

Determinanten der Lebenserwartung und Stressresistenz
bei der ponerinen Ameisenart *Harpegnathos saltator*
(Jerdon 1851)

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Sebastian Schneider

aus Würzburg

Kiel, Mai 2009

Referent: Prof. Dr. Thomas Roeder

Korreferent: Prof. Dr. Wolfgang Rössler

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	6
1. EINLEITUNG	8
1.1 Einführung	8
1.2 Die Biologie des Alterns	9
1.2.1 Biologische Definition des „Alterns“	9
1.2.2 Ultimate Theorien	10
1.2.3 Proximate Theorien zu den genetisch-entwicklungsbiologischen Gründen des Alterns	12
1.2.3.1 Die Theorie der Langlebigkeitsgene	12
1.2.3.2 Die Theorie der zellulären Seneszenz	13
1.2.3.5 Immunologische Theorie	14
1.2.4 Stochastische Theorien	16
1.2.4.4 Die freie-Radikal-Theorie	16
1.3 Stressoren, Mortalität und Altern	17
1.3.1 Oxidativer Stress	18
1.3.1.1 Die Quellen der reaktiven Sauerstoffspezies	18
1.3.1.2 ROS-bedingte Schäden	19
1.3.1.3 Schutzmechanismen gegen ROS	20
1.3.1.4 Antioxidanzien, oxidativer Stress und Lebenserwartung	24
1.3.2 Pathogene als Stressoren	25
1.3.2.1 Die Pathogenabwehr bei Insekten	25
1.4 Problematik des Arbeitens mit Modellorganismen	29
1.4.1 Die Nachteile etablierter Modellorganismen	29
1.4.2 Eusoziale Organismen als Ausweg	29
1.4.2.1 Eusozialität	30
1.4.2.2 Eusoziale Hymenopteren als Modellorganismen für die Altersforschung	30
1.4.3 <i>Harpegnathos saltator</i>	32
1.5 Zielsetzung der Arbeit	34
2. MATERIAL UND METHODEN	36
2.1 Verwendete Materialien	36
2.2 Die Versuchstiere	37
2.2.1 Der Koloniezyklus von <i>Harpegnathos saltator</i>	37
2.2.2 Haltung der <i>Harpegnathos saltator</i> Kolonien	39
2.2.3 Auswahl und Einteilung der Versuchstiere	39

2.3. Überlebensversuche	41
2.2.1 Die Injektionsprozedur	42
2.2.2 Resistenz gegen oxidativen Stress	42
2.2.3 Resistenz gegen Pathogen	42
2.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten und des Glutathiongehalts	43
2.4.1 Aufbereitung der Versuchstiere	43
2.4.2 Bestimmung der SOD-Aktivität	43
2.4.3 Bestimmung der Catalaseaktivität	44
2.4.4 Bestimmung der GPx-Aktivität	45
2.4.5 Bestimmung der GST-Aktivität	46
2.4.6 Bestimmung des Glutathiongehalts	47
2.4.7 Proteinbestimmung	49
2.5 Statistische Auswertung	50
3. ERGEBNISSE	51
3.1 Oxidativer Stress	51
3.1.1 Gamergaten und Arbeiterinnen zeigen unterschiedliche Resistenz gegenüber oxidativem Stress	51
3.1.2 Sozialer Stress durch Aggression beeinflusst die ROS-Resistenz kaum	52
3.2 Pathogene -	53
3.2.1 Unterschiedliche Resistenz von Gamergaten und Arbeiterinnen nach einer bakteriellen Infektion	53
3.2.2 Aggression hat einen Einfluss auf das Immunsystem	54
3.3 Einfluss von durch Isolation ausgelöstem sozialem Stress auf die Resistenzen	55
3.3.1 In Isolation gehaltene Arbeiterinnen haben eine veränderte ROS-Resistenz	55
3.3.2 Soziale Isolation hat Auswirkungen auf das Immunsystem von Arbeiterinnen	58
3.4 Die antioxidativen Abwehrsysteme von <i>Harpegnathos saltator</i> variieren nach Alter, Gruppenzugehörigkeit und Stress	60
3.4.1 Aktivitäten des antioxidativen Abwehrsystems bei den Standard-Kategorien	60
3.4.1.1 Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen	61
3.4.1.2 Glutathiongehalte	65
3.4.2 Der Zustand des antioxidativen Abwehrsystems unter dem sozialen Stress der Dominanzkämpfe	69
3.4.2.1 Die Aktivitäten der Enzyme	69
3.4.2.2 Der Glutathiongehalt	74
3.4.3 Die Aktivitäten der Superoxid-Dismutasen und Catalase nach Induktion von oxidativem Stress bei Gamergaten und Arbeiterinnen	78
3.4.4 Der Einfluss von sozialer Isolation auf die Aktivitäten der Superoxid-Dismutasen und der Catalase	80
3.5 Übersichtstabelle zu den Enzymaktivitäten und Glutathionspiegeln	82
4. DISKUSSION	83
4.1 Die Situation der natürlichen Gruppen	84
4.1.1 Die Resistenzen gegen ROS und Pathogene sind kasten- und situationsspezifisch	84
4.1.2 Die verschiedenen Kasten von <i>Harpegnathos saltator</i> weisen Unterschiede in ihren ROS-Abwehrsystemen auf	85
4.1.2.1 Zwischen den Gruppen bestehen Unterschiede in den Aktivitäten des antioxidativen Abwehrsystems	85
4.1.2.2 Der Glutathionhaushalt der natürlichen Gruppen	89
4.1.3 Vergleich von <i>Harpegnathos saltator</i> mit Modelorganismen und anderen eusozialen Hymenopteren	90
4.2 Der Einfluss sozialen Stresses	91
4.2.1 Aggression als Stressor	92
4.2.1.1 Individuen, die aktiv in Dominanzkämpfe verwickelt sind, weisen eine geringere Toleranz gegenüber Pathogenen, nicht jedoch gegenüber oxidativen Stress auf.	92

4.2.1.2 Glutathionspiegel und Enzymaktivitäten unter durch Aggression ausgelösten Stress	92
4.2.2 Isolation als Stressor	94
4.2.2.1 Isolierte Arbeiterinnen regulieren ihre Stresstoleranz	94
4.2.2.2 Die Aktivitäten der Catalase verändern sich bei in Isolation gehaltenen Tieren	95
4.3 Alternative Hypothesen zum Zusammenhang zwischen Resistenz und Lebensspanne	96
4.4 Fazit	97
5.A SUMMARY	99
5.B ZUSAMMENFASSUNG	100
6. LITERATURVERZEICHNIS	102
Erklärung	119
Danksagung	120
Lebenslauf	121

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Reduktion von Sauerstoff zu Wasser (modifiziert nach Fridovich 1978)	19
Abbildung 2:	Nettoreaktion des von Superoxid-Dismutasen katalysierten Abbaus von Superoxid-Anion-Radikalen (modifiziert nach Culotta et al. 2006).	21
Abbildung 3:	Nettoreaktionen der katalytischen (I) und peroxidativen (II) Aktivität der Catalase (Modifiziert nach Halliwell und Gutteridge 2007).	22
Abbildung 4:	Glutathion in der reduzierten Form GSH (A) und in der oxidierten Form GSSG (B) (modifiziert nach Sies 1997, Halliwell & Gutteridge 2007).	23
Abbildung 5:	Lebensspannen von Spezies innerhalb der vier Hauptgruppen der eusozialen Insekten (modifiziert nach Carey 2001).	31
Abbildung 6:	Nest einer Harpegnathos saltator Kolonie mit Arbeiterinnen, Eiern, Larven und einer Puppe. Im Zentrum befindet sich die Königin (gelb umrandet).	32
Abbildung 7:	Entwickelte Ovarien einer Gamergate mit Oocyten (A) und nicht entwickelte Ovarien einer Arbeiterin (B).	33
Abbildung 8:	Anzahl der Duelle der späteren Gamergaten pro fünf Minuten (modifiziert nach Schneider 2005)	34
Abbildung 9:	Entwicklungszyklus einer Harpegnathos saltator Kolonie (modifiziert nach Peeters & Hölldobler 1995).	38
Abbildung 10:	Exemplarische Standardkurve der Catalasemessung	45
Abbildung 11:	Exemplarische Standardkurve der GPx-Bestimmung	46
Abbildung 12:	Exemplarische Standardkurve der GST-Bestimmung	47
Abbildung 13:	Exemplarische Standardkurve der Glutathion-Bestimmung	48
Abbildung 14:	Exemplarische Standardkurve der Proteinbestimmung nach BCA-Methode	49
Abbildung 15:	Überlebenskurven nach Induktion von oxidativem Stress.	52
Abbildung 19:	Überlebenskurven nach Induktion von oxidativem Stress.	56
Abbildung 20:	Überlebenskurven nach Induktion von oxidativem Stress.	57
Abbildung 21:	Überlebenskurven nach Induktion von oxidativem Stress.	57
Abbildung 22:	Überlebenskurven nach Infektion mit Erwinia carotovora.	58
Abbildung 23:	Überlebenskurven nach Infektion mit Erwinia carotovora.	59
Abbildung 24:	Überlebenskurven nach Infektion mit Erwinia carotovora.	60
Abbildung 25:	Aktivität der Catalase in Gesamtkörperhomogenaten der Standard-Kategorien	61
Abbildung 26:	Aktivität der Superoxid-Dismutase im Gesamtkörperhomogenat der Standard-Kategorien.	62
Abbildung 27:	Aktivität der Glutathion-Peroxidase im Gesamtkörperhomogenat der Standardkategorien	63
Abbildung 28:	Aktivität der Glutathion-S-Transferase im Gesamtkörperhomogenat der Standard-Kategorien	64
Abbildung 29:	Gehalt an Gesamtglutathion im Gesamtkörperhomogenat der Standard-Kategorien	65
Abbildung 30:	Gehalte an oxidiertem Glutathion im Gesamtkörperhomogenat der Standard-Kategorien	66
Abbildung 31:	Gehalte an reduziertem Glutathion im Gesamtkörperhomogenat der Standard-Kategorien	67
Abbildung 32:	GSH/GSSG-Ratio der Standard-Kategorien	68
Abbildung 33:	Aktivität der Catalase im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen	69
Abbildung 34:	Aktivität der Superoxid-Dismutase im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen.	70
Abbildung 35:	Aktivität der Glutathion-Peroxidase im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen.	71
Abbildung 36:	Aktivität der Glutathion-S-Transferase im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen.	72
Abbildung 37:	Aktivität der Glutathion-Peroxidase Glutathion-S-Transferase im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen.	73
Abbildung 38:	Gehalte an gesamtem Glutathion im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen	74
Abbildung 39:	Gehalte an oxidiertem Glutathion im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen.	75

Abbildung 40: Gehalte an reduziertem Glutathion im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen	76
Abbildung 41: GSH/GSSG-Ratio der Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen	77
Abbildung 42: Aktivität der Catalase in Gesamtkörperhomogenat Arbeiterinnen und Gamergaten mit und ohne Paraquat-Behandlung.	78
Abbildung 43: Aktivität der Superoxid-Dismutase im Gesamtkörperhomogenat Arbeiterinnen und Gamergaten mit und ohne Paraquat-Behandlung.	79
Abbildung 44: Aktivität der Catalase im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen, Gamergaten und vorisolierten Arbeiterinnen.	80
Abbildung 45 : Aktivität der Superoxid-Dismutase im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen, Gamergaten und vorisolierten Arbeiterinnen.	81
Tabelle 1: Zusammenfassung der Enzymaktivitäten und Glutathionspiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe Arbeiterin.	82

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielle Peptide
Apo	Apolipoprotein
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
cGPx	cytosolische/zelluläre Glutathion-Peroxidase
CumH ₂ O ₂	Cumenehydroperoxid
CuZnSOD	Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase
DAP	Diaminopimelinsäure (<i>diaminopimelic acid</i>)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSCAM	Down-Syndrom Zellanhaftungsmoleküle (<i>Down syndrome cell adhesion molecule</i>)
DTNB	5,5'-Dithio-bis(nitrobenzoesäure)
EC-SOD	Extrazelluläre Superoxid-Dismutase
FeSOD	Eisen-Superoxid-Dismutase
GR	Glutathion-Reduktase
GPx	Glutathion-Peroxidase
GSH	Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion; Glutathion-Disulfid
GST	Glutathion-S-Transferase
GSx	Gesamtglutathion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
LB	Luria-Bertani
MLSP	Maximale potentielle Lebensspanne (<i>maximal lifespan potential</i>)
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
mtDNS	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NiSOD	Nickel-Superoxid-Dismutase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)

PGRP	Peptidoglycan Erkennungsprotein (<i>peptidoglycan recognition protein</i>)
PO	Phenoloxidase
PRR	Mustererkennungsrezeptor (<i>pattern recognition receptor</i>)
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies (<i>reactive oxygen species</i>)
SOD	Superoxid-Dismutase

1. Einleitung

1.1 Einführung

Eine der definierenden Eigenschaften der menschlichen Kultur ist die Beschäftigung mit der Endlichkeit der individuellen Existenz. Zu den ältesten erhaltenen kulturellen Zeugnissen der *Homini* zählen Gräber, in denen sich Beigaben wie Gebrauchsgegenstände aus dem Alltagsleben des Verstorbenen aber auch Blüten oder speziell gefertigter Totenschmuck befanden. Die Beschäftigung mit dem Thema Altern und Tod zieht sich wie ein roter Faden durch die Kulturgeschichte des Menschen und so nimmt es nicht Wunder, dass dem Thema auch heute noch großes Interesse entgegengebracht wird.

Da es sich bei „Altern und Tod“ um ein so zentrales Thema handelt, kann es nicht verwundern, dass die Wissenschaft sich eingehend mit dem Problem beschäftigt. Gerade in einer Gesellschaft wie der westlich geprägten, in der die Lebenserwartung nach Jahrhunderten relativer Stabilität seit dem 19. Jahrhundert beinahe kontinuierlich ansteigt, in Deutschland ist die Sterblichkeit seit Gründung des deutschen Reichs 1871 um etwa 0,8 % pro Jahr zurückgegangen und in den letzten 15 Jahren hat sich der Rückgang auf 2 % beschleunigt (Statistisches Bundesamt 2006), erhält die Frage nach den physiologischen Ursachen von Altern und Tod neben der sozialen auch eine ökonomische Dringlichkeit.

Ein wichtiger Aspekt, der bei Betrachtungen zum Thema „Altern und Tod“ nicht außen vor gelassen werden kann, sind die Faktoren, die zu negativen Alterserscheinungen und damit letztendlich zum Tod führen. Ein Großteil dieser Faktoren kann unter dem Begriff „Stress“ zusammengefasst werden. Dabei ist der Oberbegriff „Stress“ äußerst weit gefasst und bezeichnet negative Auswirkungen so verschiedener Einflüsse wie den Stressoren Hunger, ungünstige Temperaturen, endogene und exogene toxische Substanzen oder Strahlung. Neben diesen physischen Stressoren gibt es psychische Stressoren wie ein Mangel an Sozialkontakten, ein Übermaß an Sozialkontakten, Unterdrückung durch Artgenossen aber auch Ausübung einer dominanten Position in einer sozialen Gruppe. All diese Faktoren beeinflussen das Fortschreiten des Alterungsprozess'. Gerade in Europa und Nordamerika stellen Krankheiten, die durch Stress ausgelöst werden, einen bedeutenden Faktor bei der Begrenzung der Lebensspanne dar. So lag beispielsweise der akute Herzinfarkt im Jahr 2004 an zweiter Stelle der Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt 2004). Stressoren dürfen also bei einer eingehenden Erforschung der Ursachen und Mechanismen des Alterungsprozess' nicht vernachlässigt werden.

