaktoren	-1,67
23	cel00562: Inositolphosphatmetabolismus	-1,63
24	cel04068: FoxO- Signalweg	-1,63
25	cel00520: Amino- und Nukleotidekohlenhydratmetabolismus	-1,58
26	cel04361: Axonregeneration	-1,54
27	cel01100: Metabolische Signalwege	-1,21

Abb. 28: GSEA mit Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) -Signalweganalyse und Sortierung der signifikant regulierten Signalwege nach „Normalized Enrichment Score (NES)“. Transiente GE über 4 Tage und weiterer Kultur ohne GE bis Tag 12 im Vergleich zu nicht-exponierten Kontrollen. Hochregulierte Signalwege sind in rot markiert, herunterregulierte in grün. Die überlappenden Signalwege, die in Abb. 30 zusammengefasst dargestellt werden, sind in lila markiert. Die Gruppengröße betrug n=6, dargestellt sind nur Signalwege mit adjustiertem p<0,05.

3.2.9 Glukose-Exposition führt nicht zur Erhöhung von intrazellulärer Glukose

Aufgrund der unerwarteten protektiven Auswirkungen von GE wurde hier die Glukosekonzentration intrazellulär ($c_{iz}(\text{Glk})$) über den Versuchszeitraum nach 1, 4, 6 und 12 Tagen persistenter GE gemessen um zu untersuchen ob und wie viel Glukose die Nematoden unter diesen Bedingungen aufgenommen haben (Abb. 29; $n=3$).

Nach den für die meisten Experimente gewählten GE-Bedingungen (400mM) zeigte sich keine Erhöhung der $c_{iz}(\text{Glk})$ im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle (Abb. 29(A)). Im zeitlichen Verlauf konnte nach 6 Tagen ein Anstieg der $c_{iz}(\text{Glk})$ sowohl nach GE als auch der nicht-exponierten Kontrolle beobachtet werden (Tag 1 vs. 6; 400mM und 0mM Glk; $p<0,05$). Am letzten Messzeitpunkt nach 12 Tagen fiel die $c_{iz}(\text{Glk})$ in beiden Gruppen wieder fast auf das Ausgangsniveau an Tag 1 ab (Tag 6 vs. 12; 400mM Glk ns; 0mM Glk $p<0,05$).

Um die Entwicklung der $c_{iz}(\text{Glk})$ unter GE besser zu verstehen, wurden die Nematoden unterschiedlich hohen Glukosekonzentrationen exponiert um eine Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Effekte zu untersuchen (Abb. 29(B); $n=3$).

Die $c_{iz}(\text{Glk})$ verhielt sich gegensätzlich zur Höhe der Konzentration der GE und zeigte so unter steigenden Konzentrationen einen Trend zur weiteren Abnahme. Die zeitliche Entwicklung der $c_{iz}(\text{Glk})$ verhielt sich unter 200mM und 600mM Glukosebehandlung vergleichbar wie unter Behandlung mit 400mM Glukose, allerdings erreichte die $c_{iz}(\text{Glk})$ nach 12 Tagen Behandlung mit 200mM Glukose vergleichbare Werte wie die nicht-exponierte Kontrollgruppe.

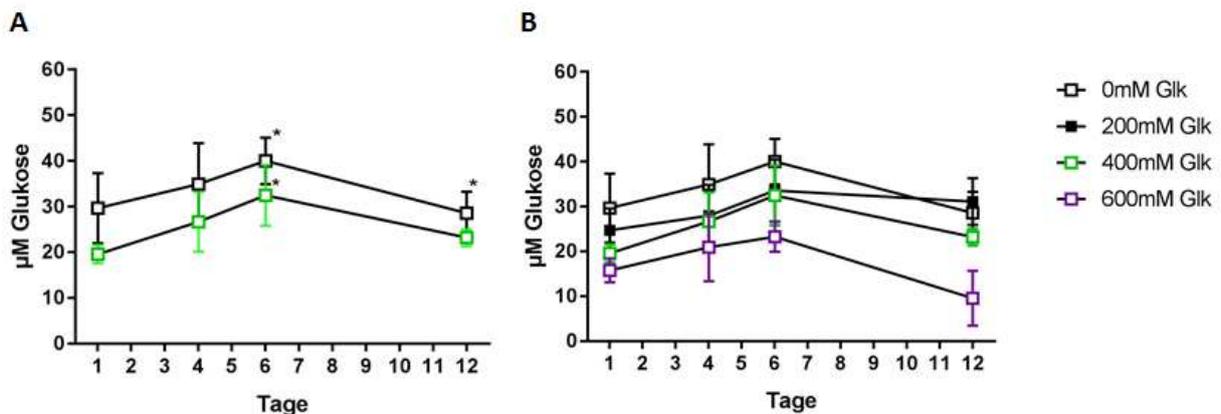


Abb. 29: Zeitlicher Verlauf der $c_{iz}(\text{Glk})$ unter (A) persistenter 400mM GE im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (weiße Quadrate) und unter (B) persistenter GE (200, 400, 600mM); * $p<0,05$, $n=3$, gezeigt sind $\text{MW}\pm\text{SD}$. Es zeigt sich keine Erhöhung der $c_{iz}(\text{Glk})$ unter persistenter GE und eine Zunahme der $c_{iz}(\text{Glk})$ über die Versuchsdauer, welche am letzten Messzeitpunkt wieder abnimmt.

Aufgrund der Verringerung der Körpergröße, Länge und Proteinmenge (3.2.4) durch hier verwendete GE-Bedingungen und andererseits dem Anstieg dieser Parameter im physiologischen Wachstum des Nematoden (ebenfalls 3.2.4) wurde neben der absoluten $c_{iz}(\text{Glk})$ auch die relative $c_{iz}(\text{Glk})$ in Abhängigkeit von Proteinmenge über den Versuchszeitraum untersucht (Abb. 30; $n=3$).

Auf die Proteinmenge bezogen unterschied sich die $c_{iz}(\text{Glk})$ nach GE nicht von der nicht-exponierten Kontrolle. In beiden Gruppen nahm die $c_{iz}(\text{Glk})$ über den Versuchszeitraum ab. Somit kann sowohl absolut, als auch relativiert auf die Proteinmenge keine Zunahme der $c_{iz}(\text{Glk})$ unter 400mM GE über den Versuchszeitraum beobachtet werden.

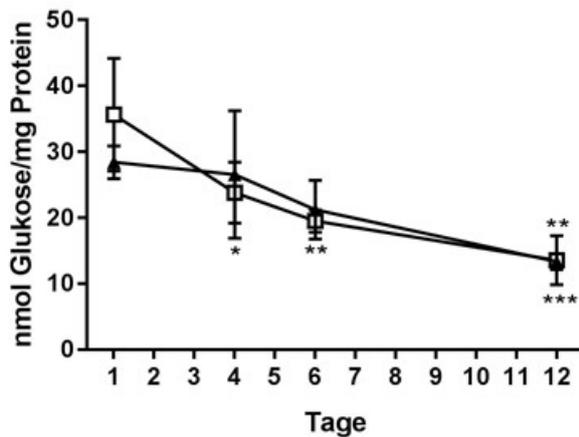


Abb. 30: Zeitlicher Verlauf der $c_{iz}(\text{Glk})$ bezogen auf die Proteinmenge unter persistenter 400mM GE (schwarze Dreiecke) im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle (weiße Quadrate), $n=3$, gezeigt sind $\text{MW} \pm \text{SD}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Bezogen auf die Proteinmenge unterscheidet sich die $c_{iz}(\text{Glk})$ nicht nach GE und nicht-exponierter Kontrolle. Über die Versuchsdauer sinkt die $c_{iz}(\text{Glk})$ bezogen auf die Proteinmenge in beiden Gruppen ab.

Um zu untersuchen, ob die fehlende Erhöhung der $c_{iz}(\text{Glk})$ durch eine Reduktion der im Versuchagar enthaltenen Glukose durch Metabolisation der Nematoden bedingt war, wurde die Glukosekonzentration in Agarproben über den Versuchszeitraum bestimmt.

Die Glukosekonzentration der mit 400mM Glukose angesetzten Agarproben zeigte nach 4 sowie 12 Tagen Kultivierung mit *E. coli* und adulten Nematoden keinen Unterschied im Vergleich zur Konzentration vor Einsatz im Versuch (Abb. 31(A)). Zum Vergleich konnten im Kontrollagar ohne Glukose an diesen Zeitpunkten nur sehr geringe Glukosekonzentrationen gemessen werden, die durch geringe Spaltung des ansonsten inerten Polysaccharids Agarose erklärt werden könnte (Abb. 31)⁸⁶.

Die osmotischen Kontrollgruppen wurden auf Agarplatten mit 400mM Mannitol kultiviert und $c_{iz}(\text{Glk})$ ebenfalls bestimmt. Vor Versuchsbeginn konnten geringe Mengen Glukose in den Mannitol-Agarproben gemessen werden, die am Ende des Versuchs einen abnehmenden Trend zeigten (Abb. 31). Die Ausgangsglukosekonzentration war hier allerdings sehr gering (ca. 10.000-fach geringer als die Konzentration der GE und 5-fach höher als im Kontrollagar) und die Streuung zwischen den Agarproben sehr hoch, sodass diese geringe Verstoffwechselung wahrscheinlich zu vernachlässigen ist. Auch im Kontrollagar auf den die Nematoden nach transientser GE nach 4 Tagen überführt wurden, zeigte sich erwartungsgemäß eine geringe mit dem Kontrollagar vergleichbare Glukosekonzentration (Abb. 31).

Die fehlende Erhöhung der $c_{iz}(\text{Glk})$ durch GE kann somit nicht durch zu geringe Glukosemengen im Agar durch Metabolisation der Nematoden erklärt werden und die Ursache bleibt weiterhin unbekannt.

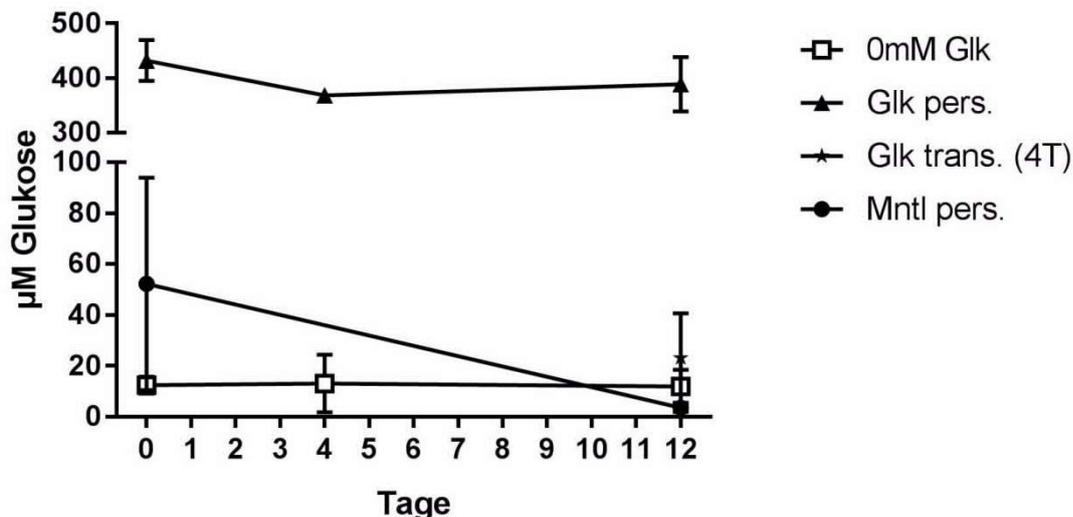


Abb. 31: Die Glukosekonzentration des Versuchagars ändert sich nicht über die Versuchsdauer, $n=3$, $MW \pm SD$. Nach persistenter 400mM GE (schwarze Dreiecke), Kontrollagar ohne Glukose (weiße Quadrate), nach persistenter 400mM ME (schwarze Kreise) und transientser 400mM GE über 4 Tage und anschließendem Transfer der Nematoden auf Kontrollagar ohne Glukose für 8 Tage bis zum Ende des Versuches (schwarzer Stern).

4 DISKUSSION

Transiente hohe GE konnte in *C. elegans* anhaltende überwiegend protektive Veränderungen im Sinne eines metabolischen Gedächtnisses induzieren. Aufgrund ausbleibender Bildung von AGEs nach transienter hoher GE sprechen diese Veränderungen für bisher nicht bekannte Mechanismen eines AGE-unabhängigen metabolischen Gedächtnisses auch mit Beteiligung protektiver Mechanismen. Verändert zeigten sich die ROS-Bildung respektive Induktion antioxidativer Enzyme (*gst-4*), die Motilität und die Lebensspanne sowie anhaltend das Transkriptom verschiedener Stoffwechsel- und Signalwege und Reduktion der Wachstumsrate über die Exposition hinaus. Transiente und persistente GE hatten nur teilweise den gleichen Einfluss auf die untersuchten Parameter. Diese Beobachtung könnte auf die fehlende AGE Bildung durch transiente GE zurückzuführen sein, die nach persistenter GE vermehrt gebildet werden. Durch Mitohormese könnten die geringen Mengen des gebildeten ROS nach transienter GE die Aktivität von Detoxifikationssystemen und weiteren Kompensationsmechanismen für reaktive AGE-Vorläufer wie Methylglyoxal und vermehrten ROS selbst vermehrt induzieren und somit protektiv der AGE-Bildung entgegenwirken.

4.1 AGE-Bildung durch persistente, aber nicht durch transiente Glukose-Exposition

„Advanced glycation endproducts“ sind eine heterogene Gruppe glykosylierter zellulärer Bestandteile, hauptsächlich Proteine, die sich häufig unabhängig von der Höhe der Blutglukosespiegel bilden und als bekannter Mechanismus des metabolischen Gedächtnisses zur Progression diabetischer Komplikationen beitragen.