Kirkwood (2005) bezeichnete den Alterungsprozess als den Aspekt der menschlichen Biologie, der uns der Vertrauteste und der dennoch der am schlechtesten Verstandene ist. In den letzten Jahrzehnten wurden folglich zahlreiche Theorien zu den Gründen und Mechanismen des Alterungsprozesses entwickelt. Da sie jedoch nur Teilaspekte des komplexen Puzzles „Altern“ abdecken, ist keine dieser Theorien generell anerkannt (Harman 1998, Vina *et al.* 2007). Aufgrund der Komplexität der Materie ist eine solche universelle Theorie des Alterns möglicherweise ausgeschlossen (Troen 2003). Das folgende Kapitel soll einen Einblick in die verschiedenen Theorien zur Physiologie und Evolution des Alterns liefern.

1.2 Die Biologie des Alterns

1.2.1 Biologische Definition des „Alterns“

Je komplexer sich ein Sachverhalt oder Prozess darstellt, umso schwieriger ist es, eine allgemein anerkannte Definition dafür zu finden. Der so facettenreiche Themenbereich des biologischen Alterungsprozess` bildet da keine Ausnahme. Die Definition, die hier Anwendung finden soll, beschreibt den Alterungsprozess als die mit der Zeit fortschreitende Anhäufung von Veränderungen, die einhergeht mit oder verantwortlich ist für eine zunehmende Anfälligkeit gegenüber Krankheiten und Tod (Harman 1981). Zu diesen Veränderungen zählen (Troen 2003):

1. Eine Abnahme der physiologischen Leistungsfähigkeit, zum Beispiel der Nierenleistung, des maximalen Atemvolumens und der maximalen Herzfrequenz (Shock 1985).
2. Ein Rückgang der Fähigkeit zur Erhaltung der Homöostase unter Einfluss von Umweltstressoren, wie zum Beispiel Hunger und körperlicher Anstrengung (Adelman *et al.* 1978).
3. Eine Zunahme der Krankheitsanfälligkeit mit fortschreitendem Alter.
4. Die Zunahme der Sterblichkeitsrate nach Beendigung des körperlichen Reifungsprozess`.
5. Biochemische Veränderungen wie Unterschiede in der Transkriptionsrate bestimmter Gene und der Translationrate und post-translationaler Modifikation bestimmter Proteine (Finch 1990, Schneider & Rowe 1996).

Troen (2003) unterscheidet beim Alterungsprozess weiterhin zwischen normalem (engl. *normal*) Altern, womit unumgängliche Begleiterscheinungen des Alterns gemeint sind

und gewöhnlichem (engl. *usual*) Altern, das sich auf Alterserscheinungen bezieht, die auftreten können, und dies während des Alterungsprozess für gewöhnlich auch tun, aber nicht müssen. Dabei hat das normale Altern intrinsische, genetisch-entwicklungsbiologische Ursachen während das gewöhnliche Altern von extrinsischen, stochastischen Faktoren gesteuert wird. In den folgenden Kapiteln sollen einige der wichtigsten der über 300 Theorien (Medvedev 1990) zu genetisch-entwicklungsbiologischen und stochastischen Ursachen des Alterns kurz erläutert werden. Darüber hinaus sollen neben diesen proximativen Theorien zu den Mechanismen des Alterns auch die ultimativen Theorien zu den Ursachen des Alterns vorgestellt werden.

1.2.2 Ultimate Theorien

„Nichts in der Biologie ergibt einen Sinn außer im Lichte der Evolution“, ist eine der bekanntesten Aussagen der Evolutionsbiologie (Dobzhansky 1973). Gemäß dieser Aussage sollte auch der Alterungsprozess evolutionärer Kontrolle in der einen oder anderen Form unterliegen. Ein Hinweis darauf bietet die Tatsache, dass die maximale theoretische Lebensspanne (*maximum life span potential* MLSP), basierend auf dem Alter des ältesten Individuums, artspezifisch und vermutlich zur genetischen Begrenzung der Lebensspanne proportional ist (Cutler 1979). Als MLSP von *Homo sapiens* wird 122 Jahre angenommen, das Alter von Jeanne Louise Calment (21.2.1875 – 4.8.1997; Harman 1998; Robine & Allard 1998; Knight 2000), dem Menschen mit der längsten nachgewiesenen Lebensspanne. Unser naher Verwandter *Pan troglodytes* hat mit 56 Jahren eine nicht einmal halb so lange MLSP (Cutler 1979; Cutler & Mattson 2006). Die MLSP eines weiteren Säugetiers, der Hausmaus *Mus musculus* beträgt nur ein Dreißigstel der menschlichen MLSP und nur ein Zehntel ihres nahen Verwandten, des Nacktmulls *Heterocephalus glaber* (Buffenstein *et al.* 2007). Natürliche Auslese selektiert Individuen nach ihrer Fähigkeit, vor ihrem Tod eine möglichst große Anzahl an Nachkommen zu produzieren von denen eine möglichst große Anzahl das fortpflanzungsfähige Alter erreichen und sich ebenfalls reproduzieren muss (Rose & Graves 1989, Kirkwood 1991). Dabei muss es seine begrenzten Ressourcen auf verschiedene in Konkurrenz stehende Prozesse wie Wachstum, Reproduktion und Instandhaltung (zum Beispiel Reparatur des Soma) verteilen (Kirkwood 2005). Prozesse, die einsetzen, nachdem ein Individuum das fortpflanzungsfähige Alter überschritten hat, entziehen sich weitgehend der natürlichen Selektion. Eine Ausnahme bilden Tiere, die sich auch nachdem sie das fortpflanzungsfähige Alter überschritten haben nahen Verwandten bei der Reproduktion behilflich sind. Nach der Theorie der Verwandtenselektion können sie auf

diese Weise ihre indirekte Fitness erhöhen (Hamilton 1964). Die Alterserscheinungen des post-reproduktiven Lebensabschnitts, sollten diese evolutionärer Kontrolle unterliegen, müssten also Folgeerscheinungen von Strategien sein, die die Fitness in einem frühen Lebensabschnitt auf die eine oder andere Weise steigern und somit Ansatzpunkt für natürliche Selektion sind (Troen 2003). Kirkwood (1986) stellt drei Gruppen von Genen in diesen Zusammenhang:

1. Gene, die schädliche Mutationen tragen, welche erst spät im Leben zum tragen kommen (Akkumulation sich spät auswirkender Mutationen).
2. Gene, die eine frühe Fitness begünstigen sich aber später im Leben negativ auswirken (antagonistische Pleiotropie).
3. Gene, die die Instandhaltung des Soma regulieren (*disposable Soma*).

Die erste Gruppe von Genen entzieht sich der natürlichen Selektion, da sie den Phänotyp erst nach der reproduktiven Phase beeinflussen. Bislang sind die Beispiele für eine solche Anhäufung negativer Mutationen jedoch umstritten (Shaw *et. al* 1999).

Die Anzahl an Beispielen für die zweite Gruppe von Genen nimmt gegenwärtig zu. In den letzten Jahren wurden in zahlreichen Modellorganismen Gene, nachgewiesen, die antagonistisch pleiotrop wirken. In *Caenorhabditis elegans* bewirkt ein teilweiser Verlust der Funktion des insulinrezeptorartigen Proteins DAF-2 zwar einen Zugewinn an Lebensdauer jedoch auch Verluste an Fitness (Jenkins *et al.* 2004). Auch in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* sind Gene deren positiver Einfluss auf die Fertilität negative Konsequenzen für die Lebenserwartung nach sich ziehen (Tu & Tartar 2003, Giannakou *et al.* 2004).

Einige Autoren sind jedoch der Ansicht, dass die Beweislage für antagonistisch pleiotrop wirkende Gene nicht überzeugend ist (Leroi *et al.* 2005).

Die Disposable-Soma-Theorie bietet einen Erklärungsansatz, unter welchen Umständen Gene den Alterungsprozess aufhalten und unter welchen sie ihn zulassen sollten. Sie postuliert, dass eine Instandhaltung der somatischen Zellen, jener Zellen, die nicht zur Keimbahn gehören und deren Erbinformation nicht an die nächste Generation weiter gegeben wird, unter natürlichen Bedingungen nur einen begrenzten Fitnessvorteil bringt (Kirkwood 1977, Kirkwood & Holliday 1979, Kirkwood & Rose 1991). Gene, die für die Instandhaltung des Soma verantwortlich sind, ziehen dafür Ressourcen von anderen wichtigen fitnessrelevanten Aufgaben ab (Kirkwood 2005). Eine Instandhaltung des Soma ergibt unter natürlichen Bedingungen jedoch nur solange Sinn, wie ein Organismus eine reale Überlebenschance und damit Chance auf Fortpflanzung hat. Beispielsweise überleben 90 % der Mäuse in freier Wildbahn das erste Lebensjahr nicht (Phelan & Austad 1989), da ein Grossteil der Population

erfriert (Berry & Bronson 1992). Tatsächlich weisen Mäuse eine MLSP von nur 3 Jahren auf. Es scheint also, dass die Lebensspanne einer Art von den ökologischen Bedingungen abhängt, unter denen sie existiert. Spezies mit einem niedrigen extrinsischen Mortalitätsrisiko profitieren von einer Energieinvestition, die das intrinsische Mortalitätsrisiko begrenzt, während Spezies, deren extrinsisches Mortalitätsrisiko hoch ist, eher von einer Investition in frühe Reproduktion auf Kosten der Erhaltung des Soma profitieren. Untersuchungen in natürlichen Populationen bestätigen diese Muster (Ricklefs 1998). Es gibt jedoch auch Studien, die zu gegenteiligen Ergebnissen kommen. In Populationen des Guppies *Lebistes reticulata*, die unter verschieden stark ausgeprägten extrinsischen Mortalitätsrisiken leben, entwickelte sich das Alterungsmuster entgegen den theoretischen Erwartungen der Disposable-Soma-Theorie (Reznick *et al.* 2004).

Kirkwood (2005) kommt zu dem Schluss, dass der Alterungsprozess keiner evolutionären Kontrolle im Sinne eines programmierten Alterns unterliegt die *per se* Fitnessvorteile für den Organismus bringt. Vielmehr geht er davon aus, dass Investitionen gegen den Alterungsprozess ab einem bestimmten, von extrinsischen Faktoren beeinflussten Punkt keinen angemessenen positiven Einfluss auf die Fitness mehr bedeuten und deshalb unterlassen werden.

1.2.3 Proximate Theorien zu den genetisch-entwicklungsbiologischen Gründen des Alterns

Die Theorien zu den genetischen-entwicklungsbiologischen Ursachen des Alterungsprozess` befassen sich mit intrinsischen Mechanismen, die unabhängig von äußeren Faktoren den Alterungsprozess bewirken.

1.2.3.1 Die Theorie der Langlebigkeitsgene

Es gibt Hinweise darauf, dass die Genprodukte so genannter Langlebigkeitsgene einen Einfluss auf die Lebenserwartung und das Fortschreiten des biologischen Alterns haben. In vielen Familien, bzw. Gruppen mit ähnlicher genetischer Ausstattung, tritt ein hohes Lebensalter gehäuft auf (Abbott *et al.* 1974, Perls & Terry 2003, Schoenmaker *et al.* 2006). So erreichen zum Beispiel Geschwister und Eltern von Menschen, die einhundert Jahre oder älter geworden sind ebenfalls ein höheres Alter als der Durchschnitt der Bevölkerung (Perls *et al.* 2002). Auch die Universalität des Alterungsprozess innerhalb einer Spezies (Johnson *et al.* 1999) sowie die Unterschiede zwischen den Spezies (Cutler & Mattson 2006) deuten darauf hin, dass das Altern einer genetischen Kontrolle unterliegt. Zur Erforschung potentieller

Langlebigkeitsgene bieten sich Modellorganismen an, die durch gentechnische Methoden leicht in der Struktur ihres Erbguts manipulierbar sind (Tower 1996, Tower 2000, Tatar *et al.* 2001). So wurde in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, einem eukaryotischen, jedoch einzelligen Organismus, eine Reihe von Genen nachgewiesen, die sowohl die maximale wie auch die durchschnittliche Lebensdauer positiv beeinflussen können (Jazwinski 1996). Auch der Nematode *Caenorhabditis elegans* und die Taufliege *Drosophila melanogaster* wurden in den letzten Jahren zur Untersuchung des Einflusses bestimmter Gene auf die Lebenserwartung herangezogen (Finch & Tanzi 1997). Tatsächlich wurde in diesen Organismen in den letzten Jahren eine Reihe von Genen identifiziert, deren Mutation drastischen Einfluss auf die Lebenserwartung haben (Johnson *et al.* 2000, Finch & Tanzi 1997, Kenyon 2001). Die Diversität der Wirkungsbereiche dieser Langlebigkeitsgene verdeutlicht, dass sich die einzelnen Theorien zum Alterungsprozess nicht notwendigerweise ausschließen sondern sich im Gegenteil häufig ergänzen und gegenseitig stützen können (Troen 2003). Bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* beispielsweise kann eine Mutation in einem G-Protein-gekoppelten-Rezeptorgen auftreten, was zu einer um 35 % gesteigerten Lebenserwartung führt und dieser Mutation den Namen Methusaleah einbrachte. Zudem besitzen diese Fliegen eine gesteigerte Resistenz gegenüber Hitze- und Hungerstress sowie gegenüber Paraquat, einem Agens, das oxidativen Stress hervorruft (Lin *et al.* 1998). Auch eine Reihe weiterer langlebiger Mutantenlinien von *Drosophila melanogaster* weist eine gesteigerte Resistenz gegenüber oxidativem Stress auf (Dudas & Arkin 1995). Diese Beispiele verdeutlichen, wie sich zwei den Alterungsprozess betreffende Theorien gegenseitig ergänzen: Die freie-Radikale-Theorie des Alterns, die den Alterungsprozess auf Schädigungen der molekularen Integrität der Zellen durch oxidativen Stress zurückführt (Harman 1956), und die Theorie, dass der Alterungsprozess einer genetischen Kontrolle unterliegt.

1.2.3.2 Die Theorie der zellulären Seneszenz

Die Theorie der zellulären Seneszenz besagt, dass Zellen aufgrund intrinsischer Faktoren nur zu einer begrenzten Anzahl an Teilungen in der Lage sind. Dabei wird angenommen, dass die zeitliche Steigerung des Anteils teilungsunfähiger Zellen im Gewebe letztendlich die Alterung des Gesamtorganismus zu Folge hat. Diese Theorie beruht auf der Beobachtung von Hayflick und Moore, dass in Zellkultur gehaltene Zellen nach einiger Zeit ihre Teilungsfähigkeit einbüßen (Hayflick & Moorehead 1965). Des Weiteren belegen Studien an menschlichen (Martin *et al.* 1970) und Ratten-Fibroblasten (Pignolo *et al.* 1992), dass die replikative

Lebensspanne von Fibroblasten *in vitro* entgegengesetzt proportional zum Alter des Spenders ist. Als eine mögliche Erklärung für die begrenzte Teilungsfähigkeit von Zellen wird das Phänomen der Telomer-Verkürzung herangezogen (Harley *et al.* 1991). Telomere, die einzelsträngigen Termini linearer Chromosomen, bestehen aus kurzen, repetitiven Sequenzen (bei Wirbeltieren TTAGGG) die sich mehrere tausendmal wiederholen können. Sie stabilisieren die Struktur der Chromosomen und verhindern deren Fusion und Degradierung (Greider 1990, Dong *et al.* 2005, Shay & Wright 2005, De Semir *et al.* 2007). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verkürzt sich die durchschnittliche Länge dieser Enden mit Zunahme der Teilungen die eine Zelle durchlaufen hat (Harley *et al.* 1991, Allsop *et al.* 1992, Lindsey *et al.* 1991). Diese Verkürzung ist zurückzuführen auf eine nur unvollständige Replikation des DNS-Stranges vor der eigentlichen Zellteilung (Greider 1990; Shay und Wright 2005). In Zellen der Keimbahn, aber auch in immortalisierten und Tumorzellen (Klapper *et al.* 2001) ist eine Telomerase aktiv, eine DNS-Polymerase die an das 3'-Ende des DNS-Stranges *de novo* eine Telomersequenz anfügt (Greider 1990, Dong *et al.* 2005, Feldser & Greider 2007, Shay & Wright 2007). Eine künstliche Verlängerung der Telomere durch die Aktivierung einer reversen Transkriptase mit Telomeraseaktivität konnte die Lebensdauer von Epithelzellen der menschlichen Retina und von Vorhaut-Fibroblasten steigern (Turker & Martin 1999).

Eine weitere mögliche Ursache für zelluläre Seneszenz liefert das Tumorsuppressorgen p53. Das Genprodukt von p53 ist als Transkriptionsfaktor an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse wie der Reparatur der DNS, der Induktion der Apoptose und der Steuerung des Zellzyklus beteiligt (Ryan *et al.* 2001). Mäuse mit erhöhter p53-Aktivität zeigen eine Resistenz gegenüber der Entwicklung von Tumoren, zeigen jedoch andererseits auch vermehrt Symptome wie Osteoporose, eine allgemeine Atrophie der Organe, eingeschränkte Wundheilung, geringere Stresstoleranz, ein geringeres Körpergewicht und frühzeitiges Altern (Tyner *et al.* 2002). Zelluläre Seneszenz, hervorgerufen durch Proteine wie p53, die die Proliferation und den Zellzyklus steuern, könnte also der Preis sein, den ein Organismus für die Verhinderung von Tumoren zahlt (Sager 1991, Campisi *et al.* 1996, Campisi 2001, Troen 2003, Lowe *et al.* 2004, Campisi 2005).

1.2.3.5 Immunologische Theorie

Dem Immunsystem kommt eine tragende Rolle bei der Erhaltung der Gesundheit und der Überlebensfähigkeit eines Organismus zu (Troen 2003, DeVale *et al.* 2004). Aufgrund der Bedeutung des Immunsystems wurde die immunologische Theorie zur Erklärung des Alterungsprozess` entwickelt, die auf zwei beobachtbaren Veränderungen fußt, die mit

zunehmendem Alter eines Organismus auftreten: Zum einen eine generelle Abnahme der Immunkapazität und zum anderen eine Zunahme der Autoimmunreaktionen (Walford 1974), oder, mit anderen Worten, eine Verringerung der eigentlichen Funktion bei gleichzeitiger Steigerung der Nebenwirkungen.

Neuere Studien unterscheiden dabei zwischen dem adaptiven und dem angeborenen Immunsystem: Während das adaptive Immunsystem mit zunehmendem Alter an Wirksamkeit verliert, was zu einer gesteigerten Anfälligkeit gegenüber Pathogenen führt, wird das angeborene Immunsystem hoch reguliert, was wiederum zu chronischen Entzündungen führen kann (DeVale *et al.* 2004).

Zunehmendes Alter geht einher mit einer Verringerung der naiven T-Zellen im Vergleich zu den ausdifferenzierten Gedächtniszellen (Miller 1996, Chakravarti & Abraham 1999). Das Verhältnis zwischen naiven T-Zellen und Gedächtniszellen stellt einen Parameter dar, nach dem sich das physiologische Alter eines Organismus bestimmen und eine Abschätzung seiner Lebenserwartung treffen lässt (DeVale *et al.* 2004). So haben Mäuse mit einer hohen Anzahl naiver CD4-Zellen relativ zur Zahl von CD4- und CD8-Gedächtniszellen sowie CD4/P-Glycoprotein-Zellen eine signifikant erhöhte Lebenserwartung (Miller 2001). Die Veränderung dieses Quotienten sowie eine veränderte Produktion von und Reaktion auf Cytokine, eine verminderte Reaktion auf Proliferationssignale und eine eingeschränkte Antigen-Erkennung und Signaltransduktion der Immunzellen könnten zu einem Verlust an Immunkapazität im Alter führen (Miller 1996, Miller 2000, Chakravarti & Abraham 1999, Weksler 2000, Szakal *et al.* 2002, Mc Glauchlen & Vogel 2003).

Die chronischen Entzündungen die mit dem Alter einhergehen könnten auf eine verstärkte Selbsterkennung des angeborenen oder des adaptiven Immunsystems zurückzuführen sein. Mit zunehmendem Alter nimmt der Anteil an veränderten und geschädigten Proteinen zu (Shringapure *et al.* 2001) (siehe Kapitel 1.2.4). Überschreitet dieser Anteil einen gewissen Grenzwert, könnten diese Proteine eine Immunreaktion auslösen und so zu Entzündungen führen (DeVale *et al.* 2004).

Ein Schwachpunkt der immunologischen Theorie des Alterns ist, dass alle mehrzelligen Lebewesen einem Alterungsprozess unterliegen, die meisten jedoch nicht über ein den Wirbeltieren vergleichbar komplexes Immunsystem verfügen. Des Weiteren ist es nicht immer einfach, zwischen Gründen für und Konsequenzen des Alterns zu unterscheiden. Die unbestreitbaren Änderungen des Immunsystems, wie ein verändertes Expressionsmuster immunrelevanter Gene (Pletcher *et al.* 2002) und eine Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellpopulation (Miller 1996, Chakravarti & Abraham 1999), könnten eine Folge

des Alterungsprozess und nicht deren Ursache sein. In diesem Fall wären sie jedoch wertvolle Biomarker für den physiologischen Alterszustand (DeVale *et al.* 2004).

1.2.4 Stochastische Theorien

Stochastische Theorien nehmen als Ursache für den Alterungsprozess zufällige Schädigungen lebensnotwendiger Moleküle an. Überschreitet die Anhäufung solcher Schäden einen Grenzwert, manifestiert sie sich in einem Rückgang der physiologischen Funktionen des Gesamtorganismus, wie er mit dem Alterungsprozess assoziiert ist (Troen 2003). Einige Theorien gehen davon aus, dass die Anhäufung an Proteinen mit Modifikationen zu einer Abnahme der Vitalfunktionen der Zelle, des Gewebes und letztendlich des Organismus führt. Begünstigt wird die Anhäufung solcher Proteine durch die im Alter abnehmende Funktion von Proteasomen (Carrard *et al.* 2002) und Chaperonen (Soti & Csermely 2003).

Ein anderer Ansatzpunkt für stochastische Theorien ist die DNS. Durch Strahlung im Erbgut hervorgerufene Mutationen akkumulieren mit der Zeit, was wiederum die Zellfunktion beeinträchtigt und letztendlich zu Alterungserscheinungen und dem Tod führt (Faila 1958, Szilard 1959). Eine Theorie, die Elemente beider oben genannter Ansätze enthält, ist die *Error-Catastrophe*-Theorie, die davon ausgeht, dass zufällige, die Funktion beeinträchtigende Modifikationen an Proteinen, die für die Synthese von DNS- und RNS-Molekülen zuständig sind, zu Fehlern im Informationsgehalt der neu synthetisierten Erbsäuremoleküle führen, was wiederum zu Fehlern bei der Proteinbiosynthese führt (Orgel 1963). Eine der wichtigsten stochastischen Theorien, die Theorie der Schädigung von Biomolekülen durch freie Radikale, soll im Folgenden genauer erläutert werden.

1.2.4.4 Die freie-Radikal-Theorie

Eine weitere Theorie, die den Alterungsprozess auf die Anhäufung von zufälligen entstandenen Schäden zurückführt, ist die in den fünfziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts postulierte freie-Radikale-Theorie des Alterns (Harman 1956, 1981). Als freie Radikale bezeichnet man Atome und Moleküle die aufgrund eines ungepaarten Elektrons eine hohe Reaktivität besitzen. Treffen zwei solcher freien Radikale aufeinander, so bilden die ungepaarten Elektronen eine kovalente Bindung und ein stabiles Nicht-Radikal entsteht. Reagiert das ungepaarte Elektron des freien Radikals allerdings mit einem Nicht-Radikal, entsteht durch die Reaktion aus dem Nicht-Radikal ein neues freies Radikal, das seinerseits wiederum mit Nicht-Radikalen reagieren kann. Dadurch kann eine fortgesetzte Reihe von Reaktionen aufrechterhalten werden (Sohal & Weindruch 1996). In der Zelle zählen zu den

potentiellen Reaktionspartnern eines freien Radikals die DNS (Herrero & Barja 1999, Lee *et al.* 1999), Membranlipide (Castorina *et al.* 1992, Farooqui *et al.* 1987, Dogru-Abbasoglu *et al.* 1997, Pansarasa *et al.* 1999, Wozniak *et al.* 2004) und Proteine (Starke-Reed & Oliver 1989, Carney *et al.* 1991, Smith *et al.* 1991, Berlett & Stadtman 1997), die durch diese Reaktion geschädigt werden und deren Schäden mit fortschreitendem Alter akkumulieren. Eine Erweiterung der freien Radikal-Theorie des Alterns stellt die mitochondriale Theorie des Alterns dar, die besonders die in den Mitochondrien hervorgerufenen Schäden an Makromolekülen betont (Harman 1972, Harman 1981, Miquel *et al.* 1981, Miquel 1991). Die Hauptquelle freier Radikale innerhalb der Zelle sind die Proteine der Atmungskette, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind (Halliwell 1994, Turrens 2003, Jezek & Hlavata 2005). Bei der hier stattfindenden Reduktion von elementarem Sauerstoff zu Wasser kann es vorkommen, dass die als Intermediärprodukte entstehenden reaktiven Moleküle freigesetzt werden und weitere reaktive Verbindungen schaffen (Fridovich 1978, Fridovich 1989, Sies 1997, Troen 2003). Da jedoch nicht alle diese Moleküle über ein ungepaartes Elektron verfügen und somit keine freien Radikale sind, werden sie unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zusammengefasst (Halliwell 1994, Halliwell & Gutteridge 2007).

Insgesamt verknüpft die freie-Radikale-Theorie des Alterns Aspekte mehrerer stochastischer Theorien miteinander (Yu & Yang 1996, Knight 2000) und ist aufgrund zahlreicher Belege weitgehend anerkannt (Golden *et al.* 2002).

In den folgenden Kapiteln soll nun genauer auf den Zusammenhang zwischen dem Alterungsprozess und der Lebensspanne eingegangen werden. Dabei stehen zum einen Stressoren, die eine Erhöhung des Mortalitätsrisikos bedeuten und zum anderen die Resistenzmechanismen gegen diese Stressoren und ihr Einfluss auf Altern und Lebensspanne im Fokus.

1.3 Stressoren, Mortalität und Altern

In diesem Kapitel soll auf Stressoren und den Einfluss von Stressoren auf die Lebenserwartung eingegangen werden. Grundsätzlich muss zwischen zwei verschiedenen Arten von Stress unterschieden werden: Eustress und Distress. Unter Eustress versteht man dabei Stress, der durch Hormesis positive Effekte auf einen Organismus ausübt. Dabei führt die Zufuhr eines Stressors bis zu einer gewissen Dosierung zur Aktivierung von Abwehrmechanismen was letztendlich zu einer erhöhten Resistenz gegen den Stressor führt.

So wurde gezeigt, dass die durch eine Beeinträchtigung der Glukoseaufnahme gesteigerte ROS-Produktion in den Mitochondrien von *Caenorhabditis elegans* zu einer Steigerung der Catalase-Aktivität und damit einhergehend einer Steigerung der Resistenz gegen ROS führt. Somit trägt dieser oxidative Stress durch Hormesis zu einer Erhöhung der Lebensspanne bei (Schulz *et al.* 2007). Disstress hingegen wird durch eine Zufuhr von Stressoren ausgelöst, die das Hormesis begünstigende Maß überschreitet und hat je nach Art der Stressoren verschiedene negative Konsequenzen für den Organismus. Exemplarisch für die Beeinflussung der Lebensdauer durch Stress werden zwei Stressoren stehen. Zum einen der durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hervorgerufene oxidative Stress, von dem angenommen wird, dass er über den Alterungsprozess Einfluss auf die Lebenserwartung hat (Harman 1956) und zum anderen den durch Infektionen mit Pathogenen hervorgerufene Stress, der sowohl als ein direktes Mortalitätsrisiko als auch durch Anhäufung pathogenvermittelter Schädigungen zur Herabsetzung der Lebenserwartung beiträgt (DeVale *et al.* 2004).

1.3.1 Oxidativer Stress

Wie oben bereits dargestellt, geht die freie-Radikale-Theorie des Alterns davon aus, dass der Alterungsprozess durch die zeitliche Anhäufung von Schäden hervorgerufen wird, die freie Radikale und ROS an Molekülen der Zelle anrichten (Harman 1956, Harman 1981). Folgerichtig sollte auch eine Verringerung der Reaktionen freier Radikale zu einer Steigerung der Lebenserwartung führen (Harman 1981).

1.3.1.1 Die Quellen der reaktiven Sauerstoffspezies

Bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser in der Atmungskette kann das Superoxid-Radikal (O_2^-) als Intermediärprodukt freigesetzt werden (siehe Abbildung 1). Insgesamt wird circa 1-3 % des verbrauchten Sauerstoffs nicht zu Wasser sondern zu O_2^- reduziert (Halliwell & Gutteridge 2007). In der Zelle wird dieses Superoxid-Radikal enzymatisch zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff umgesetzt. Wasserstoffperoxid wiederum ist in der Lage, Hydroxyl-Radikale ($OH\cdot$) zu bilden, falls es nicht enzymatisch zu Wasser und Sauerstoff abgebaut wird (Fridovich 1978, Fridovich 1989, Sies 1997, Troen 2003).