Persistente GE über 12 Tage führte in diesem Modell zur Erhöhung von FL, AP und MG-H1, wohingegen transiente GE am Ende des Versuchs nach 12 Tagen keinen Einfluss auf Amadori-Produkte, Ketoamine, MG-Addukte oder Glukoxidation zeigen konnte. Auch kürzere persistente GE über 1, 4 oder 6 Tage konnten bei Messung direkt nach Exposition keine Erhöhung dieser AGEs zeigen. Auf die Bildung weiterer untersuchter AGEs, wie G-H1, CML und CEL konnte kein Einfluss von transienter oder persistenter GE nachgewiesen werden. Die Auswirkungen transienter GE auf andere Parameter in diesem Modell sind demnach AGE-unabhängig und unterliegen anderen Mechanismen.

Interessanterweise induzierte persistente GE ein AGE-Cluster, das die labilen, kurzlebigen AGEs, wie MG-H1 und reversible Amadori-Produkte wie FL beinhaltet. Labile AGEs gehören zu den eher früh gebildeten AGEs und können häufig besser als freie AGEs im Plasma oder Urin nachgewiesen werden²⁰. Die fehlende Bildung von AGEs und FL unter transienter GE deutet auf die Abbildung eher früher Mechanismen diabetischer Komplikationen in diesem Modell hin und die Eignung zur Erforschung AGE-unabhängiger Mechanismen, die zur Progression diabetischer Komplikationen führen.

Dieses Modell kann Anwendung zur Abgrenzung AGE-abhängiger (persistente GE) und unabhängiger (transiente GE) Mechanismen finden.

4.2 Transiente und persistente Glukose-Exposition induziert antioxidative Mechanismen

ROS entsteht vermehrt im diabetischen Stoffwechsel, trägt zur Entstehung mitochondrialer Dysfunktion bei, kann aber auch eine protektive Signalfunktion durch Induktion antioxidativer Mechanismen einnehmen. Einerseits kann ROS selbst quantifiziert werden oder die indirekte Auswirkung auf den Organismus durch Bestimmung antioxidativer Kompensationsmechanismen untersucht werden. Persistente GE zeigte in diesem Modell einen Trend zu erhöhter Bildung von mitochondrialem ROS wie durch mitochondrienspezifische Anfärbung mittels DHE gezeigt werden konnte. Um einen besseren Einblick in den Redoxstatus von *C. elegans* zu bekommen, wurde ein transgener Reporterstamm für ROS eingesetzt, in dem persistente als auch transiente GE eine Induktion der Glutathion-S-Transferase 4 (*gst-4*), einem hauptsächlich zytoplasmatisch vorkommenden antioxidativem Enzym, zeigen konnten. Diese Ergebnisse weisen auf eine Signalrolle des ROS zur Induktion detoxifizierender Systeme hin. Am Versuchsende sank in allen Versuchsgruppen einschließlich nicht-exponierter Kontrolle die Induktion von *gst-4* ab, was auf eine zeitabhängige Erschöpfung der antioxidativen Kapazität hindeuten könnte.

Im Alterungsprozess konnte eine Störung der adaptiven Induktion von antioxidativen Mechanismen wie dem Nrf-2 Signalweg durch ROS beobachtet werden, sowie niedrigere Basalwerte von Antioxidantien in verschiedenen Organismen⁸⁷. SKN-1, das Ortholog des Transkriptionsfaktors Nrf-2 in *C. elegans*, induziert die Expression antioxidativer Enzyme wie Superoxiddismutasen und Glutathion-S-Transferasen⁸⁸. In dieser Arbeit wurde in dem verwendeten Reporterstamm die Expression der GFP-koexprimierten Glutathion-S-Transferase-4 zur Quantifizierung des ROS gemessen, weshalb sich die Abnahme dieses Signals am Ehesten durch die beschriebene Erschöpfung des Nrf-2 Signalweges im Alterungsprozess erklären lässt.

Nach transientser GE kann bis zum Ende des Experimentes eine erhöhte Induktion der *gst-4* detektiert werden, die nicht durch die Halbwertszeit des GFP von nur 26 Stunden⁸⁹ erklärt werden kann. Dies spricht für eine anhaltende Glukose-unabhängige Induktion antioxidativer Enzyme nach transientser GE, was in diesem Modell für einen frühen Mechanismus des metabolischen Gedächtnisses spricht, am ehesten im Rahmen einer Mitohormese. Unsere eigenen Daten zeigen, dass auf Transkriptionsebene die Genexpression von Proteinen mehrerer Signalwege wie des Cystein-, Methionin-, Glutathion- und des Medikamentenmetabolismus, die vermehrt durch ROS abgebaut werden oder antioxidative Enzyme beinhalten, sowohl nach persistenter als auch transientser GE hochreguliert wird. Die Gene des FoxO-Signalweges werden hingegen nur nach transientser GE vermindert exprimiert. Der Transkriptionsfaktor „Forkhead-Box-Protein O (FoxO)“ und sein *C. elegans* Homolog *daf-16* induzieren die Expression antioxidativer Enzyme wie Superoxiddismutasen und Glutathion-S-Transferasen, was in *C. elegans* zu einer Lebensverlängerung führen konnte. *Daf-16* wird durch oxidativen Stress aktiviert, aber im Insulinrezeptorsignalweg durch Phosphorylierung inhibiert und nachfolgend abgebaut⁹⁰.

Unsere Daten zeigen mehrere herunterregulierte Signalwege des Insulinrezeptor-Signalwegs sowie eine verlängerte Lebensspanne nach transientser GE woraus sich Hinweise auf ein vermindertes Insulinrezeptor-Signaling im Rahmen einer Insulinresistenz in diesem Modell ergeben. Diese würde eine fehlende Hemmung von FoxO zur Folge haben, welcher vermindert abgebaut werden und eine verminderte Transkription trotz Aktivierung erklären könnte. Diese Ergebnisse sprechen für eine anhaltende Rolle des Redox-Status und antioxidativen Mechanismen im metabolischen Gedächtnis. Im Gegensatz zu bisher bekannten Mechanismen des metabolischen

Gedächtnisses ist die verminderte Expression des FoxO-Signalweges, sowie die Verlängerung der Lebensspanne nur nach transienter und nicht nach persistenter GE zu beobachten, was auf eine teilweise differentielle Regulation in Abhängigkeit der Expositionsdauer hinweist.

In der „Unifying hypothesis“ konnte die erhöhte Bildung von ROS durch Hyperglykämie durch Blockierung der mitochondrialen Atmungskette vollständig normalisiert werden¹⁹. Andere Studien konnten zeigen, dass zytoplasmatischer ROS in diabetischer Retinopathie dem mitochondrialen ROS vorhergehen und diesen auch induzieren kann³⁶. Die mitochondriale und auch zytoplasmatische Bildung von ROS sollte in weiterführenden Studien untersucht werden, da hier vorwiegend indirekte Kompensationsmechanismen untersucht wurden und auch die absolute Menge des ROS Hinweise zur Unterscheidung der ROS als protektiver oder schädigender Faktor geben kann.

4.3 Motilität und Wachstumsrate werden durch kurzfristige Glukose-Exposition reduziert wohingegen langfristige GE protektiv auf die Motilität wirkt

Mittels der Motilität von *C. elegans* können Aussagen über die neuronale Funktion sowie allgemeine Vitalität getroffen werden. In den nicht-exponierten Kontrollgruppen reduzierte sich die Motilität zum Versuchsende nach 12 Tagen, wohingegen persistente sowie transiente GE nach initialer Reduktion der Motilität keine weitere Reduktion mehr induzierte und so im Vergleich zu den nicht-exponierten Kontrollen zum Ende des Versuchs nach 12 Tagen eine verbesserte Motilität bewirkte. Eine Reduktion der Motilität im Alterungsprozess von *C. elegans* konnte bereits in vorherigen Studien beobachtet werden⁹¹. Hier zeigte sich ein Abfall der maximalen Bewegungsgeschwindigkeit von Tag 9 auf Tag 12 des Experimentes mit adulten Nematoden auf vergleichbare Werte zu unseren Beobachtungen in unbehandelten Kontrollgruppen. Diese Ergebnisse wurden als analog zu den Auswirkungen von Neuro- und Myodegeneration im humanen Alterungsprozess gedeutet. Weitere Studien konnten einen konstanten Abfall der Motilität bereits nach fünf Tagen zeigen⁹². Die anhaltende Regulation der Motilität durch transiente GE deutet auf einen protektiven Mechanismus des metabolischen Gedächtnisses hin.

Die Wachstumsrate unter GE sowohl gemessen an Zunahme von Protein als auch an Länge und Größe ist in diesem Modell im Vergleich zu den nicht-exponierten Kontrollen über den gesamten Versuchszeitraum reduziert, sowohl nach persistenter, als auch transienter GE (keine Daten für Protein) hinweisend auf einen anhaltenden Mechanismus des metabolischen Gedächtnisses. Die Transkriptomanalyse lieferte mehrere Hinweise auf einen intrazellulären Energiesubstratmangel, was die geringe Zunahme der Körpergröße, Länge und Proteinmenge erklären kann. Außerdem war die Genexpression des Cysteinestoffwechsels durch transiente und persistente GE gleichermaßen erhöht, was für ein vermehrtes Recycling von oxidierten Cysteinen sprechen könnte. Kumsta et al konnten in Arbeiten zum Redox-Status von *C. elegans* nach einmaliger Exposition von Wasserstoffperoxid eine erhöhte Oxidation von Cysteinen auf Proteinebene messen und funktionell eine Reduktion der Motilität, Fertilität, Wachstumsrate und ATP-Produktion feststellen⁹². Durch Peroxid-bedingte Oxidation Muskel-spezifischer Proteine und Enzyme, die für die ATP-Synthese benötigt werden, könnte die reduzierte Motilität erklärt werden. Zunächst zeigte sich wie auch in unseren Beobachtungen eine Reduktion der Motilität, die sich im Laufe des Versuchs wieder zurückbildete und im Vergleich zu nicht-exponierten Kontrollgruppen ebenfalls einen Vorteil zeigte⁹². Initial erhöhter ROS könnte somit einen Erklärungs-

ansatz für die anfängliche Reduktion der Motilität darstellen. Die Erhaltung der Motilität durch GE vor der altersbedingten Abnahme könnte so durch mitohormetische Mechanismen wie die vermehrte kompensatorische Synthese der Aminosäure Cystein bedingt sein, welche Teil vieler reaktiver Gruppen antioxidativer Enzyme darstellt. Somit stünde eine erhöhte antioxidative Kapazität dem im Alterungsprozess vermehrt anfallenden ROS zur besseren Detoxifizierung gegenüber. In unserer Studie wurde die Fertilität nicht quantifiziert, jedoch konnte während der Experimente eine deutlich erniedrigte Anzahl abgelegter Eier in allen GE-Gruppen beobachtet werden passend zu den Ergebnissen von Kumsta et al.

Im Gegensatz dazu zeigte sich nur nach transientser ME über 4 Tage, aber nicht persistenter ME eine Erhaltung der Motilität, wodurch die Protektion durch GE durch osmotische Mechanismen erklärt werden kann. Die unterschiedliche Regulation nach GE im Vergleich zu ME lässt aber einen zusätzlichen glukose-spezifischen Effekt vermuten.

Allgemeine Vitalität oder im klinischen Kontext Lebensqualität wird medizinisch als bedeutender Erfolgsparameter für Therapien evaluiert, aber stellt einen schwierig quantifizierbares und oft subjektives Konzept aus körperlichen, emotionalen, sozialen, spirituellen und finanziellen Faktoren dar, das tier- oder zellexperimentell schwierig zu modellieren ist⁹³. Lange Krankheitsfreiheit und niedrige Beeinträchtigung von Alltagsaktivität ist auch in der Behandlung mikrovaskulärer Komplikationen interessant, während bei den makrovaskulären Komplikationen durch kardiovaskuläre Prävention weiterhin ein großes therapeutisches Potential in der Lebensverlängerung liegt. Die Evaluation der Verwendung der Motilität in *C. elegans* als Surrogatparameter für Lebensqualität sollte in weiteren Studien evaluiert werden.

4.4 Die „Gene Set Enrichment Analyse“ identifiziert anhaltende Veränderung verschiedener Signalwege durch transiente GE

Mittels GSEA konnten multiple veränderte Stoffwechsel- und Signalwege identifiziert werden, die Hinweise auf zugrundeliegende Mechanismen eines metabolischen Gedächtnisses in *C. elegans* durch transiente GE geben. In Analogie zu bisher untersuchten Mechanismen des metabolischen Gedächtnisses zeigten sich Signalwege, die sowohl nach persistenter, als auch durch transientser GE gleichermaßen verändert waren. Diese deuten auf irreversible Veränderungen durch die initiale hohe Exposition hin, die durch Wegnahme des Glukose Stimulus nicht rückführbar sind. Zum anderen können auch unterschiedlich gerichtete Mechanismen gesehen werden, die hier nur durch transiente GE, aber nicht persistente GE induziert wurden, aber ebenfalls eine langanhaltende Regulation im Sinne eines metabolischen Gedächtnisses zeigen. Diese Veränderungen wurden bisher nicht im Kontext des metabolischen Gedächtnisses betrachtet.

Unter den gleichgerichtet veränderten Signalwegen sowohl nach transientser als auch persistenter GE zeigt sich eine erhöhte Genexpression des Glutathion- und Cystein-, sowie Medikamentenmetabolismus, was für eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität spricht. Zur Untersuchung der antioxidativen Antwort in diesem Modell wurde bereits in einem transgenen Reporterstamm die Induktion einer Glutathion-S-Transferase gemessen (Kap. 4.2). Dieses Enzym nimmt ebenfalls am Medikamentenmetabolismus teil, was hier über die Transkription hinaus für eine vermehrte Translation dieser Enzyme im Rahmen des metabolischen Gedächtnisses spricht.