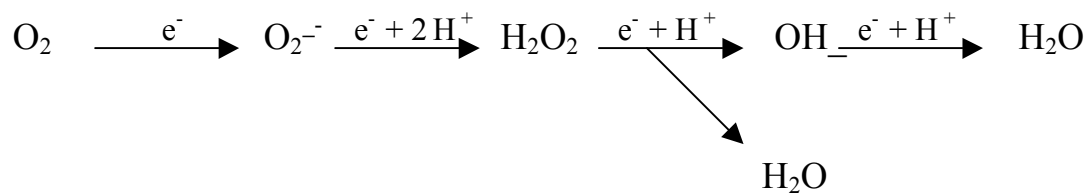


Abbildung 1: Reduktion von Sauerstoff zu Wasser (modifiziert nach Fridovich 1978)

Diese drei Moleküle, Superoxid-Radikale, Hydroxyl-Radikale und Wasserstoffperoxide, besitzen eine hohe Reaktivität und sind in der Lage, Schäden an Biomolekülen der Zelle anzurichten. Freie Radikale und ROS entstehen jedoch nicht nur als Nebenprodukte der Atmungskettenaktivität, sondern werden zum Teil auch von den Zellen selbst zu bestimmten Zwecken gebildet: So spielen sie eine Rolle in phagozytierenden Zellen des Immunsystems (Halliwell & Gutteridge 1984, Halliwell 1994, Jamieson 1989, De Vale *et al.* 2004), der Kontrolle der differentiellen Genexpression (Sen & Packer 1996) und als *second messenger* in der Signaltransduktionskaskade zur Steuerung der Apoptose (Suzuki *et al.* 1997). Auch exogene Quellen wie Strahlung und toxische Substanzen in Nahrung und Atemluft können die Bildung von freien Radikalen und ROS begünstigen (Sies 1997, Vallyathan & Shie 1997, Halliwell & Gutteridge 2007).

1.3.1.2 ROS-bedingte Schäden

Hinweise, dass der von freien Radikalen und ROS angerichtete Schaden an Biomolekülen tatsächlich im Laufe der Zeit zu den typischen Erscheinungen des Alterungsprozess` führt, liefern Untersuchungen der Produktionsrate freier Radikaler in Herz, Leber und Nieren verschiedener Säugetierspezies. Dabei war die maximale Lebensspanne einer Spezies umgekehrt proportional zur Produktion freier Radikale (Sohal *et al.* 1989). Des Weiteren ist bekannt, dass die Produktion von ROS in den Mitochondrien mit zunehmendem Alter ansteigt (Sohal & Sohal 1991, Sohal *et al.* 1994, Passos *et al.* 2007).

Besonders die mitochondriale DNS (mtDNS) scheint auf Grund ihrer räumlichen Nähe zur Atmungskette (Miquel 1991, Mandavilli *et al.* 2002) und fehlender Histone (Turrens 2003) anfällig für Schädigungen zu sein, deren Akkumulation zum Alterungsprozess beiträgt (Flemming *et al.* 1982, Linnane *et al.* 1992, Wallace 1992). ROS-bedingte Mutationen an der mtDNS können die Genexpression im Mitochondrium verändern (Hayashi *et al.* 1991, Bonawitz *et al.* 2006). Sind davon für Proteine der Atmungskette kodierende Gene betroffen, kann die Funktion der Atmungskette in Mitleidenschaft gezogen werden (Wei *et al.* 2001,

Mandavilli *et al.* 2002) und die ROS-Produktion zunehmen (Suzuki *et al.* 1998, Bonawitz *et al.* 2006), so dass ein sich selbst verstärkender Teufelskreis entsteht (Wei *et al.* 2001).

Auch die Membranen der Mitochondrien sind besonders anfällig für Lipidoxidationen durch ROS, da sie einen hohen Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren enthalten (Wei *et al.* 2001). Ihr Oxidationsgrad nimmt mit fortschreitendem Alter zu (Uysal *et al.* 1989; Yen *et al.* 1994; Wei *et al.* 1996), was besonders fatal ist, da die damit einhergehende Veränderung der Funktion der mitochondrialen Membranen einen direkten Einfluss auf die Funktion der in ihr lokalisierten Atmungskette hat (Wei *et al.* 2001). Letztlich wird durch einen Verlust an Membranqualität und die damit einhergehende Entkopplung des Elektronentransports (Yen *et al.* 1989, Genova *et al.* 2004) auch die Bildung weiterer ROS mit all ihren Konsequenzen begünstigt.

1.3.1.3 Schutzmechanismen gegen ROS

Die meisten Organismen stehen diesen ROS jedoch nicht schutzlos gegenüber, sondern verfügen über ein Arsenal enzymatischer und nicht-enzymatischer Antioxidanzien (Sies 1997), d.h. Substanzen, die in der Lage sind die Oxidation einer anderen Substanz zu verhindern (Halliwell 1996, Halliwell & Gutteridge 2007). Diese bilden ein Netzwerk zur Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies (Packer *et al.* 2001).

Zu ihnen zählen das Peptid Glutathion (Halliwell & Gutteridge 2007), sowie die Enzyme Catalase (Cat), Superoxid-Dismutasen (SOD) und Glutathion-Peroxidasen (GPx) (Sies 1997) auf deren Wirkung und Bedeutung in diesem Kapitel genauer eingegangen werden soll. Ist diese Abwehrsystem nicht in der Lage, die durch Oxidanzien hervorgerufenen Schädigungen zu verhindern, ist der Organismus oxidativem Stress ausgesetzt.

Superoxid-Dismutasen

Die erste Linie im Abwehrkampf gegen ROS bildet die Familie der Superoxid-Dismutasen (SOD) (Zelko *et al.* 2002). Sie katalysiert die Umsetzung des Superoxid-Radikals zu Wasserstoffperoxid (McCord & Fridovich 1969, Fridovich 1978, Johnson & Giulivi 2005, Halliwell & Gutteridge 2007). Für ihre katalytische Aktivität benötigen die Superoxid-Dismutasen in ihrem aktiven Zentrum ein Metallion. Das Superoxid-Radikal wird durch die Übertragung des Elektrons und der Protonen zu Wasserstoffperoxid oxidiert. In der Nettoreaktion werden also zwei Superoxid-Radikale unter Aufwendung von zwei Protonen zu jeweils einem Molekül elementarem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umgesetzt (Johnson & Giulivi 2005, Culotta *et al.* 2006).

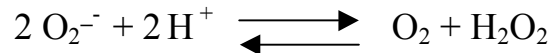


Abbildung 2: Nettoreaktion des von Superoxid-Dismutasen katalysierten Abbaus von Superoxid-Anion-Radikalen (modifiziert nach Culotta et al. 2006).

Superoxid-Dismutasen werden in Klassen eingeteilt, die sich in ihren katalytisch aktiven Metallionen (Halliwell & Gutteridge 2007) sowie in ihrer Primärstruktur unterscheiden (Keele *et al.* 1970; Yost & Fridovich 1973; Youn *et al.* 1996a; Landis & Tower 2005; Halliwell & Gutteridge 2007), was auf unabhängige Ursprünge hinweist (Keele *et al.* 1970; Barondeau *et al.* 2004): Zum einen die Kupfer/Zink-abhängigen Superoxid-dismutasen (Cu/ZnSODs), die in Eukaryoten und einigen Prokaryoten vorkommen (Fridovich 1978, Halliwell & Gutteridge 2007), und von denen es intra- und extrazelluläre Formen gibt (Fridovich 1995). Zum anderen die Mangan-abhängigen Superoxid-Dismutasen (MnSODs), die in prokaryotischen Cytosol bzw. in der eukaryotischen mitochondrialen Matrix lokalisiert sind (Keele *et al.* 1970, Yost & Fridovich 1973, Wintjens *et al.* 2004) und zu deren Familie auch die Eisen-abhängigen Superoxid-Dismutasen (FeSODs) zählen, die in tierischen Zellen fehlen (Halliwell & Gutteridge 2007), sowie die nur in Prokaryoten nachgewiesenen Nickel-abhängigen Superoxid-dismutasen (NiSODs) (Youn *et al.* 1996, Choudhury *et al.* 1999, Palinek *et al.* 2003, Wuerges *et al.* 2004). In den meisten tierischen Organismen finden sich drei verschiedene Superoxid-Dismutasen, wovon jeweils eine in den Mitochondrien (Mn-SOD), eine im Zytoplasma und eine extrazellulär (jeweils eine Form der Cu/Zn-SOD) vorkommt (Landis & Tower 2005). Einige Spezies verfügen jedoch noch über weitere Superoxid-Dismutasen, so zum Beispiel der Nematode *Caenorhabditis elegans*, der fünf verschiedenen Superoxid-Dismutasen besitzt (Hunter *et al.* 1997, Giglio *et al.* 1994, Van Raamnsdonk & Hekimi 2009).

Catalasen

Der nächste Schritt in der Abwehr von ROS, die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O , das durch die SOD-Reaktion entstanden ist wird durch Catalasen katalysiert. Catalasen sind Tetramere mit einem Molekulargewicht von 200-300 kDa und enthalten als prosthetische Gruppe ein Fe(III)-Häm (Zamocky & Koller 1999). Catalasen sind in der Lage, die Reduktion von Wasserstoffperoxid auf zwei unterschiedlichen Wegen, dem katalytischen und dem peroxidativen Reaktionsweg, zu katalysieren (siehe Abbildung 3).

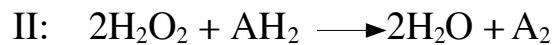


Abbildung 3: Nettoreaktionen der katalytischen (I) und peroxidativen (II) Aktivität der Catalase (Modifiziert nach Halliwell und Gutteridge 2007).

Die Bedeutung der Catalase wird dadurch unterstrichen, dass sie bei fast allen Lebewesen die unter aeroben Bedingungen leben vorhanden ist (Deisseroth & Dounce 1970, Zamocky & Koller 1999, Halliwell & Gutteridge 2007). Bei tierischen Organismen sind sie dabei hauptsächlich in den Organellen lokalisiert, fehlen jedoch in Mitochondrien (Halliwell & Gutteridge 2007).

Glutathion und seine assoziierten Enzyme

Glutathion

Das Tripeptid Glutathion (L_-Glutamyl-L-cysteinylglycin) wird in der Zelle in zwei aufeinander folgenden Schritten aus den Aminosäuren L-Glutamat, L-Cystein und Glycin gebildet (Sies 1997, Halliwell & Gutteridge 2007). Es schützt die Zelle auf verschiedene Weisen vor freien Radikalen, ROS und anderen schädlichen Substanzen. Daneben besitzt es noch weitere Aufgaben im Protein- und Aminosäurestoffwechsel (Meister & Anderson 1983, Dickinson & Forman 2002). Es kann direkt mit freien Radikalen wie OH_\cdot reagieren, wobei es von seinem reduzierten Zustand Glutathion (GSH) in seinen oxidierten Zustand Glutathiondisulfid (GSSG) übergeht (Halliwell & Gutteridge 2007). Das Verhältnis von reduziertem Glutathion zu oxidiertem Glutathiondisulfid (GSH/GSSG-Ratio) stellt dabei einen Indikator für den Redox-Zustand der Zelle dar (Maher 2005). Das Enzym Glutathion-Reduktase überführt unter Oxidation eines Moleküls NADPH Glutathiondisulfid wieder in Glutathion (Meister & Anderson 1983; Dickinson & Forman 2002).

Glutathion spielt jedoch auch eine entscheidende Rolle als Coenzym einiger Enzyme, denen eine große Bedeutung bei der Abwehr von oxidativem Stress zugewiesen wird.

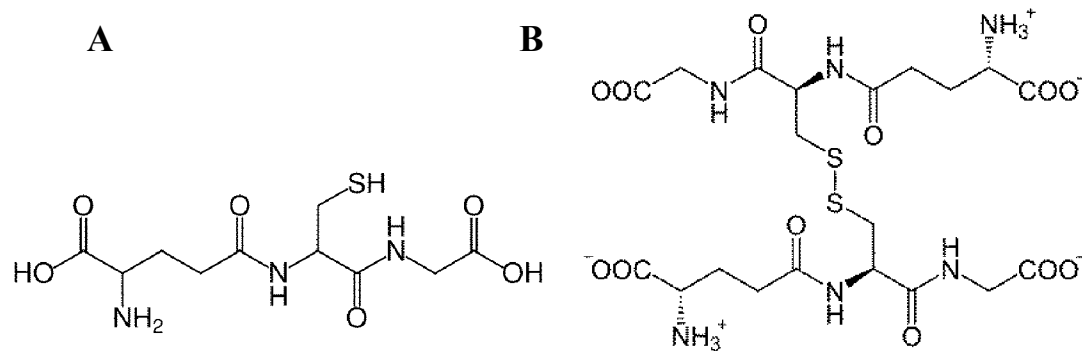


Abbildung 4: Glutathion in der reduzierten Form GSH (A) und in der oxidierten Form GSSG (B) (modifiziert nach Sies 1997, Halliwell & Gutteridge 2007).

Glutathion-Peroxidase

Die Familie der Glutathion-Peroxidasen (GPx) ist in der Lage unter Oxidation von Glutathion, das als Wasserstoffdonor fungiert (Flohe *et al.* 1973, Meister & Anderson 1983, Arthur 2000), Peroxide zu reduzieren. Wie Catalasen reduzieren Glutathion-Peroxidasen Wasserstoffperoxid. Sie sind jedoch auch in der Lage weitere Peroxide wie Lipidperoxide oder Thymhydroperoxide zu reduzieren (Flohe *et al.* 1973, Meister & Anderson 1983, Bao *et al.* 1997, Arthur 2000). Obwohl die Familie der GPx bei Wirbeltieren weit verbreitet ist, mindestens vier verschiedene für GPx kodierende Gene sind bekannt (Gladyshev & Hatfield 1999, Arthur 2000, Comhair & Erzurum 2005), konnte sie bei Insekten noch nicht nachgewiesen werden (Felton & Summers 1995). Jedoch weisen auch einige Glutathion-S-Transferasen eine Glutathion-Peroxidase Funktion auf (Meister & Anderson 1983, Hayes & Pulford 1995, Hurst *et al.* 1998, Arthur 2000), so dass bei Insekten auch andere Enzyme für die glutathionabhängige Reduktion von Peroxiden zuständig sein könnten (Ahmad 1992).

Glutathion-S-Transferasen

Zu der Familie der Glutathion-S-Transferasen gehören mindestens 15 verschiedene Klassen (Sheehan *et al.* 2001), die hauptsächlich Konjugationsreaktionen zwischen reduziertem Glutathion und elektrophilen Molekülen katalysieren. Zu diesen Substanzen zählen sowohl Xenobiotica als auch endogene schädliche Verbindungen (Eaton & Bammler 1999, Halliwell & Gutteridge 2007). GSTs katalysieren die Bildung von Thioetherbindungen zwischen dem Cysteinrest des Glutathions und der elektrophilen Substanz. Das dabei entstehende Konjugat ist im Vergleich zur Ausgangssubstanz weniger reaktiv sowie hydrophiler und kann nun leichter ausgeschieden werden (Eaton & Bammler 1999, Dickinson & Forman 2002, Maher 2005). Da bei dieser Reaktion ein Molekül Glutathion verbraucht wird, kann eine hohe GST-Aktivität den GSH Gehalt der Zelle erheblich herabsetzen. Im Gegensatz zu der durch

die GPx vermittelten Oxidation kann der Verlust nur durch eine *de novo* Synthese von Glutathion erfolgen.

1.3.1.4 Antioxidanzien, oxidativer Stress und Lebenserwartung

In den letzten Jahren konnte in einer Reihe von Organismen nachgewiesen werden, dass eine künstliche Veränderung der Aktivitätsmuster verschiedener Antioxidanzien eine Steigerung der Lebensspanne zur Folge hat. So bewirkt eine konzertierte Überexpression der Catalase und der im Zytoplasma lokalisierten Cu/Zn-Superoxid-Dismutase in *Drosophila melanogaster* eine Verlängerung der Lebenserwartung um etwa ein Drittel (Orr & Sohal 1994). Diese beiden Enzyme wirken bei der Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies eng zusammen. Die Bedeutung dieses konzertierten Prozesses wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass eine alleinige Steigerung der Expression der Cu/Zn-Superoxid-Dismutase ebenso wirkungslos in Bezug auf die Lebenserwartung der Taufliegen blieb wie eine alleinige Steigerung der Expression der Catalase (Orr & Sohal 1994). Eine Reduktion verschiedener SODs führte dagegen zu einer Abnahme der Lebensspanne bei *Drosophila* (Phillips *et al.* 1989, Kirby *et al.* 2002, Duttaroy *et al.* 2003).

Eine Kopplung von gesteigerter Lebenserwartung und erhöhter Resistenz gegen oxidativen Stress findet sich auch bei besonders langlebigen Linien von *Caenorhabditis elegans*. Bei diesen Würmern stiegen die Aktivitäten der SODs sowie der Cat mit zunehmendem Alter an, während bei Wild-Typ Würmern eine entgegengesetzte Entwicklung zu beobachten ist (Larsen 1993, Vanfleteren 1993, Vanfleteren & De Vreese 1995).

Auch in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde der Einfluss der Superoxid-Dismutase auf die Lebenserwartung und den Alterungsprozess nachgewiesen: Wurde das Gen *sod1*, das für eine zytoplasmatische Superoxid-Dismutase kodiert ausgeschaltet, zeigten die Hefezellen einen Rückgang der klonalen und replikativen Lebensspanne (Wawryn *et al.* 1999, Unlu & Coc 2007) und ein beschleunigtes chronologisches Altern (Longo *et al.* 1996, Longo *et al.* 1999). Ähnliches gilt auch für Mäuse, in denen *sod1* inaktiviert wurde (Elchuri *et al.* 2005).

Diese Studien legen einen einfachen und direkten Zusammenhang zwischen einer Steigerung der antioxidativen Kapazitäten eines Organismus, der Erhöhung seiner ROS-Resistenz und seiner verlängerten Lebenserwartung nahe. Die Zusammenhänge stellen sich jedoch sehr wahrscheinlich komplizierter dar als sie auf den ersten Blick scheinen (Parkes *et al.* 1999). So zeigt der Nacktmull *Heterocephalus glaber* im Vergleich zu seinen Nagerverwandten Maus und Ratte keine gesteigerte Antioxidanzienaktivität, obwohl er mit einer MLSP von etwa 28 Jahren die MLSP seiner Verwandten um fast eine Größenordnung übertrifft (Buffenstein *et*

al. 2007). Ein umfassender Vergleich verschiedener Spezies ergab, dass eine hohe MLSP nicht mit einer höheren Antioxidanzien-Aktivität einhergeht (Perez-Campo *et al.* 1998).

1.3.2 Pathogene als Stressoren

Infektionen durch Pathogene, so sie nicht durch das Immunsystem wirksam bekämpft werden, stellen ebenso wie oxidativer Stress ein massives Mortalitätsrisiko dar. Ein extremes Beispiel für die Bedrohung durch Pathogene und ihre verheerende Wirkung ist der Ausbruch der spanischen Grippe gegen Ende des zweiten Jahrzehnts des vergangenen Jahrhunderts. In den Jahren 1918-1920 fielen dem Subtyp A/H1N1 des Influenzavirus' weltweit etwa 50 Millionen Menschen zum Opfer (Johnson & Mueller 2002). Wie bereits erwähnt, kann das Immunsystem einem Organismus durch Autoimmunreaktionen auch schaden und so dessen Lebenserwartung reduzieren. DeVale (2004) postuliert, dass für die Maximierung der Lebenserwartung eine geringe Grundaktivität und eine minimale, angemessene Antwort auf eine Herausforderung ideal sind (DeVale *et al.* 2004).

1.3.2.1 Die Pathogenabwehr bei Insekten

Da sich diese Arbeit im weiteren Verlauf hauptsächlich mit Insekten beschäftigen wird, soll hier ein kurzer Überblick über das Immunsystem und die Abwehrmechanismen gegen Pathogene bei Insekten gegeben werden. Gegenwärtig ist die Existenz einer adaptiven Immunreaktion bei Insekten Gegenstand von Diskussionen (Agaisse 2007).

Da ein Großteil der Forschung auf diesem Gebiet der Immunantwort der Insekten an *Drosophila melanogaster* durchgeführt wurde (Lemaitre & Hoffmann 2007; Ferrandon *et al.* 2007) beziehen sich die meisten der unten genannten Angaben auf diesen Organismus. Da einige wichtige Aspekte des *Drosophila*-Immunsystems stark konserviert sind und auch in anderen holometabolen Insekten wie *Apis mellifera* und *Anopheles gambiae* zu finden sind (Feldhaar & Gross 2008) soll *Drosophila* hier als *pars pro toto* dienen.

Physikalische Schranken

Die erste Verteidigungslinie der Insekten gegen Pathogenbefall stellen die von den basalen Epidermiszellen gebildete Kutikula ihres Exoskeletts und Epithelien wie das Darm- oder das Atemwegsepithel dar. Die Kutikula besteht aus einer Matrix aus Proteinen und Lipiden in die *N*-Acetylglucosamin Fibrillen eingebettet sind und bedeckt den gesamten Körper der Tiere (Feldhaar & Gross 2008). Gelingt es Pathogenen diese erste Verteidigungslinie zu durchbrechen, so setzen die weiteren Verteidigungsmechanismen des angeborenen

Immunsystems ein.

Das angeborene Immunsystem der Insekten

Die Mechanismen des angeborenen Immunsystems, obwohl in ihrer Spezifität nicht mit denen des angeborenen Immunsystem der Vertebraten zu vergleichen, besitzen dennoch die Fähigkeit zwischen verschiedenen Pathogenarten sowie „fremd“ und „eigen“ zu unterscheiden. Es wird im Allgemeinen in zwei Bereiche aufgeteilt, deren Trennungslinie jedoch nicht klar verläuft, da sie sich gegenseitig beeinflussen (Feldhaar & Gross 2008).

Der erste dieser Bereiche ist die zelluläre Immunantwort, die hauptsächlich auf Funktion der Hämozyten wie Phagozytose und Einkapselung von Pathogenen beruht, während der zweite dieser Bereiche, die humorale Immunantwort ihre Wirkung vor allem durch die Freisetzung löslicher antimikrobieller Substanzen entfaltet (Feldhaar & Gross 2008).

Die nächsten Kapitel werden einen kurzen Einblick in die Mechanismen der Pathogenerkennung und Kontrolle der Immunantwort, sowie die Wirkmechanismen der zellulären und humoralen Immunantwort geben.

Erkennung der Pathogene durch das Immunsystem

Bevor das Immunsystem mit der Bekämpfung einer Infektion beginnen kann, muss diese zunächst bemerkt werden. Die Wirtsproteine die diese Aufgabe erfüllen indem sie mikrobielle Strukturen erkennen und an sie binden werden allgemein als Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors* PRRs) bezeichnet. Dabei dienen Peptidoglycane der bakteriellen Zellwand und Glucane von Pilzen als zu erkennende Strukturen für diese Rezeptoren (Feldhaar & Gross 2008). Peptidoglycane gram-positiver und gram-negativer Bakterien unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Peptidoglycane: Peptidoglycane gram-positiver Bakterien enthalten meist Lysin während die Peptidoglycane Gram-negativer Bakterien Diaminopimelinsäure (*diaminopimelic acid*, DAP) enthalten (Feldhaar & Gross 2008).

Die humorale Immunantwort

Ist durch die PRRs eine Infektion erkannt und klassifiziert, so wird eine Reaktion des Immunsystems eingeleitet: Antimikrobielle Peptide (AMPs) und verwandte Substanzen werden freigesetzt. Die genaue Wirkweise dieser AMPs ist bislang noch unbekannt, sie sind aber äußerst effektiv bei der Tötung ihrer mikrobiellen Zielzellen. Jedoch sind verschiedene AMPs unterschiedlich effektiv bei der Bekämpfung verschiedener Pathogene. Im Genom von

Drosophila melanogaster wurden 20 verschiedene Gene, die für AMPs aus sieben unterschiedlichen Familien kodieren, identifiziert. Dabei entfalten zum Beispiel die AMPs Drosomycin und Metchnikowin ihre Wirkung gegen Pilze, während Diptericin und Drosocin gegen gram-negative Bakterien und Defensin gegen gram-positive Bakterien wirken. Cecropin A1 wiederum zeigt antimikrobielle Aktivität gegen alle drei Gruppen (Lemaitre & Hoffmann 2007, Ferrandon *et al.* 2007).

Aufgrund dieser Spezifität, wird die Immunreaktion gegen gram-positive, Hefen und Pilze und gram-negative Bakterien durch zwei verschiedene Signalwege gesteuert: Den Toll-Signalweg für gram-positive Bakterien, Pilze und Hefen und den Imd-Signalweg gegen gram-negative Bakterien (Lemaitre & Hoffmann 2007, Ferrandon *et al.* 2007).

Der Toll-Signalweg wird durch die Bindung mikrobieller Strukturen an extrazelluläre PRRs aktiviert, was über verschiedene Signale zur Aktivierung des Proteins Spätzle führt, welches wiederum durch Bindung den membranständigen Rezeptor Toll aktiviert. Toll löst daraufhin eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die letztendlich zur Aktivierung der Proteine Dif und Dorsal und deren Translokation in den Zellkern führt, wo sie die Transkription der entsprechenden AMP-codierenden Gene induzieren (Lemaitre & Hoffmann 2007, Ferrandon *et al.* 2007). Der Imd-Signalweg wird ausgelöst, wenn DAP enthaltendes Peptidoglycan an das membranständige Peptidoglycan-Erkennungsprotein (*peptidoglycan recognition protein* PGRP) PGRP-LC oder das zytosolische PGRE-LE bindet. Beides führt zu einer Interaktion mit dem zytosolischen Imd führt, welches daraufhin eine Signaltransduktionskaskade startet, die mit der Induktion der Transkription entsprechender AMPs durch den Transkriptionsfaktor Relish endet (Lemaitre & Hoffmann 2007, Ferrandon *et al.* 2007).

Die zelluläre Immunantwort

Die zelluläre Immunantwort der Insekten wird durch Hämocyten vermittelt (Jiravanichpaisal *et al.* 2006, Wood & Jacinto 2007, Williams 2007). In *Drosophila melanogaster* wurden drei verschiedene ausdifferenzierte Zelltypen beschrieben, die sich von Hämocyten ableiten: Plasmatozyten, die über 90 % der Population stellen und phagozytisch aktiv sind, Kristallzellen, die an der Phenoloxidase (PO) Kaskade beteiligt sind, welche zur Bildung von Melanin führt und Lamelloyten, die zur Einkapselung großer Strukturen wie den Eiern von Parasitoiden beitragen (Feldhaar & Gross 2008).

Bei der Phagozytose werden kleine Objekte wie Hefen, Bakterien und die Überreste apoptotischer Zellen in die Plasmatozyten aufgenommen und im Phagosom abgebaut (Stuart *et al.* 2007). In *Drosophila* sind an der Erkennung der zu phagozytierenden Objekte vier

verschiedene Hauptklassen von Transmembranproteinen beteiligt: Scavenger Rezeptoren (*scavenger receptors*), komplement-artige Opsonine (*complement-like opsonins*), EGF-artige Wiederholungen enthaltende Proteine (*EGF-like-repeat-containing proteins*) und Down-Syndrom Zellanhaftungsmoleküle (*Down syndrome cell adhesion molecule*, DSCAM) (Stuart *et al.* 2008). Dabei schüren gerade die DSCAMs die Debatte, ob Insekten ein den Vertebraten vergleichbares erworbenes Immunsystem besitzen, da sie durch alternatives Spleißen in tausenden verschiedenen Varianten expremiert werden können (Feldhaar & Gross 2008). Untersuchungen an *Anopheles gambiae* legen nahe, dass nach einer Infektion pathogenspezifische Varianten von DSCAM vermehrt ausgeschüttet werden (Dong *et al.* 2006). Des Weiteren wurde kürzlich gezeigt, dass *Drosophila melanogaster* nach der Injektion einer nicht letalen Dosis *Streptococcus pneumoniae* eine später folgende Injektion mit einer für nicht vorbehandelten Fliegen tödlichen Dosis einen gesteigerten Schutz besaßen und dieser pathogen-spezifische Schutz durch Hämatozyten vermittelt wurde (Pham *et al.* 2007).

Bei der Einkapselung handelt es sich um einen bei Wirbellosen weit verbreiteten Vorgang. Er findet bei Fremdkörpern Anwendung, die zu groß für die Phagozytose sind. Dabei lagern sich große Mengen Lamellozyten an den Fremdkörper an und Formen eine Kapsel um diesen herum. Gefolgt wird diese Einkapselung von einer Melanisierung die durch die Phenoloxidase vermittelt wird und letztendlich zum Tod des eingeschlossenen Organismus führt (Feldhaar & Gross 2008).

Weitere Schutzmechanismen

Neben den oben genannten Schutzmechanismen gegen Pathogene, die sich alle auf der molekularen Ebene abspielen, haben einige Insekten weitere Wege entwickelt, um sich vor Krankheiten zu schützen. Insekten, die in großen Gruppen leben, wie Bienen und Ameisen, sind besonders anfällig für Pathogene, zumal wenn sie wie die oben genannten Unterfamilien innerhalb der Gruppe weitgehend genetisch identisch sind (Feldhaar & Gross 2008). Das hat dazu geführt, dass in diesen Organismen komplexe Abwehrmechanismen auf der Gruppenebene evolvierten, die so genannte „soziale Immunität“ (*social immunity*) (Cremer *et al.* 2007). Zu diesen Mechanismen zählen zum Beispiel die Verwendung antimikrobiell wirkenden Pflanzenmaterials beim Nestbau oder die Kompartimentisierung des Nestes (Feldhaar & Gross 2008).