Weiterhin konnte nach transientser und persistenter GE eine verminderte Genexpression von Signalwegen unterhalb des Insulinrezeptors wie im Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinase- und Phosphatidylinositol-Signalweg unter persistenter GE sowie

die verminderte Genexpression PI3K-enthaltender Signalwege wie dem Inositolphosphatmetabolismus und der Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker-Synthese und einem Trend zur reduzierten Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges unter transientser GE beobachtet werden. Diese Veränderung weist auf die Entwicklung einer teilweise anhaltenden Insulinresistenz hin im Sinne eines metabolischen Gedächtnisses. Nach transientser und persistenter GE konnte zudem eine verminderte Expression von Genen beobachtet werden, die in der Endozytose involviert sind. Insulinresistenz geht mit einer verminderten Rezeptordichte auf der Zellmembran einher⁶⁷. In Monozyten von Menschen mit T2D konnte ein vermindertes endozytotisches Recycling des Insulinrezeptors nachgewiesen werden, was einen Mechanismus der Insulinresistenz darstellt⁹⁴. Nach persistenter sowie transientser GE zeigt sich ebenfalls eine verminderte Induktion von Genen der Proteinprozessierung des endoplasmatischen Retikulums, was mit einem allgemein reduzierten Proteinrecycling in Verbindung stehen könnte. Ebenfalls gleichgerichtet verändert zeigte sich die Erhöhung der Genexpression des Metabolismus glukogener, sowie verzweigtkettiger Aminosäuren nach transientser, sowie persistenter GE. Beide Aminosäureklassen wurden vermehrt im Plasma nicht-insulinabhängiger Diabetiker gefunden und korrelierten mit dem Ausmaß der Insulinresistenz⁹⁵. In zwei langlebigen *C. elegans* Stämmen, dem insulinresistenten *daf-2* knockout und dem kalorienrestriktiven *eat-2* wurden in Transkriptomanalysen ebenfalls eine verstärkte Genexpression des Aminosäuremetabolismus mit Reduktion der Produktmenge in Metabolomanalysen gefunden. Als weitere Überschneidungen regulierter Signalwege mit dieser Studie konnte eine verminderte Genexpression in der Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum, sowie der Ubiquitin-medierten Proteolyse beobachtet werden. Die Autoren hielten deshalb die Verstoffwechslung von Aminosäuren als alternative Energiequelle als wahrscheinlichste Ursache⁹⁶, was in dieser Studie durch eine erhöhte Expression von Genen im Stoffwechsel glukoplastischer und verzweigtkettiger Aminosäuren unterstützt wird. Gene eines weiteren Energiestoffwechselweges, der oxidativen Phosphorylierung, werden ebenfalls in beiden Gruppen vermehrt exprimiert.

In dieser Arbeit deutet die durch persistente und transiente GE reduzierte Genexpression der Synthese ribosomaler RNA (rRNA) auf eine reduzierte Translation von Ribosomen hin, wohingegen die Genexpression ribosomaler Proteine (rProteine) erhöht ist. Überproduzierte rProteine können allerdings schnell abgebaut werden⁹⁷. Eine Entkoppelung von rProtein und rRNA Synthese wird als nukleolärer Stress bezeichnet und führt zu einer Hemmung des Zellwachstums. Knockdown von eIF3m, einem Initiator der Translation, in der Leber von Mäusen führte ebenfalls zu vermehrter Expression von rProteinen und verminderter Reifung von rRNA neben Veränderungen des Lipid-, Kohlenhydrat- und Aminosäuremetabolismus⁹⁸, was in diesem Modell aber durch die nicht veränderte Regulation des *C. elegans* Homologs *cif-1* nicht bestätigt werden konnte. Die Hemmung der Ribosomsynthese wurde als kompensatorischer Mechanismus im Alterungsprozess zur Verlängerung der Lebensspanne diskutiert⁹⁹. Peroxid-bedingte Oxidierung von Cysteinen in Thiolgruppen von ribosomalen Proteinen könnte in *C. elegans* eine reduzierte Translation und Energieeinsparung erklären⁹², was mit der Induktion von Genen im Stoffwechsel des Cysteins und antioxidativer Enzyme in dieser Studie einhergehen könnte. In einem *C. elegans* Knockout-Stamm für den Insulinrezeptor (*daf-2*) war der Proteinumsatz und die Translation reduziert⁹⁶. Diese Ergebnisse legen eine Korrelation der in dieser Studie nach GE beobachteten Reduktion der Proteinmenge und geringerer Wachstumsrate mit Mechanismen der Insulinresistenz nahe. Sowohl transiente als auch persistente GE zeigten eine verminderte Expression von Genen der Axonregeneration als möglicher Hinweis auf eine Neurodegeneration. Teil dieser Stoffwechselwege ist das

Enzym Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β), das zu zentraler Neurodegeneration führt und durch Insulinresistenz vermindert gehemmt wird¹⁰⁰. Eine vermehrte Aktivität der GSK3 β konnte in makrovaskulären Zellen nach transienter GE gemessen werden, die über eine Enzymkaskade eine anhaltende Glukose- und AGE-unabhängige Produktion von mitochondrialem ROS aufrecht erhält¹⁷.

Die Genexpression im FoxO-Signalweg zeigt sich nach transienter GE vermindert. Wie bereits im Abschnitt zum oxidativem Stress diskutiert, könnte dies trotzdem für eine Aktivierung von FoxO sprechen aufgrund eines verminderten Abbaus des Transkriptionsfaktors und somit kompensatorisch reduzierter Genexpression von FoxO. Nach transienter, aber nicht persistenter GE konnte eine Genexpression verschiedener Reparaturmechanismen beobachtet werden. Auch Gene des RNA-Abbaus wurden nach transienter GE vermindert exprimiert und könnten eine längere Stabilität bereits transkribierter RNA bedingen. rRNA Synthese nimmt ca. 60% der gesamten Transkriptionsaktivität ein⁹⁸. Transkription und Translation sind die energieintensivsten Stoffwechselvorgänge der Zelle, weshalb hier unter Substratmangel versucht werden könnte Energie einzusparen.

Die Genexpression von Signalwegen, die nur durch persistente, aber nicht transiente GE verändert werden, gibt einen weiteren Einblick in das Modell unabhängig von Mechanismen des metabolischen Gedächtnisses. Hier zeigten sich erneut Gene mehrerer Energiestoffwechselwege verändert wie der Synthese als auch dem Abbau von Fettsäuren, wobei die Synthese insgesamt überwiegt. Fehlende Energiesubstrate könnten eine partielle cAMP-medierte Lipolyse erklären, die zwar nicht durch die Insulinresistenz bedingt wird, aber durch Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER) induziert werden könnte. Partielle Beta-Oxidation von Fettsäuren konnte auch zur mitochondrialen Dysfunktion in der Insulinresistenz beitragen⁶⁷. Die Erhöhung der Genexpression des Zitratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung nach persistenter GE sprechen ebenfalls dafür.

Abhängig von der Einordnung der differentiell regulierten Gene in die KEGG-Signalwege können gegensätzliche Signalwege wie die Glykolyse und Glukoneogenese zusammen gruppiert werden oder die Induktion bestimmter Enzyme die Hoch- oder Herunterregulation verschiedener Signalwege bedingen. Durch die Genexpression von Schlüssel- und unidirektional wirkenden Enzymen der beiden Stoffwechselwege konnte hier ein Überwiegen der Glukoneogenese nach persistenter GE beobachtet werden. Nach transienter GE zeigte sich nur die Genexpression des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Glykolyse, der Hexokinase, stark vermindert. Die Genexpression der Hexokinase könnte zunächst bei erhöhter Glukoseaufnahme durch transiente GE vermehrt induziert worden sein und dann nach Kultivierung auf glukosefreiem Medium stark vermindert exprimiert werden.

Neben Mechanismen des metabolischen Gedächtnisses, die durch transiente und persistente GE gleichermaßen verändert waren, zeigen sich neuartige Mechanismen, die nur durch transiente, aber nicht persistente GE reguliert werden.

4.5 Einordnung Transkriptomdaten und alternative Mechanismen

Diese Transkriptomanalysen können Aussagen über die Genexpression geben, allerdings kann das Proteom und Metabolom aufgrund verschiedener zwischengeschalteter Mechanismen eine andere Regulation zeigen. RNA-Stabilität, posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Methylierungen, die die Aktivität und den Abbau von Enzymen und Proteinen beeinflussen, spielen eine zusätzliche Rolle. Durch zellulären Stress wie ROS oder Hypoxie wird eine temporäre Speicherung von mRNA in sogenannten „Stressgranula“ gewährleistet, die die mRNAs nach Transkription vor Abbau schützt sowie stabilisiert und nach Elimination des Stresses die mRNA zur Translation wieder freigibt, was Energie einspart und einen Erklärungsansatz für die reduzierte Induktion von Genen ribosomaler RNA-Neusynthese bei gleichzeitig erhöht induzierten Genen des Aminosäurestoffwechsels in diesem Modell darstellen könnte¹⁰¹. Methylglyoxal konnte bereits in retinalen Zelltypen eine Induktion von nukleären Stressgranula zeigen (M. Janssen, nicht publizierte Daten). Eine weitere Erklärung für die reduzierte ribosomale RNA Synthese könnte die epigenetische Modifikation H3K36me3 darstellen. Knockout der Methyltransferase *met-1* in *C. elegans* führte zu einer Reduktion von H3K36me3 des gesamten Genoms, einer verkürzten Lebensspanne und großen Unterschieden in der mRNA-Expression zwischen jungen und alten Nematoden im Sinne einer protektiven Rolle von H3K36me3 auf die Stabilisierung der Genexpression im Alterungsprozess¹⁰². In einem weiteren Projekt unserer Arbeitsgruppe konnte in Retinae eines STZ-Mausmodells nach 6 und 12 Wochen Diabetesdauer eine verstärkte Trimethylierung von Lysinen in Histon 3 gefunden werden, was einen Hinweis der Beteiligung dieser Modifikation an Mechanismen des metabolischen Gedächtnisses darstellt (M. Kolibabka, nicht publizierte Daten).

Die KEGG-Signalweganalysen untersuchen die Regulation der Gene eines gesamten Signalweges auf Basis der Regulation aller beteiligten Gene und nicht anhand einiger weniger signifikant regulierten Gene. Deshalb wurden hier nur exemplarisch spezifische Gensets betrachtet. Aufgrund der starken Regulation von ribosomalen Genen empfiehlt es sich hier in weiteren Studien die Auswirkungen auf Metabolom und Proteom zu untersuchen auch um die Rolle der weiteren regulierten Signalwege einordnen zu können.

4.6 Mitohormese – Lebensverlängerung durch transiente Glukose-Exposition

Transiente GE konnte in diesem Modell im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle sowie persistenter GE eine deutliche Verlängerung der Lebensspanne erreichen. Transkriptomdaten geben Hinweise auf eine Beteiligung des FoxO-Signalwegs nach transienter GE, dessen Aktivierung zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt und antioxidative Enzyme induziert. In *C. elegans* konnte in Insulinrezeptor (*daf-2*) Knockout-Stämmen eine Verdopplung der Lebensspanne beobachtet werden, die auf die vermehrte Aktivierung von FoxO (*daf-16*) zurückzuführen ist⁵¹. In diesem Modell konnten sowohl durch transiente, als auch persistente GE eine reduzierte Genexpression verschiedener Signalwege unter Kontrolle des Insulinrezeptors identifiziert werden, welche FoxO inaktivieren. Eine genauere Charakterisierung der unterschiedlichen regulierten Mechanismen sollte in weiteren Studien durchgeführt werden auch im Hinblick auf die Unterscheidung von verminderter Aktivierung des Insulinrezeptors und Insulinresistenz. Weitere eher protektive Veränderungen in diesem Modell werden sowohl in einer verstärkten Genexpression nach transienter als auch persistenter GE im Cystein-, Methionin- und Medikamentenmetabolismus reflektiert.

Diese sind am Stoffwechsel, als auch in der Transkription antioxidativer Enzyme direkt wie der Glutathion-S-Transferase 4 beteiligt, welche in weiteren Experimenten mit einem transgenen Reporterstamm als Marker für ROS eingesetzt wurde. Die protektiven Effekte transienter GE stehen in Übereinstimmung mit früherer Literatur. Transiente GE während der prä-adulten Phase konnte in früheren Studien eine Lebensverlängerung zeigen, während persistente GE in einer Lebensverkürzung resultierte³⁹. Unsere Daten zeigen einen protektiven Einfluss transienter GE auf die Lebensspanne, Motilität und antioxidative Kapazität in adulten *C. elegans*, die glukose-abhängig, aber AGE-unabhängig ist. Dadurch kann die Genese des ROS nicht durch bekannte Zyklen über AGE-Rezeptoren erklärt werden. In Zusammenschau mit der erhöhten antioxidativen Antwort entsprechen diese Daten einer Mitohormese. Als protektiver Mechanismus des metabolischen Gedächtnisses könnte initialer endogen produzierter ROS im Rahmen der Mitohormese eine Signalfunktion darstellen zur Steigerung der antioxidativen Kapazität. Unter späterem Glukoseentzug könnte diese Anpassung einen Überlebensvorteil bedeuten durch vermehrte Detoxifikation des im Alter stärker anfallenden ROS. Die unterschiedlichen Auswirkungen von persistenter und transienter GE deuten auf eine zunächst gesteigerte Kompensationsfähigkeit hin (transiente GE). Diese zeigt sich limitiert, was unter persistent anhaltendem oxidativem Stress (persistente GE) in keinem weiteren protektiven Einfluss auf die Lebensspanne im Vergleich zu nicht-exponierten Kontrollen führt. Bei zu langer Exposition des initialen Stressors dekompensiert das System durch Ausschöpfen der antioxidativen Kapazität und resultiert in einer Verkürzung oder wie in diesem Modell fehlenden Verlängerung der Lebensspanne (Abb. 34).

In der „Hyperfunction Theory of Aging“ führen initial protektive Mengen an ROS unter Dauereexposition des Stressors das System zur Dekompensation. Hierdurch könnte die Verkürzung der Lebensspanne bei persistenter GE in der Literatur zu interpretieren sein¹⁰³. Die in dieser Studie verwendeten sehr hohen Konzentrationen von Glukose könnten dahingegen protektiv im Sinne der Mitohormese wirken, was unter persistenter Exposition zwar in keiner Lebensverlängerung, trotzdem aber in einer Protektion der physiologischen Lebensspanne im Vergleich zu niedrigeren Glukosekonzentrationen resultieren könnte. Durch ausreichende Hochregulation antioxidativer Enzyme könnte der vermehrt anfallende ROS besser detoxifiziert werden. Wie in folgenden Kapiteln diskutiert, konnte zwar keine erhöhte intrazelluläre Glukosekonzentration in den Glukose-exponierten Gruppen nachgewiesen werden, was jedoch entweder in einer zur schnellen Verstoffwechslung der Glukose und nicht adäquaten Messmethode oder osmotischen Effekten liegen könnte.