1.4 Problematik des Arbeitens mit Modellorganismen

1.4.1 Die Nachteile etablierter Modellorganismen

Eine besondere Herausforderung für Studien die sich mit dem Zusammenhang von oxidativem Stress, Antioxidanzien und Lebenserwartung sowie dem Immunsystem und der Lebenserwartung beschäftigen, stellen ausgerechnet die für die Wissenschaft immens wichtigen Standardmodellorganismen wie Nager, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* dar. Die Eigenschaft, die sie für viele Studien so wertvoll macht, ihre schnelle Generationenfolge, erweist sich in der Erforschung des Alterungsprozess als Handicap, da diesen Tieren *per se* eine kurze Lebenserwartung zu eigen ist (Jemielity *et al.* 2005, Keller & Jemielity 2006). Messungen an Wildtypen langlebiger Spezies haben ergeben, dass eine hohe Lebenserwartung häufig nicht wie erwartet mit einer hohen Aktivität des Oxidanzien-Abwehrsystems einhergeht. Ergebnisse an Modellorganismen, deren Lebenserwartung mit einer künstlichen Erhöhung der Antioxidazienaktivität einhergeht, sind also nicht so eindeutig wie sie scheinen. Die lebensverlängernde Wirkung der Überexpression bestimmter Gene des Immunsystems und der Abwehr oxidativen Stresses unter Laborbedingungen müssen nicht direkt an die Erhöhung der Stressresistenz gekoppelt sein sondern könnten auf pleiotropen Effekten beruhen. Das sich die Ergebnisse der Laborstudien nicht uneingeschränkt auf natürliche Systeme übertragen lassen, zeigen Studien, in denen manipulierte, langlebige Modellorganismen unter zusätzlichem, natürliche Bedingungen nachahmendem Stress einen erheblichen Fitnessverlust im Vergleich zu Wildtypen hinnehmen mussten (Jenkins *et al.* 2004, Marden *et al.* 2003, Walker *et al.* 2000).

1.4.2 Eusoziale Organismen als Ausweg

In letzter Zeit sind eusoziale Organismen, insbesondere Insekten der Ordnung der Hymenoptera, trotz einiger Nachteile gegenüber den Standardmodellorganismen *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* und Nagern, vermehrt in den Fokus der Altersforschung geraten. In den folgenden Kapiteln soll nun zunächst eine Einführung in die Strukturen der eusozialen Lebensweise gegeben werden. Im Anschluss daran wird dargelegt, weshalb eusoziale Organismen exzellente Modelle für die Altersforschung darstellen.

1.4.2.1 Eusozialität

Spezies mit eusozialer Lebensweise zeichnen sich nach E.O. Wilson durch drei Merkmale aus (Wilson 1971), die allgemein als Definition von Eusozialität anerkannt sind:

1. Eusoziale Spezies leben in Gruppen mit sich überlappenden Generationen und Brutpflege.
2. In diesen Gruppen findet eine Arbeitsteilung statt.
3. Reproduktive Aktivität ist in diesen Gruppen auf wenige Tiere beschränkt (Kastenbildung).

Besonders auffällig ist dabei die reproduktive Arbeitsteilung. Die reproduktiven Weibchen, bei vielen Arten als Königin bezeichnet, beschränken sich häufig auf die Produktion von Nachkommen, während die nicht-reproduktiven Tiere, meist als Arbeiter bezeichnet, Aufgaben wie Futterbeschaffung, Brut- und Nestpflege sowie Kolonieverteidigung übernehmen.

Unter den Insekten finden sich eusoziale Spezies vor allem in der Familie der Hymenoptera und Isoptera. Daneben finden sich noch einige eusoziale Spezies bei den Homoptera, Coeloptera und Thysanoptera (Carey 2001). Normalerweise ist die eusoziale Lebensweise für die reproduktiven Individuen einer Kolonie, d.h. Königinnen bei Hymenoptera und Könige und Königinnen bei Isoptera, mit einem dramatischen Rückgang an extrinsischen Mortalitätsrisiko verbunden (Keller & Genoud 1997). Diesem Umstand ist es wahrscheinlich zu verdanken, dass die Entwicklung einer funktionalen (also reproduktiv aktiven) Weibchen-Kaste der Ameisen, Bienen, Wespen und Termiten von einer Vervielfachung der intrinsischen Lebenserwartung dieser Individuen begleitet wurde (Keller & Jemielity 2006). Diese Steigerung der Lebenserwartung und ihre Vorteile für die Altersforschung sind Thema des nächsten Kapitels.

1.4.2.2 Eusoziale Hymenopteren als Modellorganismen für die Altersforschung

Wie oben bereits erwähnt, wurden viele Untersuchungen zu den proximalen Mechanismen des Alterns an kurzlebigen Modellorganismen durchgeführt, was die Übertragbarkeit auf langlebige Spezies, darunter den Menschen, zumindest einschränkt (Jemielity *et al.* 2005, Keller & Jemielity 2006). Im Gegensatz zu diesen Spezies erreichen Wespen und Bienen Lebensspannen von 4-8 Jahren während Ameisen und Termiten ein Alter von 18-30 Jahren erreichen können (Hölldobler & Wilson 1990, Keller & Genoud 1997, Wilson 1977) (siehe Abbildung 5).

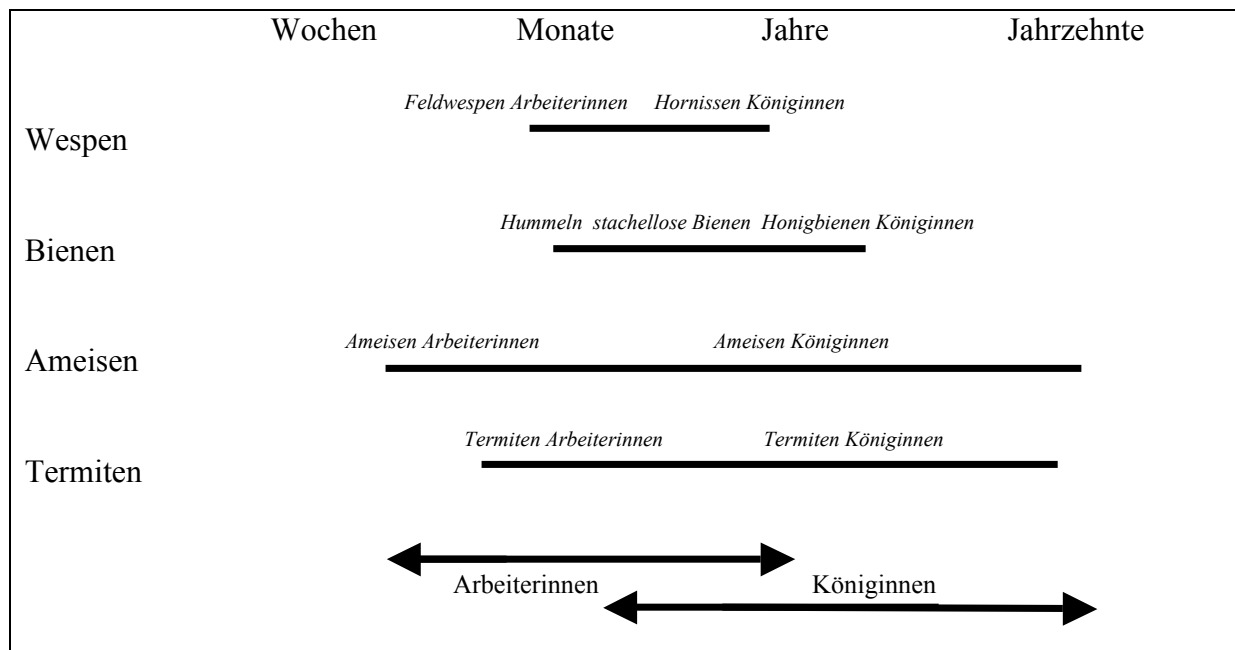


Abbildung 5: Lebensspannen von Spezies innerhalb der vier Hauptgruppen der eusozialen Insekten (modifiziert nach Carey 2001).

Dies ist besonders erstaunlich, da diese Arten trotz ihrer geringen Körpergröße die Mehrzahl kleiner und eine beachtliche Anzahl mittelgroßer Säugetierspezies in ihrer Lebenserwartung übertreffen (Carey & Judge 2001). Doch nicht nur ihre hohe Lebenserwartung macht eusoziale Insekten zu wertvollen Modellen für die Altersforschung, sondern die Tatsache, dass diese Spezies innerhalb ihrer Kolonien ein breites Spektrum an Lebenserwartungen aufweisen. Die oben genannten Zahlen orientieren sich an den Lebenserwartungen der funktionalen Weibchen, d.h. Königinnen. Bei Ameisenspezies übertreffen die Königinnen die Arbeiterinnen, d.h. die nicht reproduktiven Weibchen, ihrer Kolonie häufig um das zehnfache, während sie die Männchen sogar um den Faktor 500 übertreffen (Keller & Jemielity 2006). Eine Ameisenkolonie zeigt also im Normalfall eine extreme Diversität im Phänotyp des Alterns, obwohl die verschiedenen Kasten mit wenigen Ausnahmen (Helms-Cahan & Keller 2003) durch differentielle Genexpression während der Larvalentwicklung entstehen und auf einen Genotyp zurückgehen (Wheeler 1986, Hölldobler & Wilson, 1990). Damit sind Ameisenspezies ausgezeichnete Werkzeuge um die in Modelorganismen entdeckten Gene, die im Alterungsprozess eine Rolle spielen, in einem natürlichen System auf ihre Wirksamkeit zu überprüfen (Keller & Jemielity 2006). Ein Nachteil vieler Spezies liegt jedoch darin

begründet, dass die einzelnen Kasten spätestens in der Larvalentwicklung auf ihren späteren Lebensweg festgelegt werden und später oft kein Wechsel von einer Kaste zur anderen möglich ist.

Auch zeigen viele Arten einen ausgeprägten Kasten-Dimorphismus, der ebenso Einfluss auf die Lebenserwartung haben könnte. Deshalb wäre es optimal, ein System zu haben, in dem einzelne Individuen trotz genetischer Einheitlichkeit im Laufe ihres Lebens zwischen den Alterungsphänotypen wechseln könnten. Ein solches System stellt die ponerine Ameisenart *Harpegnathos saltator* dar, die im nächsten Kapitel als Versuchstier für die Altersforschung vorgestellt werden soll.

1.4.3 *Harpegnathos saltator*

Die zur Subfamilie der Ponerinae zählende Gattung *Harpegnathos* (siehe Abbildung 6) zeichnet sich durch eine relativ ursprüngliche Morphologie (Peeters 1991) sowie eine gering entwickelte Ausprägung eusozialer Koloniestrukturen aus (Wilson & Hölldobler 2005). Im Gegensatz zu Spezies der Subfamilie Attinae, die eine der am stärksten abgeleiteten Gruppen innerhalb der Ameisen darstellt sowie zu vielen anderen Spezies besitzen sie nur einen gering ausgeprägten Kastenpolymorphismus (Liebig 1998, Peeters *et al* 2000, Wilson & Hölldobler 2005). Zwar besitzen die Königinnen von *Harpegnathos saltator* zu Beginn ihres Lebens die für den Hochzeitsflug notwendigen Flügel, ansonsten unterscheiden sie sich äußerlich von den Arbeiterinnen jedoch nur durch eine geringfügig größeren Körper (Liebig 1998).



Abbildung 6: Nest einer *Harpegnathos saltator* Kolonie mit Arbeiterinnen, Eiern, Larven und einer

Puppe. Im Zentrum befindet sich die Königin (gelb umrandet).

Zusätzlich verfügen die Arbeiterinnen über funktionsfähige Spermatheken und sind in der Lage ihre Ovarien zu entwickeln, so dass sie wie die Königinnen prinzipiell in der Lage sind weibliche Nachkommen so wie Sexualtiere zu produzieren (Liebig 1998, Peeters *et al* 2000). In Kolonien mit voll fortpflanzungsfähigen Königinnen bleiben die Ovarien jedoch in ihrem inaktiven Zustand (Peeters & Hölldobler 1995, Peeters *et al* 2000). Stirbt nun die Gründungskönigin, beginnen die Arbeiterinnen der Kolonie mit Duellen, hoch ritualisierten Dominanzkämpfen, in deren Verlauf sich eine Gruppe von Arbeiterinnen durchsetzt und ihre Ovarien entwickelt (Liebig *et al* 1998)(siehe Abbildung 7).

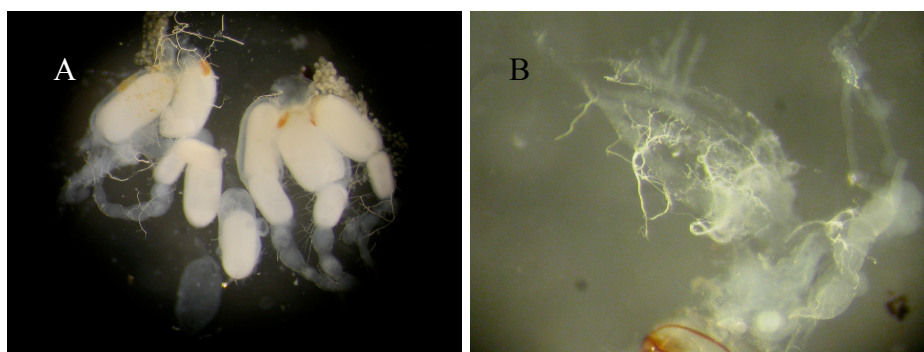


Abbildung 7: Entwickelte Ovarien einer Gamergate mit Oocyten (A) und nicht entwickelte Ovarien einer Arbeiterin (B).

Diese bilden nun die dominante, reproduktiv aktive Kaste der Gamergaten. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei den Gamergaten um eine strikt funktionale und nicht morphologische Kaste handelt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird der Begriff Gamergate im Zusammenhang mit Kaste immer nur in diesem Sinn gebraucht. Die Dominanzkämpfe ziehen sich über mehrere Wochen hin, wobei die aggressiven Interaktionen in den etwa vom zweiten bis zum zehnten Tag nach dem Zusammenbruch der Koloniehierarchie durch Verlust der Königin oder Gamergaten ihren Höhepunkt erreichen (siehe Abbildung 8).

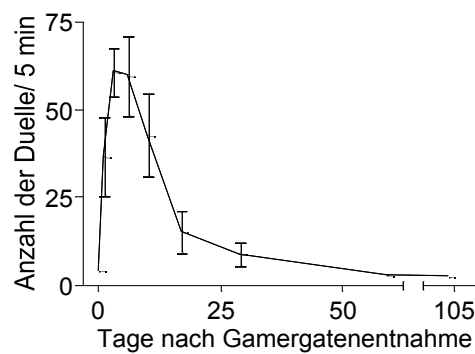


Abbildung 8: Anzahl der Duelle der späteren Gamergaten pro fünf Minuten (modifiziert nach Schneider 2005).

Gamergaten unterscheiden sich sowohl im Verhalten, sie zeigen Dominanzverhalten und übernehmen die Aufgaben der Königin, während sie das typische Arbeiterinnenverhalten ablegen, als auch in der Lebenserwartung von ihren nicht reproduktiv aktiven Nestgenossinnen. Während eine normale Arbeiterin eine Lebenserwartung von etwa 18 Monaten hat, wurde bei Gamergaten, nach ihrem Übergang zur Gamergate, schon eine Lebensspanne von mindestens 4 Jahren festgestellt (Persönliche Mitteilung von Jürgen Liebig). Allerdings beziehen sich diese Werte auf im Labor gehaltene Kolonien. In freier Wildbahn beträgt die durchschnittliche Überlebensdauer einer Kolonie weniger als 14 Monate. Der wahrscheinliche Grund dafür ist ein extrem hohes extrinsisches Mortalitätsrisiko durch den Monsun (Liebig & Poethke 2004). Dennoch hat *Harpegnathos saltator* eine für die Erforschung der Seneszenz besonders wertvolle Fähigkeit: Die Verzögerung des Alterungsprozess aufgrund von Umweltbedingungen und ohne den Einfluss der genetischen Ausstattung sowie des individuellen Entwicklung.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung von *Harpegnathos saltator* als mögliches Versuchstier der Altersforschung sowie die Analyse derjenigen Prozesse, die mit einer Verlängerung der Lebensspanne einhergehen. Die einmalige Situation, in der ein adultes Tier seinen “*life history trait*“ so dramatisch verändern kann (kurzlebige Arbeiterin oder langlebige, reproduzierende Gamergate), soll genutzt werden, um gängige Hypothesen der Altersforschung an diesem natürlichen System zu überprüfen. Dazu wird die Resistenz gegenüber wichtigen Stressoren in verschiedenen Gruppen ermittelt und das mit der Aktivität

unterschiedlicher Antioxidanzien korreliert. Außerdem soll der Einfluss des natürlich auftretenden sozialen Stresses auf die Resistenz gegenüber Infektionen oder oxidativem Stress ermittelt werden. Diese Untersuchungen sollen Aufschluss darüber geben, welche Faktoren für die Lebensspannenverlängerung in diesem natürlichen System verantwortlich sind und welche offensichtlich keinerlei Bedeutung haben. Ein wichtiger Aspekt dabei ist der Vergleich mit Erkenntnissen zum Prozess des Alterns die durch Versuche an Modellorganismen wie *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* und der Maus deren von Natur kurze Lebensspanne durch genetische Manipulationen erhöht wurden, gewonnen wurde. Wichtige Hinweise darauf, in wie weit die an diesen Modellen gewonnen Erkenntnisse auch auf den Menschen, einer von Natur äußerst langlebigen Art, übertragbar sind, können durch Experimente an Organismen wie *Harpegnathos saltator*, die unter natürlichen Umständen zu einer Erhöhung der Lebensspanne in der Lage sind, gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Chemikalien und Medien

Reagenz	Bezugsquelle
1-Chloro-2,4-dinitrobenzol, 99+ %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BCA Protein Assay Kit	Pearce Biotechnology, Rockford
Cumenehydroperoxid, 88 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Laboratories GmbH, Cölbe
Formaldehyd 37 %, Rotipuran [®] , p.a.	ACS Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Glutathion, oxidiert, ≥ 98 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Glutathion, reduziert, ≥ 98 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glutathion-Peroxidase aus bovinen Erythrozyten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glutathion-Reduktase aus Bäckerhefe	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
LB-Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glutathion-S-Transferase aus dem Pferd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol, ≥ 99,9 %	Merck KGaA, Darmstadt
NADPH, ≥ 97 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pestanal	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Purpald	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pyrogallol	Merck, KGaA, Darmstadt
Schneider's <i>Drosophila</i> Medium	Invitrogen Cooperation, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid, 30 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Verwendete Materialien und Geräte

Gerät/Material	Bezugsquelle
Analysenwaage (LE324S-0CE)	Sartorius AG, Göttingen
Borosilicate Glass BF 100-50-10	Sutter Instruments Co., Novato, USA
<i>Drosophila</i> Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Email-Farbe	Revell GmbH 6 Co. KG, Bünde
<i>Erwinia carotovora</i> ECC 15	Bruno Lemaitre, Grenoble

Flaming/Brown Micropipette Puller	Sutter Instruments Co., Novato, USA
Halbmikroküvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Heimchen <i>Acheta domestica</i>	Zoo Knutsen, Kiel
Hobby- und Modelliergips	Hornbach AG, Bornheim
Kolbenhubpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrofuge [®] 22R Centrifuge	Beckman Coulter, Inc., Palo Alto, CA, USA
Mikrotiterplatten, 96-Vertiefungen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Milbenstopfen	K-TK, Retzstadt
Nanoliter 2000 Injektor	World Precision Instruments Sarasota, USA
Pipettenspitzen (200 μ L, 1000 μ L)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Plate Reader Infinite [™] F200	Tecan Trading AG, Schweiz
Plate Reader (Labsystems iEMS Reader MF)	Labsystems, Finnland
Reagiergefäße (1,5 mL, 2,0 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
SevenEasy [™] pH-Meter S20	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Spektralphotometer DU [®] 800	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA
Vortex Genie [®] 2	Scientific Industries, Inc. Bohemia, NY, USA
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

2.2 Die Versuchstiere

2.2.1 Der Koloniezyklus von *Harpegnathos saltator*

Harpegnathos saltator lebt in Kolonien von einigen hundert Tieren. Wie bei eusozialen Hymenopteren mit einer geringen Koloniegröße weit verbreitet (Bourke 1999) zeichnet sich *Harpegnathos saltator* durch einen kaum ausgeprägten Kastenpolymorphismus sowie ein hohes Reproduktionspotential der Arbeiterinnen aus. Die Kolonien werden von einer einzelnen Gründer-Königin nach ihrem Hochzeitsflug gegründet. Sie beginnt ein Nest zu bauen, Eier zu legen und die geschlüpften Larven zu versorgen. Nachdem die ersten Arbeiterinnen ihre Puppenhüllen verlassen haben, widmet sich die Königin ausschließlich der Produktion von Nachkommen, während ihre Arbeiterinnen die Aufgaben der Futterbeschaffung, des Nestbau und der Instandhaltung sowie der Brutpflege übernehmen. Neben Arbeiterinnen produziert die Königin auch geflügelte Geschlechtstiere, Männchen und Jung-Königinnen, die das Nest verlassen und nach dem Hochzeitsflug sterben, beziehungsweise eigene Kolonien gründen. Bevor die Männchen jedoch zum

Hochzeitsflug starten, begatten sie die Arbeiterinnen der Kolonie, die aufgrund eines funktionstüchtigen *Receptaculum seminis* die Spermien speichern können. Stirbt die Gründungs-Königin, so kommt es zwischen den Koloniegensinnen zu hoch ritualisierten, aggressiven Auseinandersetzungen, die sich über mehrere Wochen hinziehen (siehe Abbildung 8) und an deren Ende eine Gruppe von Arbeiterinnen eine neue dominante Gruppe bildet, die Gamergaten. Diese strikt funktionale Gruppe zeichnet sich vor allem durch ihre reproduktive Aktivität aus: Sie produzieren sowohl Arbeiterinnen wie auch Geschlechtstiere. Darüber hinaus besitzen sie eine erhöhte Lebensspanne und zeigen starke Verhaltensänderungen: Sie stellen die Ausführung typischer Arbeiterinnen-Aufgaben (siehe oben) zugunsten von Eiproduktion und Dominanzverhalten ein. Verliert die Gruppe der Gamergaten ihre dominante Stellung durch Tod oder Rückgang der Fertilität, so bricht die Koloniehierarchie zusammen und es beginnen neue Dominanzkämpfe an deren Ende eine neue Gamergatengruppe steht (siehe Abbildung 9).

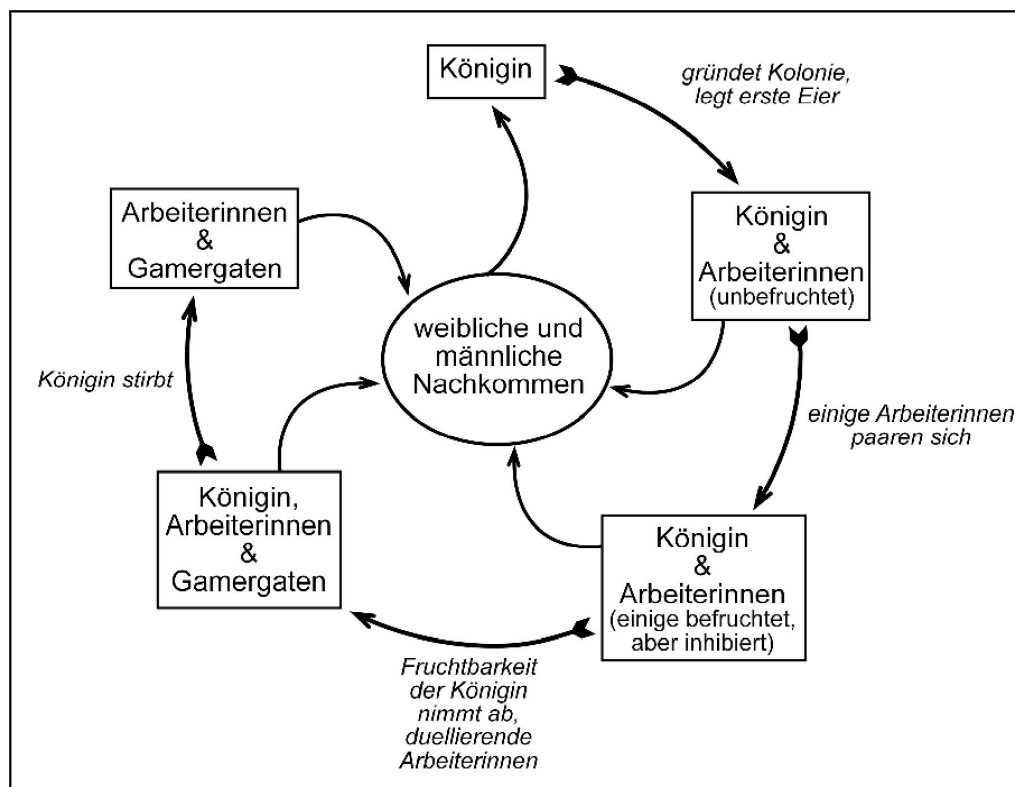


Abbildung 9: Entwicklungszyklus einer *Harpegnathos saltator* Kolonie (modifiziert nach Peeters & Hölldobler 1995).

2.2.2 Haltung der *Harpegnathos saltator* Kolonien

Für die Experimente wurden Kolonien von *Harpegnathos saltator* verwendet, die von Kolonien abstammen, welche ursprünglich in den Jahren 1994, 1995 und 1999 in der Umgebung von Jog Falls, Karnataka State in Südindien gesammelt wurden. Diese Kolonien befinden sich seitdem im Labor und existierten die meiste Zeit als Gamergaten-Kolonien.

Die Haltung der Kolonien erfolgt in durchsichtigen Plastikgefäßen mit einer Grundfläche von 20 x 20 cm und einer Höhe von 10 cm. Die Boxen enthalten einen etwa 2 cm hohen Gipsboden mit einer Aussparung von etwa 6 x 9 x 1 cm, die die Nestmulde bildet und bis auf einen Eingangsbereich von einer Glasplatte abgedeckt ist.

Die Kolonien leben in Klimakammern mit einer konstanten Temperatur von 25°C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden. Zur Erhaltung der Luftfeuchtigkeit und der Deckung des Flüssigkeitsbedarfs der Ameisen wird der Gipsboden konstant Feucht gehalten, jedoch ohne stehende Nässe zuzulassen. Nimmt die Wasseraufnahmekapazität des Gipsbodens ab, werden die Kolonien in eine neue Hälterungsbox transferiert (etwa zweimal pro Jahr). Zwei- bis dreimal wöchentlich werden die Kolonien *ad libitum* mit lebenden Heimchen (*Acheta domestica*) versorgt und der Koloniemüll bestehend aus Fäces, toten Ameisen und Heimchenüberresten entfernt.

2.2.3 Auswahl und Einteilung der Versuchstiere

Für alle Versuche wurden ausschließlich Tiere aus Gamergaten-Kolonien mit einer Mindestanzahl von 50 Tieren sowie vorhandener Brut (Eier, Larven und Puppen) verwendet.

Dabei wurden die Ameisen in folgende Gruppen eingeteilt:

1. Männchen: Männliche Tiere wurden den Kolonien entnommen, bevor sie den Nestbereich verlassen hatten. Männchen, die bereits zum Hochzeitsflug gestartet waren und sich somit außerhalb des Nestes aufhielten wurden, von den Versuchen ausgeschlossen.
2. *Callows*: Als *Callows* werden junge Weibchen bezeichnet, deren Chitinpanzer noch nicht völlig ausgehärtet ist. Erkennbar sind sie durch die im Vergleich zu den älteren Arbeiterinnen und Gamergaten hellere Färbung. Da der Chitinpanzer ca. 25-30 Tage nach Verlassen der Puppenhülle vollständig ausgehärtet ist, kann für diese Gruppe gesichert ein Alter von unter einem Monat angenommen werden. *Callows* wurden sowohl im wie auch außerhalb des Nests gesammelt.

3. Arbeiterinnen: Arbeiterinnen sind weibliche Tiere mit voll ausgehärtetem Chitinpanzer, die nicht reproduktiv aktiv sind. Sie stellen den Großteil der Kolonipopulation dar. Ihr Alter liegt zwischen einem und 18 Monaten. Es gibt keinen gesicherten äußerlichen Marker für ihr tatsächliches Alter. Eine strikte, altersabhängige Trennung der Arbeiterinnen in Innen- und Außendiensttiere, wie sie beispielsweise bei der Honigbiene *Apis mellifera* vorkommt, ist bei *Harpegnathos saltator* zwar nicht bekannt und aufgrund der gering ausgeprägten eusozialen Koloniestrukturen unwahrscheinlich, kann jedoch mangels Daten nicht kategorisch ausgeschlossen werden. Um eine Verzerrung der Ergebnisse zu vermeiden, wurde bei der Auswahl der Versuchstiere die Glasplatte des Nestes entfernt und einige Minuten gewartet, bis nicht mehr unterschieden werden konnte, welche Tiere sich innerhalb bzw. außerhalb des Nestes befanden. Durch diese Maßnahme soll sichergestellt werden, dass die Arbeiterinnengruppe bei allen Versuchen einen repräsentativen Schnitt der Altersstruktur dieser Kaste innerhalb der Kolonie darstellt.
4. Gamergaten: Die reproduktiv aktiven weiblichen Tiere der Kolonie wurden immer aus dem Nestbereich, in dem sie sich ausschließlich aufhalten, entnommen. Identifiziert wurden sie durch ihr Dominanz- und teils durch ihr Eiablageverhalten. Bei Versuchen, die keine lebendigen Tiere voraussetzen, wurde der Gamergatenstatus direkt nach Entnahme durch Kontrolle der Ovarienentwicklung bestätigt. Bei Versuchen, die lebendige Tiere voraussetzen, wurde die Präparation der Ovarien nach Versuchsende durchgeführt. Des Weiteren wurde darauf geachtet, mindestens 50 % der Gamergaten in der Kolonie zu belassen, um die Stabilität der Dominanzhierarchie der Kolonie zu gewährleisten.
5. Aggressive Tiere: Zu dieser Gruppe zählen Ameisen, die sich in Dominanzkämpfen befinden. Nach dem Tod oder der Entnahme der dominanten Gamergaten brechen in der Kolonie innerhalb von 24-48 Stunden Kämpfe um die Dominanz und das Recht der Reproduktion aus. Diese Kämpfe sind hoch ritualisierte Bewegungsabläufe an denen normalerweise jeweils zwei, in Einzelfällen jedoch bis zu fünf Arbeiterinnen teilnehmen. Um zu gewährleisten, dass die Tiere der Versuchsgruppe „aggressive Arbeiterin“ tatsächlich aktiv an diesen Kämpfen partizipiert und nicht nur als angegriffenes Tier reagiert, wurde bei der Generierung folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurden die Gamergaten der Kolonie entnommen und alle Arbeiterinnen mit voll ausgehärtetem Chitinpanzer wurden individuell mit Email-Farbe markiert. Die Kolonie wurden nun für 24 Stunden sich selbst überlassen. Nach 24 Stunden wurde während der Tagphase alle drei Stunden kontrolliert, ob die Dominanzkämpfe begonnen

haben. Nach Einsetzen der Dominanzkämpfe wurde die Kolonie vier Stunden lang alle 30 Minuten für fünf Minuten kontrolliert. Dabei wurden die Arbeiterinnen notiert, die aktiv aggressive Interaktionen mit ihren Nestgenossinnen gestartet haben. Anschließend wurden die Tiere, die bei mindestens fünf der neun Kontrollen aktiv an Dominanzkämpfen beteiligt waren für Experimente entnommen.