In weiteren Studien konnte durch initiale Hemmung der Triosephosphatisomerase durch inhibitorische RNAs in *C. elegans* eine Lebensverlängerung nach anschließender Exposition mit dem Oxidans Diamid erreicht werden. Die vermehrte Umleitung glykolytischer Intermediate in den nicht-oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs und dadurch vermehrter Generierung des reduzierenden Kofaktors NADPH könnte laut Autoren eine Erklärung hierfür liefern. Hiermit könnte auch die erhöhte Stressresistenz durch transiente GE erklärt werden¹⁰⁴.

Des Weiteren wurde eine Lebensverlängerung durch frühen oxidativen Stress in *C. elegans* auch mit epigenetischen Mechanismen wie einer Reduktion von H3K4me3 in Zusammenhang gebracht, dessen Sensitivität auf ROS in HeLa-Zellen bestätigt wurde¹⁰⁵. Ebenfalls kann nicht ausgeschlossen werden, dass das verwendete Zytostatikum 5-Fluoro-2-Desoxyuridin, das die Sterilität adulter Würmer in den Versuchen sicherstellt, auch zu einer Verlängerung der Lebensspanne beiträgt⁶³.

Aufgrund gleicher Exposition aller Versuchsgruppen, ist die Wahrscheinlichkeit eher gering, dass dieser Effekt relevant ausgeprägt ist.

Um diese Theorien zu bestätigen sollten in weiteren Studien konkrete zugrundeliegende Mechanismen untersucht werden. Zum einen könnten durch Einsatz transgener Knockoutstämme die Beteiligung verschiedener antioxidativer Enzymsysteme und Transkriptionsfaktoren an der Lebensverlängerung nach transienter GE untersucht werden. Zum anderen sollten funktionelle Untersuchungen zur Genese des ROS und der Rolle des mitochondrialen Metabolismus durchgeführt werden, wie beispielsweise die Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs.

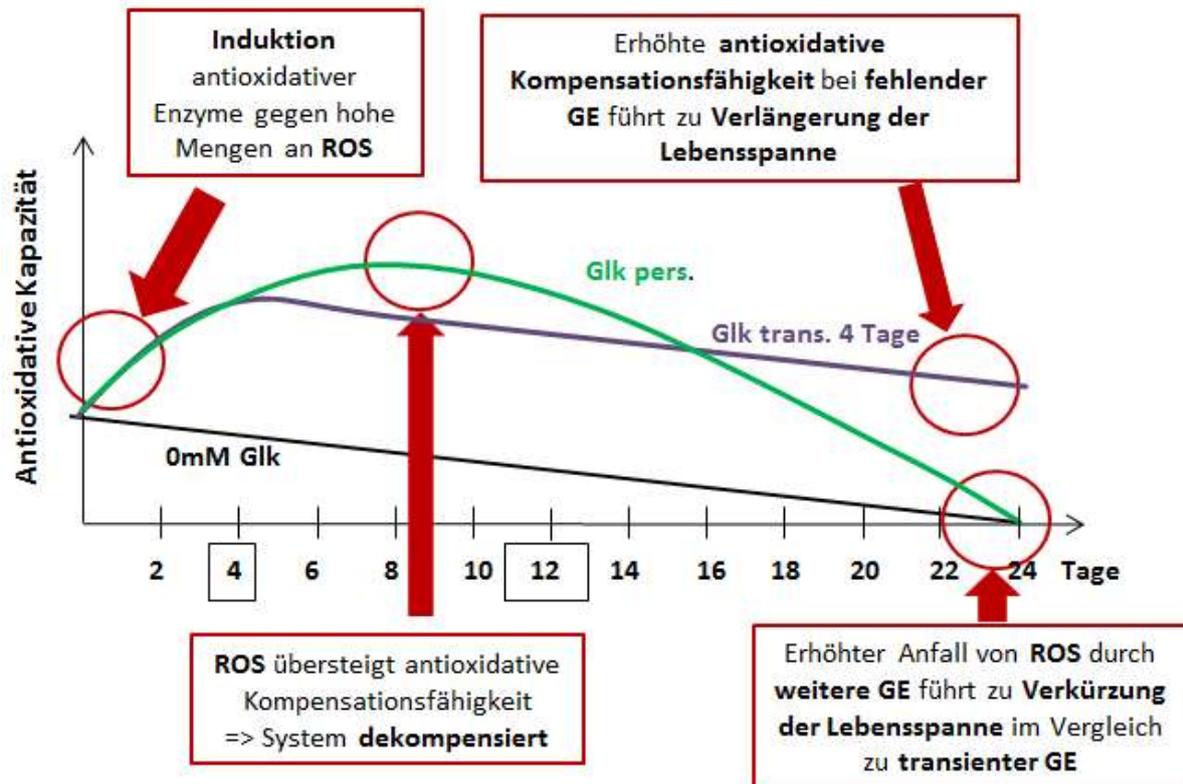


Abb. 34: Mitohormetische Mechanismen des metabolischen Gedächtnisses nach transienter 400mM GE über 4 Tage im Vergleich zu persistenter GE in *C. elegans*

4.7 Keine Erhöhung der intrazellulären Glukose – ein Erklärungsversuch

Aufgrund unerwarteter teils protektiver Effekte transienter und persistenter GE in *C. elegans* wurde untersucht, ob die hohe extrazelluläre Glukosekonzentration vermehrt aufgenommen wurde und somit in einer höheren intrazellulären Glukosekonzentration ($c_{iz}(\text{Glk})$) resultiert. Verschieden hohe persistente GE konnten keine Erhöhung der ($c_{iz}(\text{Glk})$) zeigen, es wurde im Gegenteil ein Trend zu niedrigeren $c_{iz}(\text{Glk})$ in Abhängigkeit der Konzentration der GE beobachtet. Wie in Kapitel 4.3 beschrieben reduzierte persistente 400mM GE die Wachstumsrate der Nematoden und konnte somit einen negativen Einfluss auf Körpergröße und Proteinmenge zeigen. Bei Normalisierung der $c_{iz}(\text{Glk})$ auf die Proteinmenge der Proben ist kein Unterschied zwischen GE und nicht-exponierten Gruppen mehr vorhanden. In der Literatur wurde im Gegensatz zu diesen Ergebnissen häufig eine Zunahme der $c_{iz}(\text{Glk})$ unter GE beschrieben^{48, 50, 106}. Aufgrund dessen wurde zunächst ausgeschlossen, dass eine Erschöpfung der Glukosemenge in den Versuchsplatten die Ursache für die unerwarte-

ten Daten darstellte. Die methodischen Unterschiede könnten den differentiellen Einfluss der persistenten GE auf die $c_{iz}(\text{Glk})$ und auch die Lebensspanne erklären. In diesem Modell wurden sehr hohe Glukosekonzentrationen verwendet um eine mögliche Glukotoxizität zu untersuchen. Die Expositions- und Versuchsbedingungen weiterer Studien zur hohen GE variieren stark und verwenden vorwiegend weitaus geringere Glukosekonzentrationen.

Häufig wurde die Glukose täglich als Lösung auf die Versuchsplatten aufgetragen, was in unterschiedlichen Konzentrationen des Agars resultierte, wie unsere Gruppe zuvor bei Implementierung dieses Modells darstellen konnte⁴⁸. In dieser Studie wurde Glukose bereits beim Herstellen der Platten hinzugefügt um eine gleichmäßige Verteilung der Substanz zu gewährleisten. Zusätzlich wurden die Nematoden, die auf der Agaroberfläche leben, durch einmal tägliche Flüssigkeitsapplikation zeitlich viel kürzer der hohen Glukose exponiert, als die konstante Exposition der hier bereits gleichmäßig im Agar verteilten Glukose.

Bisherige Studien haben hohe Glukosekonzentration verwendet, um ein diabetisches Milieu nachzubilden. *C. elegans* besitzt kein vaskuläres System, was die Vergleichbarkeit von Blutglukose- mit intrazellulären Glukosekonzentrationen der Nematoden erschwert, wie in diesem Modell gezeigt werden konnte. In Studien zur Glukoseaufnahme von bovinen vaskulären Zellen konnte eine stark verminderte Expression vom Glukosetransporter GLUT-1 nach Inkubation mit hohen Glukosebedingungen beobachtet werden, was zu einer geringeren Aufnahme von Glukose führte und einem allgemeinen Schutz vor deletären Auswirkungen von Substratüberfluß entspricht¹⁰⁷. Insulinabhängige diabetische Gewebe haben ebenfalls eine niedrigere Glukoseaufnahme, wie im Skelettmuskel diabetischer Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren gezeigt werden konnte¹⁰⁸. Somit wird die Eignung der $c_{iz}(\text{Glk})$ als Korrelat der Blutglukose hinterfragt.

Kritisch zu bemerken ist, dass durch die statische Messmethode nur die $c_{iz}(\text{Glk})$ erfasst wird. Nach Eintritt in die Zelle wird Glukose durch die Hexokinase phosphoryliert, um metabolisierbar zu werden. Glukose-6-Phosphat kann mit dem verwendeten Assay nicht mehr erfasst werden¹⁰⁹. Die zeitintensive Sammlung großer Mengen von *C. elegans* über einen Zeitraum von 30-60 Minuten könnte eine Verstoffwechslung des Großteils der $c_{iz}(\text{Glk})$ vor der Kryokonservierung der Nematoden aufgrund einer höheren Glykolyse verursachen. In zahlreichen Zelllinien konnte unter hoher extrazellulärer Glukose eine verstärkte Aktivierung der Hexokinase-2, einem Glukose-6-Phosphat bildenden Enzyms, gezeigt werden¹¹⁰, wohingegen das Schlüsselenzym der Glykolyse, die Hexokinase-1, bereits bei 1mM extrazellulärer Glukose eine Sättigung sowohl anhand ihrer bekannten katalytischen Parameter, als auch experimentell in murinen kardialen Endothelzellen (MCECs) zeigte (T. Fleming, I. Med. Klinik, Universität Heidelberg, unpublizierte Ergebnisse)¹⁰⁹. Messungen zum glykolytischen Flux in aus *C. elegans* isolierten Zelllinien wurden bereits unter nicht hyperglykämischen Bedingungen durchgeführt¹¹¹. Dagegen sprechen Glukosemessungen mit der gleichen statistischen Messmethode (Amplex® Red Glukose/Glukose Oxidase Kit), die unter kontinuierlicher 2%iger GE im Agar einen ca. 50%igen Anstieg der $c_{iz}(\text{Glk})$ im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrollgruppe zeigen konnten bei gleichzeitiger Verkürzung der Lebensspanne⁵⁰. Über die Länge oder Art der Probensammlung wurden hier keine Angaben gemacht, aber aufgrund der unterschiedlichen Auswirkungen auf die Lebensspanne und $c_{iz}(\text{Glk})$ könnten diese Ergebnisse auf einen konzentrationsabhängigen nicht-linearen Effekt der GE im Sinne (mito-)hormetischer Mechanismen hindeuten.

Diabetische Stoffwechselbedingungen verursachen multiple metabolische Veränderungen, wie die Inhibition der Aktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und eine damit zusammenhängende Umleitung glykolytischer Intermediate in alternative Stoffwechselwege¹⁸ wie in der erhöhten Bildung bestimmter AGEs unter persistenter GE in diesem Modell reflektiert. Der fehlende Nachweis einer substantiellen AGE-Bildung auch nur durch kurzfristige GE über 1, 4 oder 6 Tagen sowie nach transienter GE spricht daher für eine eher gering erhöhte $c_{iz}(\text{Glk})$ als Substrat im Vergleich zu den extrem hohen GE. Unsere AGE-Messung kann zudem keine Aussage über die Lokalisation der AGEs in Zellen oder in der Matrix getroffen werden, sodass sich die AGEs bei geringer Glukoseaufnahme auch extrazellulär an der Kutikula gebildet haben könnten. Andererseits könnte die AGE-Bildung trotz fehlender messbarer Erhöhung der $c_{iz}(\text{Glk})$ gerade auf eine schnelle Metabolisierung der intrazellulären Glukose und der glykolytischen Intermediate in weitere Stoffwechselwege hindeuten. Hierdurch wird die Wichtigkeit dynamischer Messmethoden wie die Messung des glykolytischen Flux oder der Glukoseaufnahme in *C. elegans* für zukünftige Studien hervorgehoben¹¹².

4.8 Differenzierung zwischen glukose-spezifischem und osmotischem Stress

In Studien zur Untersuchung osmotisch wirksamer Substanzen wie Glukose und Mannitol ist es besonders in *C. elegans* sinnvoll eine osmotische Regulation der beobachteten Parameter zu untersuchen. *C. elegans* zeigen im Unterschied zu Säugtieren eine differentielle Regulation unter hypertonen Bedingungen und können im Dauerstadium lange Zeit ohne Flüssigkeitszufuhr auskommen durch Anreicherung von Osmolyten im Zellinneren wie Glycerol, die vor Dehydratation schützen und so die Proteotoxizität verringern¹¹³.

Neuere Studien in *C. elegans* zur Induktion der antioxidativen *gst-4*, die hier als Reporter gen für die Bildung von oxidativem Stress verwendet wurde, haben gezeigt, dass diese auch durch osmotischen Stress induziert wird. Über den p38 MAP-Kinase Signalweg, der über den Transkriptionsfaktor *skn-1* ein antioxidatives responsives Element (ARE) auf DNA Ebene induziert, kommt es hierbei zur Induktion der *gst-4*¹¹⁴. *Skn-1* ist ein Ortholog des Transkriptionsfaktors *Nrf-2* und kommuniziert die antioxidative Antwort auf DNA-Ebene. Die Differenzierung zwischen oxidativ und osmotisch induzierter GFP-Expression im transgenen Reporterstamm CL2166 kann deshalb nicht sicher vorgenommen werden, da das Reportersystem gleichermaßen durch beide Stimuli induziert wird. Transiente GE konnte in diesen Experimenten allerdings eine anhaltende Induktion der antioxidativen *gst-4* über den Zeitraum der hohen Glukose-Exposition hinaus, die mehrere Tage bis zum Versuchsende anhielt. Diese anhaltende Induktion konnte die Halbwertszeit von GFP, die 26 Stunden beträgt, deutlich übersteigen und somit eine anhaltende Stimulation der antioxidativen *gst-4* durch oxidativen Stress im Sinne eines metabolischen Gedächtnisses zeigen unabhängig von hohen osmotischen Bedingungen. Durch Inhibitoren des mitochondrialen Komplex 1 der Atmungskette wurde in *C. elegans* eine intrazelluläre Kalorienrestriktion modelliert. Über Induktion des *skn-1*/ p38 MAP-Kinase Signalwegs konnte hierbei eine Verlängerung der Lebensspanne erreicht werden¹¹⁵. Die Untersuchung des glykolytischen Flux in nachfolgenden Studien wäre in dem hier untersuchten Modell aufgrund der nicht erhöhten intrazellulären Glukosekonzentrationen nach hoher GE bei protektivem Einfluss auf die Lebensspanne und Induktion des *skn-1*/ p38 MAP-Kinase Signalwegs daher besonders interessant, um die Genese des hier entstehenden ROS besser zu verstehen.

Persistente und transiente Mannitol-expositionen (ME) konnten in diesem Modell insgesamt die stärkste Lebensverlängerung erreichen, wobei die größte Steigerung durch persistente ME erreicht werden konnte. Diese Ergebnisse deuten hier auf eine teilweise osmotische Regulation hin. Besonders aber die differentielle Auswirkung persistenter ME im Vergleich zur GE deutet auf weitere glukose-spezifische Mechanismen hin, die hier wirken. Glukosamin in einer Konzentration von 100µM konnte in *C. elegans* ebenfalls eine *skn-1* abhängige Verlängerung der Lebensspanne bewirken¹¹⁶. Extrazelluläre Sorbitol-exposition als osmotischer Stressor verlängerte die Lebensspanne und erhöhte die osmotische Stressresistenz auf hohe Salzkonzentrationen nach einer Phase der Prä-Adaptation ähnlich der hier durchgeführten transienten ME¹¹⁷. Unter erhöhter Expression von Genen beteiligt an Reparaturmechanismen, wie auch in diesem Modell unter hoher GE beobachtet werden konnte, sowie Heat-Shock Proteinen konnte die Lebensspanne von *C. elegans* unter hohem osmotischen Stress verlängert werden¹¹⁸. Auf der anderen Seite verkürzte 2%ige GE (100mM) die Lebensspanne und reduzierte die osmotische Stresstoleranz durch verminderte Expression von Aquaporin-1 (AQP-1), einem Glycerolkanal und dadurch verringerte Glycerolakkumulation bei gleichzeitiger Reduktion des *daf-16*/Foxo Transkriptionsfaktors⁵⁰. Die verwendete Glukosekonzentration betrug allerdings nur 25% der in diesem Modell eingesetzten GE von 400mM.

(Mito-)Hormetische Mechanismen durch sehr hohen osmotischen Stress könnten demnach in diesem Modell eine Rolle spielen.

Aufgrund der Spezies-spezifischen protektiven Hochregulation der Osmolyte zum Überleben während der „Dauer“-Phase ist die Übertragbarkeit dieser Beobachtungen auf Mammalia insgesamt schwer zu beurteilen. Die Annotation glukose-spezifischer und osmotisch regulierter Mechanismen sehr hoher transienter und persistenter GE trägt aber zum besseren Verständnis dieses Modells für metabolisches Gedächtnis bei und kann teilweise protektive Auswirkungen transienter und persistenter GE auf die Lebensspanne und Motilität sowie die verringerte Wachstumsrate erklären.

4.9 Optimierte *C. elegans* Massenkultur erzeugt reproduzierbare Ergebnisse

Die Optimierung des Flüssigkeitstransfers großer Mengen von *C. elegans* auf Platten gewährleistete eine schonende Kultivierung der Nematoden ohne relevante Induktion von ROS durch Flüssigkeits-Scher-Stress oder Übersterblichkeit der Nematoden. Außerdem konnten durch die etwa Verzehnfachung der Populationsgröße ausreichende Mengen an Protein gewonnen werden, die für massenspektrometrische Analysen von Methylglyoxal und verschiedener AGEs geeignet waren. Ergebnisse aus der Literatur wie die Induktion von ROS durch hohe Glukose konnten mit diesem Protokoll reproduziert werden⁴⁸.

Durch die Bestimmung des Proteingehaltes von 500-1500 Nematoden konnte eine lineare Abhängigkeit der Proteinmenge zur Nematodenzahl festgestellt werden und somit die Quantifizierung der gemessenen Parameter vereinfacht werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist diese Beziehung abhängig von dem Einfluss der exponierten Substanz auf die Proteinmenge oder das Wachstum der Nematoden. Unter 400mM GE sinkt die Wachstumsrate bezogen auf Körpergröße, Länge und Protein im Vergleich zu nicht-exponierten Kontrollen, sodass die Proteinmenge hier nicht mehr direkt von der Nematodenzahl mittels der erstellten Funktion abgeleitet werden kann. Deshalb sollte in zukünftigen Versuchen bei Bezug einer Größe auf die Proteinmenge zunächst der Einfluss der Substanz auf diese geprüft werden.

Die Relevanz dieses Protokolls ergibt sich einerseits aus der detaillierten Beschreibung und Optimierung einer einfach etablierbaren Methode sowie aus den Limitationen bestehender Methoden. Flüssigkultur stellt eine häufig verwendete Methode zur Anzucht großer Mengen an *C. elegans* dar. Nachteile sind hier einerseits die schwierige Sammlung einzelner Nematoden z.B. für die Analyse der Lebensspanne. Zur Gewinnung der Nematoden kann hier ein Baerman Apparat eingesetzt werden, der die Nematoden aus dem flüssigen Medium filtriert¹¹⁹. Dazu müssen die Nematoden selbstständig durch das Filtersystem kriechen, was besonders bei Exposition von schädigenden Substanzen nur eingeschränkt möglich sein kann und die Versuchsergebnisse verfälscht. Die ungleiche Verteilung von fluktuierenden, schnell reagierenden Substanzen wie MG kann im flüssigen Medium zu einer ungleichen Exposition der einzelnen Nematoden führen. Auch die mehrstündige Filtrierung des Mediums bei Raumtemperatur (2-6 Stunden) kann bei metabolischen Analysen die Ergebnisse verfälschen. Ein weiterer Nachteil zeigt sich durch die Ausbildung eines längeren, dünneren Phänotyps von *C. elegans* in Flüssigkultur, was die Vergleichbarkeit mit Parametern aus der Plattenkultur erschwert⁵⁶.

Technologisch fortgeschrittenere und automatisierte Methoden wie mikrofluide Elemente ermöglichen ein „High-Throughput Screening“, welches multiple Parameter gleichzeitig erfassen kann und so biochemische und phänotypische Informationen des gleichen Nematodens zusammenbringt. Diabetes mellitus Typ 2 konnte bereits auf diese Weise modelliert werden und Daten zur Lebensspanne, Lipidmetabolismus und ROS aus demselben Nematoden integriert werden⁶⁴. Aufgrund teurer individueller Konfiguration dieser Elemente eignen sie sich vor allem für die Anwendung in der pharmakologischen Forschung und Industrie.

Der Einsatz dieses Protokolls ermöglicht auch die Umstellung älterer, weniger sensibler Methoden wie die Quantifizierung von AGEs mittels immunfluoreszenter Färbung auf die sensitivere Detektion durch LC-MS/MS, welche weitaus größere Probenmengen benötigt. Die immunfluoreszente Methode zeigte eine hohe Ergebnisvariabilität durch zeitaufwendige mikroskopische Analyse bei rascher Abschwächung des Signals. Auch konnten mittels dieser Methode die intrazellulären AGEs nicht aufgeschlossen und untersucht werden. Obwohl Ergebnisse aus LC-MS/MS Messungen in *C. elegans* bereits publiziert worden waren⁸¹, fehlte ein detailliertes Protokoll, um diese Methode mit geringem Optimierungsaufwand und Zeitverlust durchführen zu können.

Das hier optimierte Protokoll ermöglicht die reproduzierbare Untersuchung mehrerer Parameter aus derselben Population nach Elimination relevanter Störfaktoren, die eine Übersterblichkeit der Nematoden bedingten. Es trägt dabei zur Standardisierung der Versuchsbedingungen für künftige Experimente besonders in der Erforschung komplexer, multifaktorieller Erkrankungen wie Diabetes mellitus bei, welche sich auf die Analyse multipler Parameter stützen. Die Anwendung ist hier vor allem eher kleineren Forschungslaboren zu empfehlen, um die Populationsgröße zu erhöhen. Trotz Optimierung ist das beschriebene Protokoll weiterhin zeitaufwändiger als die Flüssigkultur oder technologisch fortgeschrittenere Verfahren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das metabolische Gedächtnis im Diabetes mellitus ist die biochemische Grundlage der Entwicklung diabetischer mikrovaskulärer Langzeitkomplikationen wie der diabetischen Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie. Komplexe irreversible Mechanismen können nach einer initialen Episode schlechter Kontrolle der Blutglukose anhaltende zelluläre Veränderungen verursachen, die durch die bisherigen vorwiegend blutglukosesenkenden Therapien nicht rückführbar sind.

Ziel dieser Arbeit war es die anhaltenden Auswirkungen transienter Glukose-Exposition (GE) in dem Modellorganismus *C. elegans* im Vergleich zu persistenter GE zu untersuchen, Effekte im Sinne eines metabolischen Gedächtnisses zu identifizieren und somit die Eignung als Modell für dieses Phänomen zu evaluieren.

Transiente Glukose-Exposition konnte im Vergleich zu persistenter GE keine erhöhte Bildung von „Advanced Glycation Endproducts (AGEs)“, einer typischen Veränderung des metabolischen Gedächtnisses induzieren. Allerdings zeigten sich Hinweise auf weitere Veränderungen wie eine erhöhte Bildung von reaktivem oxidativem Stress (ROS) nach transienter, sowie persistenter GE. Protektive Auswirkungen betrafen eine Erhaltung der Motilität im Alterungsprozess durch transiente und persistente GE, sowie eine Lebensverlängerung, die nur durch transiente GE induziert werden konnte. Diese protektiven Effekte könnten im Sinne der Mitohormese erklärt werden, die eine Induktion antioxidativer Systeme nach Stimulation mit ROS beschreibt. Dieser Mechanismus kann den Organismus vor späteren Schäden übermäßiger ROS-Bildung schützen. Im Gegensatz zu weiteren publizierten Studien zur Auswirkung von GE in *C. elegans* wurden hier sehr hohe Glukosekonzentrationen gewählt um eine Glukotoxizität zu untersuchen. Neben weiteren methodischen Unterschieden könnte das eine Erklärung für die zum Teil unterschiedlichen Ergebnisse liefern.

Auf Transkriptomebene zeigte sich die Genexpression multipler Signal- und Stoffwechselwege anhaltend nach transienter GE verändert. Neben gleichgerichteten Mechanismen nach transienter und persistenter GE zeigten sich auch Mechanismen, die nur nach transienter GE anhaltend verändert waren. Komponenten des Insulinrezeptorsignalwegs zeigten sich vermindert, wohingegen Gene des Aminosäurestoffwechsel vermehrt exprimiert wurden, was insgesamt als Hinweise auf eine Insulinresistenz gedeutet werden könnte. Eine verminderte Genexpression endozytotischer Gene in beiden Gruppen könnte in Verbindung mit einem verringerten Recycling des Insulinrezeptors stehen. Weitere gleichgerichtete Genexpression von Signalwegen nach transienter und persistenter GE betraf antioxidative Enzyme sowie einerseits eine Verminderung ribosomaler RNA-Produktion und Reifung, andererseits eine Erhöhung ribosomaler Proteinproduktion. Diese Veränderungen sprechen für eine gestörte, potentiell inhibierte Translation, worauf auch die verminderte Genexpression der proteinprozessierenden Gene im endoplasmatischen Retikulum in beiden Gruppen hindeutet.

Einzig nach transienter GE, aber nicht persistenter GE zeigte sich die Genexpression des FoxO- sowie mTOR-Signalweges vermindert, die unter Kontrolle des Insulinrezeptors stehen und einen Einfluss auf antioxidative sowie mitogene Prozesse wie Zellwachstum und -teilung haben. Diese Ergebnisse sollten mittels Untersuchung der Proteinexpression und mechanistischer Studien validiert werden. Sie liefern Hinweise auf neuartige Mechanismen des metabolischen Gedächtnisses, die eine unterschiedliche Regulation abhängig von der Dauer der GE zeigen.

Metabolisch konnte unter persistenter GE keine erhöhte Glukosemenge in den *C. elegans* gemessen werden. Eine Messung des glykolytischen Flux in weiteren Studien könnte den Metabolismus der Glukose weiter entschlüsseln.

Aufgrund der hohen GE-Konzentration wurde mittels Mannitol-exposition (ME) die Rolle der Osmose in diesem Modell untersucht. Die verringerte Größe, Länge und Proteingehalt der Nematoden unter GE konnte in gleichem Ausmaß unter ME erreicht werden. Im Gegensatz dazu war der Einfluss auf Lebensspanne und Motilität nicht vollständig über osmotische Mechanismen zu erklären, was auf weitere glukose-spezifische Mechanismen hindeutet.

Insgesamt können durch transiente GE anhaltende AGE-unabhängige Effekte in *C. elegans* induziert werden, deren Mechanismen nicht vollständig geklärt sind. Das Modell des Fadenwurms kann nach den Daten dieser Studie Hinweise zur Aufklärung von frühen, noch nicht charakterisierten Mechanismen des metabolischen Gedächtnisses geben und damit einen wichtigen Beitrag in der weiteren Erforschung diabetischer Komplikationen und deren potenzieller Behandlung leisten. Zur Durchführung der aufwendigen Versuche konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll für die Massenkultur in *C. elegans* optimiert werden.

6 SUMMARY

The “Metabolic Memory” phenomenon in diabetes mellitus is the biochemical foundation of the development of diabetic microvascular long-term complications, such as diabetic retinopathy, nephropathy, and neuropathy. After an initial episode of poor glycemic control these complex irreversible mechanisms can cause long-lasting cellular modifications, which cannot be reversed by application of the currently existing mostly blood-glucose lowering therapies.

The aim of this work was to study the long-lasting effects of transient glucose-exposition (GE) in the model organism *C. elegans* in comparison to persistent GE to identify effects of the “Metabolic Memory” phenomenon and assess the ability of *C. elegans* as an adequate model.

Transient glucose-exposition in comparison to persistent GE did not induce the formation of „Advanced Glycation Endproducts (AGEs)“ a known characteristic of the “Metabolic Memory” phenomenon. Other long-lasting effects were identified such as an increased formation of reactive oxygen species (ROS) upon transient and persistent GE. Protective effects included a restoration of motility in aging upon transient as well as persistent GE, as well as an increased lifespan, but only upon transient GE.

These protective effects could be explained with the theory of mitohormesis, which describes an induction of antioxidative systems upon stimulation with ROS. This mechanism can protect the organism against later damages caused by excessive formation of ROS, similar to a vaccination. In contrast to published studies on the effect of GE in *C. elegans*, the selected glucose concentrations of this study were extremely high to investigate glucotoxicity. Among further methodological differences, this could be an explanation for the partially different results compared to the literatures.

On a transcriptomic level, the gene expression of multiple signaling and metabolic pathways was continuously altered upon transient GE. Among similarly altered pathways upon transient and persistent GE, mechanisms exclusively altered upon transient GE could be identified. Components of the insulin receptor pathway were found to be decreased, whereas the amino acid metabolism was increased indicating an involvement of mechanisms of insulin resistance. Endocytotic genes were found to have a decreased gene expression upon both transient and persistent GE, which could be connected to a decreased recycling of the insulin receptor. Further similarly altered gene expression of signaling pathways in both groups was found involving an increased metabolism of antioxidative enzymes, as well as on the one hand a decreased ribosomal RNA production und maturation and on the other hand an increased ribosomal protein production. This regulation points towards a perturbed and potentially inhibited translation in line with a decreased gene expression of genes involved in protein processing in the endoplasmatic reticulum in both groups.

Only after transient, but not persistent GE the gene expression of FoxO- as well as the mTOR-pathway was decreased. Both are under control of the insulin receptor influencing antioxidative as well as mitogenic processes such as growth and division of cells. These results should be validated in the future examining the protein expression and performing mechanistic studies. Furthermore they could indicate innovative mechanisms of the “Metabolic Memory” displaying mechanisms dependent on the mode of exposure.

Metabolically, persistent GE did not increase the amount of glucose measured in *C. elegans*. Assessment of glycolytic flux in future studies could further decipher the metabolism of glucose in this model.

Because of high GE concentrations, mannitol-exposition (ME) was used to examine the role of osmotic pressure in this model. The decrease in size, length, and amount of protein of the nematodes upon GE could be replicated using ME. Contrary to these findings, lifespan and motility could only partially be explained by osmotic mechanisms indicating a role of glucose-specific mechanisms.

In summary, transient GE induces continuous, AGE-independent effects in *C. elegans* which mechanisms are not fully understood, yet. This nematode model has the potential to dissect early, not yet characterized mechanisms of the “Metabolic Memory” and with this contribute to further insights into diabetic complications. For the performance of the tedious experiments, a protocol for large-scale culture was established while conducting this study.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

- Kohl, K, Fleming, T, Acunman, K, Hammes, HP, Morcos, M, Schlotterer, A: Plate-based Large-scale Cultivation of *Caenorhabditis elegans*: Sample Preparation for the Study of Metabolic Alterations in Diabetes. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 2018.
- Murillo, K, Samigullin, A, Humpert, PM, Fleming, T, Özer, K, Schlotterer, A, Hammes, HP, Morcos, M: Protective Effects of Transient Glucose Exposure in Adult *C. elegans*. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11, 2022.

1. NCD-RisC, NRCF: Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet (London, England)*, 387: 1513-1530, 2016.
2. Forbes, JM, Cooper, ME: Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews*, 93: 137-188, 2013.
3. Lachin, JM, Genuth, S, Nathan, DM, Zinman, B, Rutledge, BN: Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the diabetes control and complications trial--revisited. *Diabetes*, 57: 995-1001, 2008.
4. Lee, AK, Warren, B, Lee, CJ, McEvoy, JW, Matsushita, K, Huang, ES, Sharrett, AR, Coresh, J, Selvin, E: The Association of Severe Hypoglycemia With Incident Cardiovascular Events and Mortality in Adults With Type 2 Diabetes. *Diabetes care*, 41: 104-111, 2018.
5. Kosiborod, M: Following the LEADER - why this and other recent trials signal a major paradigm shift in the management of type 2 diabetes. *Journal of diabetes and its complications*, 31: 517-519, 2017.
6. Wanner, C, Inzucchi, SE, Lachin, JM, Fitchett, D, von Eynatten, M, Mattheus, M, Johansen, OE, Woerle, HJ, Broedl, UC, Zinman, B: Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine*, 375: 323-334, 2016.
7. Vallon, V, Verma, S: Effects of SGLT2 Inhibitors on Kidney and Cardiovascular Function. *Annual review of physiology*, 83: 503-528, 2021.
8. UKPDS-Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). . *Lancet (London, England)*, 352: 837-853, 1998.
9. Engerman, RL, Kern, TS: Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. *Diabetes*, 36: 808-812, 1987.
10. Lachin, JM, White, NH, Hainsworth, DP, Sun, W, Cleary, PA, Nathan, DM: Effect of intensive diabetes therapy on the progression of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes: 18 years of follow-up in the DCCT/EDIC. *Diabetes*, 64: 631-642, 2015.
11. Miller, RG, Orchard, TJ: Understanding Metabolic Memory: A Tale of Two Studies. *Diabetes*, 69: 291-299, 2020.
12. Testa, R, Bonfigli, AR, Prattichizzo, F, La Sala, L, De Nigris, V, Ceriello, A: The "Metabolic Memory" Theory and the Early Treatment of Hyperglycemia in Prevention of Diabetic Complications. *Nutrients*, 9, 2017.
13. Kowluru, RA: Diabetic retinopathy, metabolic memory and epigenetic modifications. *Vision research*, 139: 30-38, 2017.

14. Bierhaus, A, Humpert, PM, Morcos, M, Wendt, T, Chavakis, T, Arnold, B, Stern, DM, Nawroth, PP: Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 83: 876-886, 2005.
15. Zhong, Q, Kowluru, RA: Epigenetic modification of Sod2 in the development of diabetic retinopathy and in the metabolic memory: role of histone methylation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54: 244-250, 2013.
16. Zhong, Q, Mishra, M, Kowluru, RA: Transcription factor Nrf2-mediated antioxidant defense system in the development of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54: 3941-3948, 2013.
17. Giacco, F, Du, X, Carratú, A, Gerfen, GJ, D'Apollito, M, Giardino, I, Rasola, A, Marin, O, Divakaruni, AS, Murphy, AN, Shah, MS, Brownlee, M: GLP-1 Cleavage Product Reverses Persistent ROS Generation After Transient Hyperglycemia by Disrupting an ROS-Generating Feedback Loop. *Diabetes*, 64: 3273-3284, 2015.
18. Brownlee, M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414: 813-820, 2001.
19. Nishikawa, T, Edelstein, D, Du, XL, Yamagishi, S, Matsumura, T, Kaneda, Y, Yorek, MA, Beebe, D, Oates, PJ, Hammes, HP, Giardino, I, Brownlee, M: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404: 787-790, 2000.
20. Brings, S, Fleming, T, Freichel, M, Muckenthaler, MU, Herzig, S, Nawroth, PP: Dicarbonyls and Advanced Glycation End-Products in the Development of Diabetic Complications and Targets for Intervention. *International journal of molecular sciences*, 18, 2017.
21. Weykamp, C: HbA1c: a review of analytical and clinical aspects. *Annals of laboratory medicine*, 33: 393-400, 2013.
22. Monnier, VM, Sell, DR, Genuth, S: Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043: 567-581, 2005.
23. Thorpe, SR, Baynes, JW: Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino acids*, 25: 275-281, 2003.
24. Chaudhuri, J, Bains, Y, Guha, S, Kahn, A, Hall, D, Bose, N, Gugliucci, A, Kapahi, P: The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality. *Cell metabolism*, 28: 337-352, 2018.
25. Genuth, S, Sun, W, Cleary, P, Gao, X, Sell, DR, Lachin, J, Monnier, VM: Skin advanced glycation end products glucosepane and methylglyoxal hydroimidazolone are independently associated with long-term microvascular complication progression of type 1 diabetes. *Diabetes*, 64: 266-278, 2015.
26. Karachalias, N, Babaei-Jadidi, R, Ahmed, N, Thornalley, PJ: Accumulation of fructosyl-lysine and advanced glycation end products in the kidney, retina and peripheral nerve of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochemical Society transactions*, 31: 1423-1425, 2003.
27. Lo, TW, Westwood, ME, McLellan, AC, Selwood, T, Thornalley, PJ: Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *The Journal of biological chemistry*, 269: 32299-32305, 1994.
28. Schlotterer, A, Kolibabka, M, Lin, J, Acunman, K, Dietrich, N, Sticht, C, Fleming, T, Nawroth, P, Hammes, HP: Methylglyoxal induces retinopathy-type lesions in the

- absence of hyperglycemia: studies in a rat model. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33: 4141-4153, 2019.
29. Shipanova, IN, Glomb, MA, Nagaraj, RH: Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Archives of biochemistry and biophysics*, 344: 29-36, 1997.
 30. PubChem Compound Summary for CID 880, Methylglyoxal [Internet]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylglyoxal> [cited 2020 Aug 18], National Center for Biotechnology Information, 2020.
 31. PubChem Compound Summary for CID 9839580, Fructosyl-lysine [Internet]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fructosyl-lysine> [cited 2020 Aug 18], National Center for Biotechnology Information, 2020.
 32. Harman, D: Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology*, 11: 298-300, 1956.
 33. Liochev, SI: Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free radical biology & medicine*, 60: 1-4, 2013.
 34. Thakur, P, Kumar, A, Kumar, A: Targeting oxidative stress through antioxidants in diabetes mellitus. *Journal of drug targeting*, 26: 766-776, 2018.
 35. Rocha, M, Diaz-Morales, N, Rovira-Llopis, S, Escribano-Lopez, I, Bañuls, C, Hernandez-Mijares, A, Diamanti-Kandarakis, E, Victor, VM: Mitochondrial Dysfunction and Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetes. *Current pharmaceutical design*, 22: 2640-2649, 2016.
 36. Kowluru, RA, Kowluru, A, Veluthakal, R, Mohammad, G, Syed, I, Santos, JM, Mishra, M: TIAM1-RAC1 signalling axis-mediated activation of NADPH oxidase-2 initiates mitochondrial damage in the development of diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 57: 1047-1056, 2014.
 37. Ristow, M, Schmeisser, K: Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*, 12: 288-341, 2014.
 38. Elbatrek, MH, Pachado, MP, Cuadrado, A, Jandeleit-Dahm, K, Schmidt, H: Reactive Oxygen Comes of Age: Mechanism-Based Therapy of Diabetic End-Organ Damage. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 30: 312-327, 2019.
 39. Tauffenberger, A, Vaccaro, A, Parker, JA: Fragile lifespan expansion by dietary mitohormesis in *C. elegans*. *Aging*, 8: 50-61, 2016.
 40. Alpers, CE, Hudkins, KL: Mouse models of diabetic nephropathy. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 20: 278-284, 2011.
 41. Friedrichs, P, Schlotterer, A, Sticht, C, Kolibabka, M, Wohlfart, P, Dietrich, A, Linn, T, Molema, G, Hammes, HP: Hyperglycaemic memory affects the neurovascular unit of the retina in a diabetic mouse model. *Diabetologia*, 60: 1354-1358, 2017.
 42. Intine, RV, Olsen, AS, Sarras, MP, Jr.: A zebrafish model of diabetes mellitus and metabolic memory. *Journal of visualized experiments : JoVE*: e50232, 2013.
 43. Cutiongco, MFA, Chua, BMX, Neo, DJH, Rizwan, M, Yim, EKF: Functional differences between healthy and diabetic endothelial cells on topographical cues. *Biomaterials*, 153: 70-84, 2018.
 44. Silverman, GA, Luke, CJ, Bhatia, SR, Long, OS, Vetica, AC, Perlmutter, DH, Pak, SC: Modeling molecular and cellular aspects of human disease using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Pediatric research*, 65: 10-18, 2009.
 45. Altun, ZF: Nervous system, general description. *Worm Atlas*.

46. Corsi A.K., WB, and Chalfie M.: A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans* [Internet]. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, 2015.
47. Xiong, H, Pears, C, Woollard, A: An enhanced *C. elegans* based platform for toxicity assessment. *Scientific reports*, 7: 9839, 2017.
48. Schlotterer, A, Kukudov, G, Bozorgmehr, F, Hutter, H, Du, X, Oikonomou, D, Ibrahim, Y, Pfisterer, F, Rabbani, N, Thornalley, P, Sayed, A, Fleming, T, Humpert, P, Schwenger, V, Zeier, M, Hamann, A, Stern, D, Brownlee, M, Bierhaus, A, Nawroth, P, Morcos, M: *C. elegans* as model for the study of high glucose- mediated life span reduction. *Diabetes*, 58: 2450-2456, 2009.
49. Watts, JL, Ristow, M: Lipid and Carbohydrate Metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 207: 413-446, 2017.
50. Lee, SJ, Murphy, CT, Kenyon, C: Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell metabolism*, 10: 379-391, 2009.
51. Kenyon, C, Chang, J, Gensch, E, Rudner, A, Tabtiang, R: A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366: 461-464, 1993.
52. Collins, JJ, Huang, C, Hughes, S, Kornfeld, K: The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook : the online review of C elegans biology*: 1-21, 2008.
53. Palmer, AK, Gustafson, B, Kirkland, JL, Smith, U: Cellular senescence: at the nexus between ageing and diabetes. *Diabetologia*, 62: 1835-1841, 2019.
54. Luyten, W, Antal, P, Braeckman, BP, Bundy, J, Cirulli, F, Fang-Yen, C, Fuellen, G, Leroi, A, Liu, Q, Martorell, P, Metspalu, A, Perola, M, Ristow, M, Saul, N, Schoofs, L, Siems, K, Temmerman, L, Smets, T, Wolk, A, Rattan, SI: Ageing with *elegans*: a research proposal to map healthspan pathways. *Biogerontology*, 17: 771-782, 2016.
55. Sohn, EH, van Dijk, HW, Jiao, C, Kok, PH, Jeong, W, Demirkaya, N, Garmager, A, Wit, F, Kucukcilioglu, M, van Velthoven, ME, DeVries, JH, Mullins, RF, Kuehn, MH, Schlingemann, RO, Sonka, M, Verbraak, FD, Abramoff, MD: Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113: E2655-2664, 2016.
56. Stiernagle, T: Maintenance of *C. elegans*. *WormBook : the online review of C elegans biology*: 1-11, 2006.
57. Churgin, MA, Jung, SK, Yu, CC, Chen, X, Raizen, DM, Fang-Yen, C: Longitudinal imaging of *Caenorhabditis elegans* in a microfabricated device reveals variation in behavioral decline during aging. *eLife*, 6, 2017.
58. Fronius, M, Clauss, WG: Mechano-sensitivity of ENaC: may the (shear) force be with you. *Pflugers Arch*, 455: 775-785, 2008.
59. López-Hernández, T, Maritzen, T, Haucke, V: Ramping up the autophagy-lysosome system to cope with osmotic stress. *Autophagy*: 1-2, 2020.
60. Burg, MB, Kador, PF: Sorbitol, osmoregulation, and the complications of diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 81: 635-640, 1988.
61. Stookey, JD, Pieper, CF, Cohen, HJ: Hypertonic hyperglycemia progresses to diabetes faster than normotonic hyperglycemia. *European journal of epidemiology*, 19: 935-944, 2004.
62. Zhang, W, Zitron, E, Hömme, M, Kihm, L, Morath, C, Scherer, D, Hegge, S, Thomas, D, Schmitt, CP, Zeier, M, Katus, H, Karle, C, Schwenger, V: Aquaporin-1 channel function is positively regulated by protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*, 282: 20933-20940, 2007.

63. Anderson, EN, Corkins, ME, Li, JC, Singh, K, Parsons, S, Tucey, TM, Sorkaç, A, Huang, H, Dimitriadi, M, Sinclair, DA, Hart, AC: *C. elegans* lifespan extension by osmotic stress requires FUDR, base excision repair, FOXO, and sirtuins. *Mechanisms of ageing and development*, 154: 30-42, 2016.
64. Zhu, G, Yin, F, Wang, L, Wei, W, Jiang, L, Qin, J: Modeling type 2 diabetes-like hyperglycemia in *C. elegans* on a microdevice. *Integr Biol (Camb)*, 8: 30-38, 2016.
65. Ahlqvist, E, Storm, P, Käräjämäki, A, Martinell, M, Dorkhan, M, Carlsson, A, Vikman, P, Prasad, RB, Aly, DM, Almgren, P, Wessman, Y, Shaat, N, Spégel, P, Mulder, H, Lindholm, E, Melander, O, Hansson, O, Malmqvist, U, Lernmark, Å, Lahti, K, Forsén, T, Tuomi, T, Rosengren, AH, Groop, L: Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 6: 361-369, 2018.
66. Kahn, SE, Hull, RL, Utzschneider, KM: Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444: 840-846, 2006.
67. Petersen, MC, Shulman, GI: Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological reviews*, 98: 2133-2223, 2018.
68. Leavens, KF, Birnbaum, MJ: Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 46: 200-215, 2011.
69. Mendler, M, Schlotterer, A, Ibrahim, Y, Kukudov, G, Fleming, T, Bierhaus, A, Riedinger, C, Schwenger, V, Herzig, S, Hecker, M, Tyedmers, J, Nawroth, PP, Morcos, M: daf-16/FOXO and glod-4/glyoxalase-1 are required for the life-prolonging effect of human insulin under high glucose conditions in *Caenorhabditis elegans*. *Diabetologia*, 58: 393-401, 2015.
70. Mendler, M, Riedinger, C, Schlotterer, A, Volk, N, Fleming, T, Herzig, S, Nawroth, PP, Morcos, M: Reduction in ins-7 gene expression in non-neuronal cells of high glucose exposed *Caenorhabditis elegans* protects from reactive metabolites, preserves neuronal structure and head motility, and prolongs lifespan. *Journal of diabetes and its complications*, 31: 304-310, 2017.
71. DIAMAP. <https://www.diamap.eu/roadmap/milestone/detail/223>, EURADIA, 2020.
72. Özer, K: Dissertation in preparation. Mannheim, V. Med. Department, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University
73. Sutphin, GL, Kaeberlein, M: Measuring *Caenorhabditis elegans* life span on solid media. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 2009.
74. Stiernagle, T: Maintenance of *C. elegans* In: *C. elegans: A Practical Approach*. edited by COMMUNITY, T. C. E. R., WormBook, 2006.
75. Kohl, K, Fleming, T, Acunman, K, Hammes, HP, Morcos, M, Schlotterer, A: Plate-based Large-scale Cultivation of *Caenorhabditis elegans*: Sample Preparation for the Study of Metabolic Alterations in Diabetes. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 2018.
76. Sapan, CV, Lundblad, RL, Price, NC: Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol Appl Biochem*, 29 (Pt 2): 99-108, 1999.
77. Rabbani, N, Thornalley, PJ: Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. *Nat Protoc*, 9: 1969-1979, 2014.
78. Aebersold, R, Mann, M: Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422: 198-207, 2003.
79. Thornalley, PJ, Battah, S, Ahmed, N, Karachalias, N, Agalou, S, Babaei-Jadidi, R, Dawnay, A: Quantitative screening of advanced glycation endproducts in

- cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *The Biochemical journal*, 375: 581-592, 2003.
80. Ahmed, N, Argirov, OK, Minhas, HS, Cordeiro, CA, Thornalley, PJ: Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *The Biochemical journal*, 364: 1-14, 2002.
81. Morcos, M, Du, X, Pfisterer, F, Hutter, H, Sayed, AA, Thornalley, P, Ahmed, N, Baynes, J, Thorpe, S, Kukudov, G, Schlotterer, A, Bozorgmehr, F, El Baki, RA, Stern, D, Moehrlen, F, Ibrahim, Y, Oikonomou, D, Hamann, A, Becker, C, Zeier, M, Schwenger, V, Miftari, N, Humpert, P, Hammes, HP, Buechler, M, Bierhaus, A, Brownlee, M, Nawroth, PP: Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging cell*, 7: 260-269, 2008.
82. Wojtala, A, Bonora, M, Malinska, D, Pinton, P, Duszynski, J, Wieckowski, MR: Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods Enzymol*, 542: 243-262, 2014.
83. Boulin, T, Etchberger, JF, Hobert, O: Reporter gene fusions. *WormBook : the online review of C elegans biology*: 1-23, 2006.
84. Schlotterer, A, Pfisterer, F, Kukudov, G, Heckmann, B, Henriquez, D, Morath, C, Kramer, BK, Hammes, HP, Schwenger, V, Morcos, M: Neuronal damage and shortening of lifespan in *C. elegans* by peritoneal dialysis fluid: Protection by glyoxalase-1. *Biomed Rep*, 8: 540-546, 2018.
85. Petrascheck, M, Miller, DL: Computational Analysis of Lifespan Experiment Reproducibility. *Frontiers in genetics*, 8: 92, 2017.
86. Zucca, P, Fernandez-Lafuente, R, Sanjust, E: Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21, 2016.
87. Zhang, H, Davies, KJA, Forman, HJ: Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free radical biology & medicine*, 88: 314-336, 2015.
88. Blackwell, TK, Steinbaugh, MJ, Hourihan, JM, Ewald, CY, Isik, M: SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free radical biology & medicine*, 88: 290-301, 2015.
89. Corish, P, Tyler-Smith, C: Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein engineering*, 12: 1035-1040, 1999.
90. Kenyon, CJ: The genetics of ageing. *Nature*, 464: 504-512, 2010.
91. Laranjeiro, R, Harinath, G, Hewitt, JE, Hartman, JH, Royal, MA, Meyer, JN, Vanapalli, SA, Driscoll, M: Swim exercise in *Caenorhabditis elegans* extends neuromuscular and gut healthspan, enhances learning ability, and protects against neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116: 23829-23839, 2019.
92. Kumsta, C, Thamsen, M, Jakob, U: Effects of oxidative stress on behavior, physiology, and the redox thiol proteome of *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants & redox signaling*, 14: 1023-1037, 2011.
93. Kaeberlein, M: How healthy is the healthspan concept? *GeroScience*, 40: 361-364, 2018.
94. Benzi, L, Cecchetti, P, Ciccarone, AM, Nardone, A, Merola, E, Maggiorelli, R, Campi, F, Di Cianni, G, Navalesi, R: Inhibition of endosomal acidification in normal cells mimics the derangements of cellular insulin and insulin-receptor metabolism observed in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental*, 46: 1259-1265, 1997.

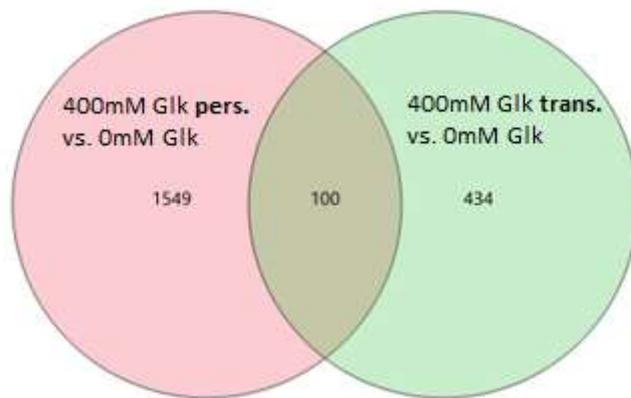
95. Lee, SG, Yim, YS, Lee, YH, Lee, BW, Kim, HS, Kim, KS, Lee, YW, Kim, JH: Fasting serum amino acids concentration is associated with insulin resistance and pro-inflammatory cytokines. *Diabetes research and clinical practice*, 140: 107-117, 2018.
96. Gao, AW, Smith, RL, van Weeghel, M, Kamble, R, Janssens, GE, Houtkooper, RH: Identification of key pathways and metabolic fingerprints of longevity in *C. elegans*. *Experimental gerontology*, 113: 128-140, 2018.
97. de la Cruz, J, Gómez-Herreros, F, Rodríguez-Galán, O, Begley, V, de la Cruz Muñoz-Centeno, M, Chávez, S: Feedback regulation of ribosome assembly. *Current genetics*, 64: 393-404, 2018.
98. Smekalova, EM, Gerashchenko, MV, O'Connor, PBF, Whittaker, CA, Kauffman, KJ, Fefilova, AS, Zatsepin, TS, Bogorad, RL, Baranov, PV, Langer, R, Gladyshev, VN, Anderson, DG, Koteliansky, V: In Vivo RNAi-Mediated eIF3m Knockdown Affects Ribosome Biogenesis and Transcription but Has Limited Impact on mRNA-Specific Translation. *Molecular therapy Nucleic acids*, 19: 252-266, 2020.
99. Turi, Z, Lacey, M, Mistrik, M, Moudry, P: Impaired ribosome biogenesis: mechanisms and relevance to cancer and aging. *Aging*, 11: 2512-2540, 2019.
100. Maqbool, M, Hoda, N: GSK3 Inhibitors in the Therapeutic Development of Diabetes, Cancer and Neurodegeneration: Past, Present and Future. *Current pharmaceutical design*, 23: 4332-4350, 2017.
101. Buchan, JR, Parker, R: Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular cell*, 36: 932-941, 2009.
102. Pu, M, Ni, Z, Wang, M, Wang, X, Wood, JG, Helfand, SL, Yu, H, Lee, SS: Trimethylation of Lys36 on H3 restricts gene expression change during aging and impacts life span. *Genes & development*, 29: 718-731, 2015.
103. Gems, D, de la Guardia, Y: Alternative Perspectives on Aging in *Caenorhabditis elegans*: Reactive Oxygen Species or Hyperfunction? *Antioxidants & redox signaling*, 19: 321-329, 2013.
104. Ralser, M, Wamelink, MM, Kowald, A, Gerisch, B, Heeren, G, Struys, EA, Klipp, E, Jakobs, C, Breitenbach, M, Lehrach, H, Krobitsch, S: Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of biology*, 6: 10, 2007.
105. Bazopoulou, D, Knoefler, D, Zheng, Y, Ulrich, K, Oleson, BJ, Xie, L, Kim, M, Kaufmann, A, Lee, YT, Dou, Y, Chen, Y, Quan, S, Jakob, U: Developmental ROS individualizes organismal stress resistance and lifespan. *Nature*, 576: 301-305, 2019.
106. Alcántar-Fernández, J, Navarro, RE, Salazar-Martínez, AM, Pérez-Andrade, ME, Miranda-Ríos, J: *Caenorhabditis elegans* respond to high-glucose diets through a network of stress-responsive transcription factors. *PloS one*, 13: e0199888, 2018.
107. Kaiser, N, Sasson, S, Feener, EP, Boukobza-Vardi, N, Higashi, S, Moller, DE, Davidheiser, S, Przybylski, RJ, King, GL: Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes*, 42: 80-89, 1993.
108. Klip, A, Marette, A, Dimitrakoudis, D, Ramlal, T, Giacca, A, Shi, ZQ, Vranic, M: Effect of diabetes on glucoregulation. From glucose transporters to glucose metabolism in vivo. *Diabetes care*, 15: 1747-1766, 1992.
109. Aleshin, AE, Zeng, C, Bourenkov, GP, Bartunik, HD, Fromm, HJ, Honzatko, RB: The mechanism of regulation of hexokinase: new insights from the crystal

- structure of recombinant human brain hexokinase complexed with glucose and glucose-6-phosphate. *Structure (London, England : 1993)*, 6: 39-50, 1998.
110. Rabbani, N, Thornalley, PJ: Hexokinase-2 Glycolytic Overload in Diabetes and Ischemia-Reperfusion Injury. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 30: 419-431, 2019.
111. Liu, H, Ding, J, Köhnlein, K, Urban, N, Ori, A, Villavicencio-Lorini, P, Walentek, P, Klotz, LO, Hollemann, T, Pfirrmann, T: The GID ubiquitin ligase complex is a regulator of AMPK activity and organismal lifespan. *Autophagy*, 16: 1618-1634, 2020.
112. Zimmermann, S, Zarse, K, Schulz, TJ, Siems, K, Müller-Kuhrt, L, Birringer, M, Ristow, M: A cell-based high-throughput assay system reveals modulation of oxidative and nonoxidative glucose metabolism due to commonly used organic solvents. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 40: 29-37, 2008.
113. Braeckman, BP, Houthoofd, K, Vanfleteren, JR: Intermediary metabolism. *WormBook : the online review of C elegans biology*: 1-24, 2009.
114. Detienne, G, Van de Walle, P, De Haes, W, Schoofs, L, Temmerman, L: SKN-1-independent transcriptional activation of glutathione S-transferase 4 (GST-4) by EGF signaling. *Worm*, 5: e1230585, 2016.
115. Schmeisser, S, Priebe, S, Groth, M, Monajembashi, S, Hemmerich, P, Guthke, R, Platzer, M, Ristow, M: Neuronal ROS signaling rather than AMPK/sirtuin-mediated energy sensing links dietary restriction to lifespan extension. *Molecular metabolism*, 2: 92-102, 2013.
116. Weimer, S, Prieb, J, Kuhlow, D, Groth, M, Priebe, S, Mansfeld, J, Merry, TL, Dubuis, S, Laube, B, Pfeiffer, AF, Schulz, TJ, Guthke, R, Platzer, M, Zamboni, N, Zarse, K, Ristow, M: D-Glucosamine supplementation extends life span of nematodes and of ageing mice. *Nature communications*, 5: 3563, 2014.
117. Chandler-Brown, D, Choi, H, Park, S, Ocampo, BR, Chen, S, Le, A, Sutphin, GL, Shamieh, LS, Smith, ED, Kaeberlein, M: Sorbitol treatment extends lifespan and induces the osmotic stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in genetics*, 6: 316, 2015.
118. Lamitina, ST, Strange, K: Transcriptional targets of DAF-16 insulin signaling pathway protect *C. elegans* from extreme hypertonic stress. *American journal of physiology Cell physiology*, 288: C467-474, 2005.
119. Takamiya, S, Mita, T: Large-scale purification of active liquid-cultured *Caenorhabditis elegans* using a modified Baermann apparatus. *Parasitol Int*, 65: 580-583, 2016.

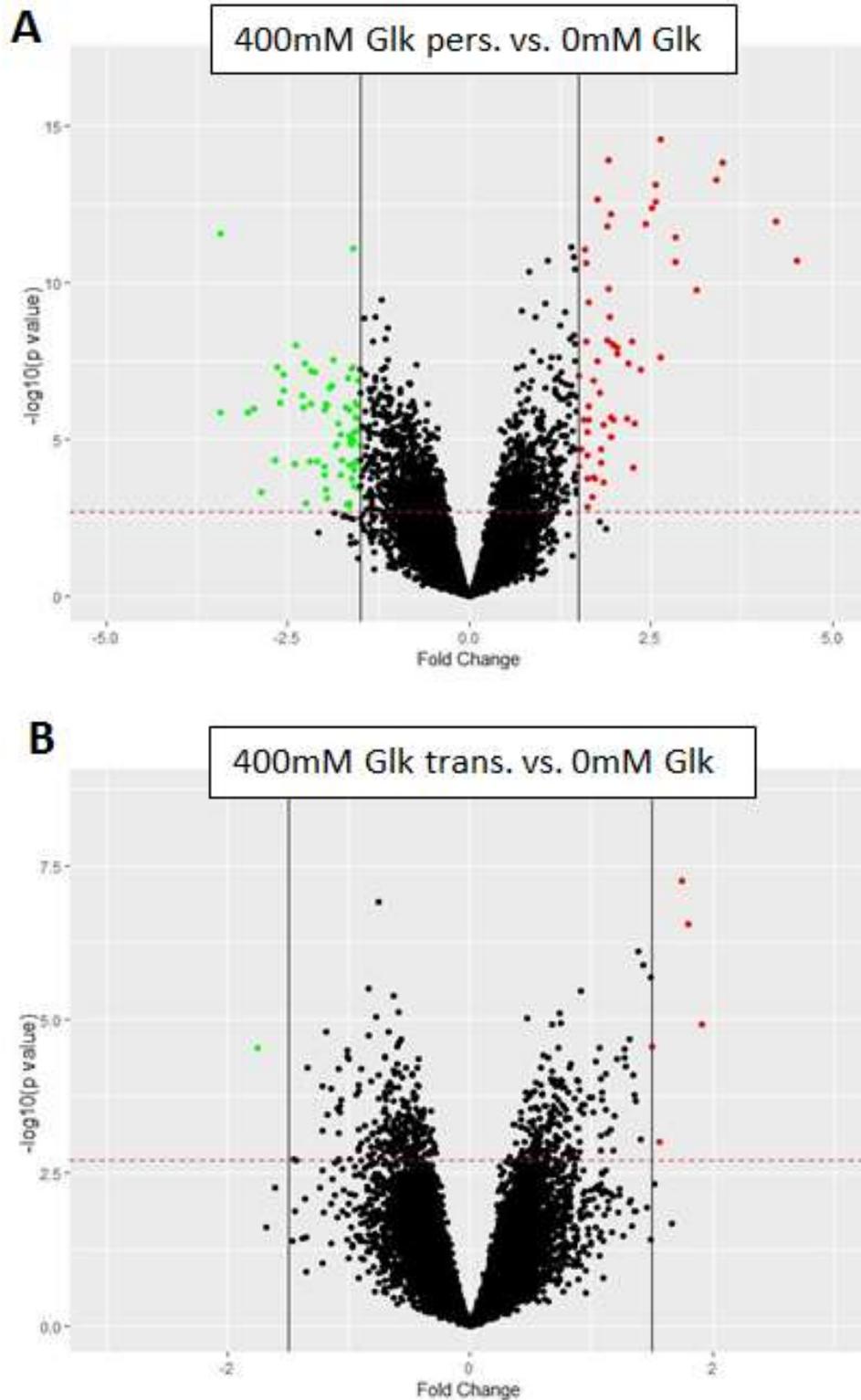
8 ANHANG

DAVID-Analyse		
	KEGG-Signalweg	Fold Enrichment
400mM Glk pers. und trans. vs. 0mM Glk	cel00061:Fettsäurensynthese	27,3
	cel00071:Fettsäureabbau	12,1
	cel01212:Fettsäuremetabolismus	11,6
	cel04146:Peroxisom	8,5
	cel04142:Lysosom	6,8
	cel01100:Metabolische Signalwege	2,1
400mM Glk trans. vs. 0mM Glk	cel03440:Homologe Rekombination	12,2
	cel03460:Fanconi Anämie Signalweg	11,9
	cel03010:Ribosom	5,2
	cel04120:Ubiquitin mediierte Proteolyse	3,0
400mM Glk pers. vs. 0mM Glk	cel00630:Glyoxylat- und Dikarboxylatmetabolismus	5,8
	cel00620:Pyruvatmetabolismus	5,2
	cel00330:Arginin- und Prolinmetabolismus	5,2
	cel00053:Ascorbate and aldarate metabolism	4,6
	cel00020:Zitratzyklus	4,6
	cel00062:Elongation von Fettsäuren	4,3
	cel00650:Butanoatmetabolismus	4,2
	cel01040:Biosynthese von ungesättigten Fettsäuren	4,0
	cel00830:Retinolmetabolismus	3,9
	cel01200:Karbonmetabolismus	3,7
	cel00350:Tyrosinmetabolismus	3,6
	cel00983:Medikamentenmetabolismus	3,6
	cel00071:Fettsäureabbau	3,5
	cel01212:Fettsäuremetabolismus	3,3
	cel04146:Peroxisom	3,3
	cel00010:Glykolyse, Glukoneogenese	3,2
	cel00260:Glycin-, Serin- und Threoninmetabolismus	3,2
	cel00190:Oxidative Phosphorylierung	3,1
	cel00982:Medikamentenmetabolismus	3,1
	cel00980:Metabolismus von Xenobiotika durch Zytochrom P450	3,0
	cel01130:Biosynthese von Antibiotika	2,9
	cel00380:Tryptophanmetabolismus	2,9
	cel00280:Valin, Leucin und Isoleucin Abbau	2,8
	cel00270:Cystein- und Methioninmetabolismus	2,7
	cel00310:Lysinabbau	2,5
	cel01230:Biosynthese von Aminosäuren	2,3
cel01100:Metabolische Signalwege	2,2	

Anhang Tab.1: KEGG-Signalweganalyse der Microarraydaten mittels DAVID-Software. Dargestellt sind signifikant differentiell regulierte Signalwege persistenter 400mM GE (blau), transienter GE über 4 Tage (gelb) und überlappende Signalwege in beiden Gruppen (grün) jeweils nach 12 Versuchstagen im Vergleich zur nicht-exponierten Kontrolle.



Anhang Abb.1: Venn Diagramm der Microarray-Transkriptomdaten: Anzahl signifikant regulierter Gene ($p < 0,05$) nach 12 Tagen persistenter 400mM GE (rosa) und über 4 Tage transients 400mM GE (grün) jeweils im Vergleich zu nicht-exponierten Kontrollen. Im überlappenden Bereich werden die Gene dargestellt, dessen Expression unter beiden Interventionen reguliert war; $n=6$.



Anhang Abb. 2.: Volcano Plots der Microarray-Transkriptomdaten: Dargestellt sind differentiell regulierte Gene nach 12 Tagen persistenter 400mM GE (A), sowie 12 Tagen transienter 400mM GE jeweils im Vergleich zu gleichalten, nicht-exponierten Kontrollen. Rot gekennzeichnet sind hochregulierte Gene mit $\text{adj. } p < 0,05$; $\text{FC} > 1,5$; grün gekennzeichnet sind runterregulierte Gene mit $\text{adj. } p < 0,05$; $\text{FC} < -1,5$. Gene, die nicht diesen Kriterien entsprechen sind in schwarz dargestellt.

9 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Murillo, Katharina
Geburtsdatum: 22.02.1989
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: verheiratet
Vater: Kohl, Heinz-Helmut
Mutter: Kohl, Maria

SCHULISCHER WERDEGANG

2001 – 2008 Vincent-Lübeck-Gymnasium Stade
25.06.2008 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2013/14 Beginn des Studiums Humanmedizin an der Universität Heidelberg
31.08.2015 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2015 – 2019 Hauptstudium, Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
2019 – 2020 Praktisches Jahr
23.06.2020 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3), Note: gut

10 DANKSAGUNG

Prof. Hammes möchte ich an erster Stelle für die Überlassung und gemeinsame Weiterentwicklung des Themas danken. Während der „Junior Scientific Masterclass“ weckten Sie mein Interesse an wissenschaftlichen Arbeiten und meine Motivation Energie in eine anspruchsvolle, laborexperimentelle Doktorarbeit zu investieren. Dank Ihrer Organisation konnte ich ein Projekt im Graduiertenkolleg DIAMICOM 1874/1 übernehmen und in diesem Rahmen von wissenschaftlicher und finanzieller Förderung während der Projektphase profitieren. Die Möglichkeit neben dem Studium auf Kongressen und der Spring School Feedback zur eigenen Forschung zu bekommen und andere Forschungsfelder kennenzulernen habe ich sehr geschätzt.

Für die organisatorische und technische Unterstützung danke ich Katharina Häring, Kübra Özer, Nadine Dietrich, Jacqueline Raum und Dr. Andrea Schlotterer, ohne die die Planung und Ausführung der aufwendigen Versuche nicht möglich gewesen wäre und auch viel weniger Spaß gemacht hätte.

Zusätzlich danke ich Kübra Özer für die Überlassung der Daten zur ROS- und Teilversuchen zur Glukosemessung zur Komplettierung meiner Ergebnisse.

Dr. Thomas Fleming und Elisabeth Kliemank möchte ich für die Unterstützung bei den massenspektrometrischen AGE-Analysen inklusive einigem Troubleshooting und Brainstorming danken, was mein Projekt vorangebracht hat.

Dr. Carolina de la Torre möchte ich für die Begleitung bei den Microarray-Analysen danken. Lucas Wiggenhauser danke ich für die Inspiration eine Methode zu publizieren und für die Unterstützung als Studentensprecher von DIAMICOM.

Für die Unterstützung bei der Erstellung und Korrektur dieser Arbeit möchte ich Jacqueline Raum, und Steffen Hettler danken.

Daneben möchte ich vielen anderen wie Matthias Kolibabka, Maximilian Janssen, Dr. Bogdan Jovanovic, Prof. Dr. Georg Stöcklin, Ulrike Kaiser, Dr. Paulus Wohlfahrt, Elke Deckert, Dr. Jakob Morgenstern und Dr. Christoph Hangel für die Zusammenarbeit in anderen Projekten danken, die nicht in diese Arbeit miteinfließen konnten.

Dem Laborteam möchte ich für einen guten Zusammenhalt danken und die Überzeugung, dass was lange währt, auch endlich gut wird.

Last, but not least geht mein Dank an meine Familie, Freunde und meinen Mann Luis, der wohl den größten Teil der mentalen Unterstützung übernommen hat.