6. Isolierte Tiere: Es ist bekannt, dass soziale Isolation bei *Camponotus floridanus* nach einer gewissen Zeit zu einem vorzeitigen Tod führt (persönliche Mitteilung Heike Feldhaar). Aus diesem Grund wird neben der Aggression als weiterer sozialer Stressor Isolation gewählt. Für die Experimente unter Isolationsstress wurden Tiere der Kategorie „Arbeiterin“ wie oben beschrieben ausgewählt und einzeln in Plastikröhrchen mit einer Höhe von 8 cm und einem Durchmesser von 3,5 cm transferiert. Die Plastikröhrchen enthielten einen gewässerten Gipsboden von 1-2 cm Stärke und ein braunes 1,5 ml Reaktionsgefäß als Unterschlupf für die Tiere. Verschlussen wurden die Röhrchen mit einem luftdurchlässigen Stopfen aus Schaumstoff (Milbenstopfen). Des Weiteren wurden die Tiere *ad Libitum* mit lebendigen Heimchen versorgt. Für die Messung der Enzymaktivitäten wurden die isolierten Arbeiterinnen 48 Stunden nach Beginn der Einzelhaltung wie unten beschrieben weiterbehandelt. Für die Experimente zur Pathogenresistenz und Resistenz gegen oxidativen Stress wurden die Tiere 48 Stunden in Isolation gehalten, mit der entsprechenden Lösung bzw. Suspension injiziert und im Anschluss wieder isoliert (vorisolierte Arbeiterinnen) beziehungsweise aus der Kolonie entnommen, injiziert und im Anschluss isoliert (isolierte Arbeiterinnen).

Tiere der Kategorie 1 bis 4 kommen in den meisten Kolonien zu jeder Zeit vor und werden im Folgenden als Standard-Gruppen bezeichnet. Tiere der Kategorien 5 und 6 stehen unter zusätzlichem Stress und sind in den Kolonien nur zeitlich begrenzt (5) oder unter natürlichen Umständen überhaupt nicht (6) vorhanden.

2.3. Überlebensversuche

Um eventuell auftretende Unterschiede in der Resistenz der verschiedenen Kategorien von Ameisen gegen oxidativen Stress und Pathogene zu ermitteln, wurden Tieren der einzelnen Kategorien Stressoren injiziert. Jeweils nach 24 Stunden (beginnend ab dem Zeitpunkt der Injektion) wurde acht Tage lang die Anzahl der überlebenden Tiere ermittelt. Für alle Überlebensversuche dienten Tiere als Kontrolle, denen steriles „Schneider’s *Drosophila* Medium“ (Ringelösung) injiziert wurde, um schädliche Auswirkungen der experimentellen

Prozedur auszuschließen.

2.2.1 Die Injektionsprozedur

Für die Injektionen wurden die Versuchstiere ihren Kolonien beziehungsweise ihren Röhren (vorisolierte Tiere) entnommen und für circa zwei Minuten auf Eis gekühlt, bis sie bewegungsunfähig waren. Anschließend wurden sie fixiert. Die Injektion erfolgte mit einem Mikroinjektor (Nanoliter 2000 Injektor), auf den eine Glaskapillare (Borosilicate Glass BF 100-50-10, gezogen in einem Flaming/Brown Micropipette Puller) gesetzt wurde, in die Intersegmentalmembran zwischen dem ersten und dem zweiten Segment des Gaster. Die Menge der injizierten Flüssigkeiten betrug bei jeder Injektion 41,4 nl. Nach der Injektion wurden die Ameisen mit Emailfarbe gekennzeichnet und nach Wiedererlangen ihrer Mobilität in ihre Ursprungskolonien beziehungsweise in die Isolationsröhren zurückgesetzt.

2.2.2 Resistenz gegen oxidativen Stress

Um die Resistenz der einzelnen Kategorien gegen oxidativen Stress zu ermitteln, wurden die Versuchstiere mit Paraquat, einem oxidativen Stress auslösenden Agens, behandelt. Dazu wurde ihnen eine Paraquat-Lösung wie oben beschrieben injiziert. Die 500 mM Lösung von Pestanal (Paraquat Dichlorid x Hydrat) in 1x Schneider's *Drosophila* Medium wurde direkt vor der Injektionsprozedur angesetzt und bis zur Verwendung, jedoch maximal 30 Minuten, auf Eis gelagert.

2.2.3 Resistenz gegen Pathogen

Zur Ermittlung etwaiger Unterschiede zwischen den Kategorien in der Resistenz gegen Pathogen-Infektionen wurden die Versuchstiere mit dem gram-negativen Insekten- und Pflanzenpathogen *Erwinia carotovora*, das bei infizierten Insekten zum Tode führen kann, (Basset *et al.* 2000) infiziert. Hierzu wurde ihnen eine Suspension von *Erwinia carotovora* in 1x Schneider's *Drosophila* Medium injiziert. Die Suspension wurde wie folgt gewonnen: 3 ml LB-Medium wurden unter sterilen Bedingungen mit einer Kultur *Erwinia carotovora* angeimpft und 36 Stunden bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm die optische Dichte des Mediums ermittelt und der Kultur so lange 1x Schneider's *Drosophila* Medium zugesetzt, bis eine optische Dichte von 3,6 erreicht war. Die fertige Suspension wurde bis zu ihrer Verwendung,

höchstens jedoch 30 Minuten, bei 4°C gelagert und direkt vor der Injektion nochmals auf einem Vortexer durchmischt.

2.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten und des Glutathiongehalts

2.4.1 Aufbereitung der Versuchstiere

Die Tiere der einzelnen Kategorien wurden wie oben dargestellt für die Messungen der Enzymaktivitäten beziehungsweise der Bestimmung des Glutathiongehalts ausgewählt. Direkt nach der Entnahmen aus der Kolonie wurden die Tiere auf -20°C herabgekühlt um sie möglichst stressarm zu töten. Im Anschluss wurden sie in ein 1,5ml Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff gegeben und mit einem Mikropistill manuell homogenisiert. Dem gemörserten Probenmaterial wurde nach verdampfen des flüssigen Stickstoffs 110µl Phosphat-gepufferter Salzlösung (1x PBS) zugegeben und auf einem Laborschüttler 60s durchmischt. Anschließend wurde die Probe zur Abtrennung der Feststoffe 5min bei 4°C und 18.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung in zwei Fraktionen von je 50µl bei -80°C gelagert.

2.4.2 Bestimmung der SOD-Aktivität

Die Aktivität der SOD wurde nach der Methode von Marklund und Marklund (1974) bestimmt, die auf der Hemmung der Autoxidation von 1,2,3-Trihydroxybenzol (Pyrogallol) durch die Sos beruht. Dabei wird die Zunahme des Oxidationsproduktes von Pyrogallol, einer gelb gefärbten Chinonverbindung, photometrisch erfasst; je höher diese ist, umso geringer ist die Aktivität der SOD. Für die Bestimmung wurden die Proben auf Eis aufgetaut und im Verhältnis von 1:3 mit Tris/Succinat-Puffer (0,05 mol/l; pH 8,2) verdünnt. Anschließend wurden 950 µl des Tris/Succinat-Puffers und 17 µl der Probe in Halbmikroküvetten pipettiert und mit dem Handrührer gut vermischt. Für die Ermittlung des 100 %-Wertes wurde statt der 17 µl Probe bidestilliertes Wasser pipettiert. Die Reaktion wurde nach Zugabe von 33 µl Pyrogallol gestartet und der Extinktionsverlauf des Oxidationsproduktes über 3 Minuten bei einer Wellenlänge von 420 nm und 25°C aufgezeichnet. Schließlich wurde die Enzymaktivität mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität [U/ml]} = \frac{\left(\frac{\Delta E}{\text{min}_{100\text{-Wert}}} - \frac{\Delta E}{\text{min}_{\text{Probe}}} \right) \cdot \text{Volumen}_{\text{Gesamtansatz}} \cdot \text{VD}}{\frac{\text{Extinktion}}{\text{min}_{100\text{-Wert}}} \cdot \text{Volumen}_{\text{Probe}}}$$

2

Die Aktivität der SOD wird in Units (U)/ml angegeben. Dabei entspricht 1 U der Enzymmenge, die zu einer 50 %-igen Hemmung der Autoxidation von Pyrogallol führt.

Zu beachten ist, dass die angewandte Methode nicht zwischen den verschiedenen SODs differenziert, sondern die Aktivität aller im Probenmaterial enthaltenen SODs erfasst.

2.4.3 Bestimmung der Catalaseaktivität

Zur Bestimmung der Catalase-Aktivität wurde die Methode nach Johansson und Borg (1988) durchgeführt. Sie beruht auf der peroxidativen Aktivität des Enzyms. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid kommt es durch die Aktivität der Catalase zur Bildung von Formaldehyd aus Methanol, welches als Wasserstoff-Donor fungiert. Durch Reaktion von 4-Amino-3-Hydrazino-5-Mercapto-1,2,4-Triazol (Purpald) mit Formaldehyd entsteht ein Aminoal. Dieses wird durch Kaliumperiodat zu einem violetten Farbkomplex oxidiert. Dabei ist die Konzentration des Farbkomplexes der Konzentration des Formaldehyds äquivalent.

Die Messung der Catalase-Aktivität erfolgte in Mikrotiterplatten (96 wells). Zunächst wurde ein Assay-Mix aus jeweils 5 ml Phosphat-Puffer (25 mM Phosphat; 100 mM KH_2PO_4 , 150 mM K_2HPO_4), Methanol ($\geq 99,9\%$) und 1 ml Wasserstoffperoxid (44 mM) hergestellt und das Purpald in KOH (2 M) gelöst. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und mit Phosphat-Puffer (s. o.) 1:50 verdünnt, mit Ausnahme der Proben der duellierenden Arbeiterinnen, diese wurden 1:25 verdünnt. Anschließend wurden jeweils 66 μl des Assay-Mix, 30 μl des verdünnten Probenmaterials und 90 μl des Purpalds in ein Well der Mikrotiterplatten pipettiert und für 20 Minuten unter Schütteln bei 22°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 30 μl KIO_4 hinzugegeben, um die Oxidation des Aminoal herbeizuführen. Die Extinktion des violetten Farbkomplexes wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm im Platten-Photometer (Tecan Trading AG, Schweiz) erfasst. Die Quantifizierung der Catalase-Aktivität erfolgte anhand einer Eichkurve mit Formalinlösung (12,5-500 μM), wie in Abbildung 10 dargestellt ist.

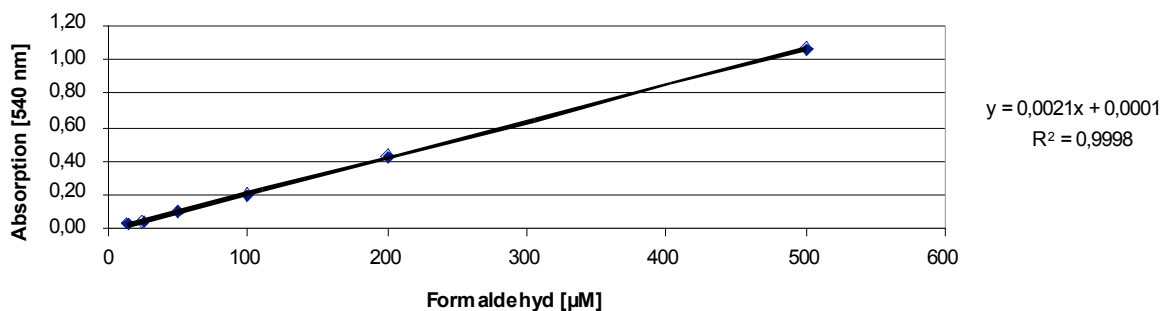


Abbildung 10: Exemplarische Standardkurve der Catalasemessung

Die Formeln zur Berechnung der Catalase-Aktivität über die Formalin-Standardkurve lauten:

$$\text{Formaldehyd } [\mu\text{M}] = \frac{\left(\text{Abs}_{\text{MWProbe}} - \text{Abs}_{\text{BW}} \right) - \text{y-Achsenabschnitt}}{\text{Steigung}} \cdot \frac{0,096}{0,03}$$

$$\text{Catalase } [\text{U/ml}] = \frac{\mu\text{M Formaldehyd}_{\text{Probe}}}{20 \text{ min}} \cdot \text{Verdünnung} = \frac{\text{nmol}}{\text{min}} \cdot \text{ml}$$

Die Aktivität der Catalase wird in U/ml angegeben, wobei 1 U als die Enzymmenge definiert ist, die 1 µmol H₂O₂ pro Minute umsetzt.

2.4.4 Bestimmung der GPx-Aktivität

Die Aktivität der GPx wurde nach der Methode von Lawrence und Burk (1976) bestimmt. Hierbei katalysiert das Enzym die Reduktion von Cumenehydroperoxid (CumH₂O₂) zu zwei Molekülen Wasser, wobei GSH als Kosubstrat benötigt wird. Dieses wird zum Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert und anschließend durch die GR unter Verbrauch von NADPH wieder reduziert. Hier erfolgt eine indirekte Messung der GPx-Aktivität mittels kinetischer Bestimmung der Oxidation von NADPH durch die GR. Zur Ermittlung der GPx-Aktivität wurden die Proben auf Eis aufgetaut und anschließend Verdünnungen mit Kaliumphosphat-Puffer im Verhältnis 1:1,5 hergestellt. Die Bestimmungen wurden in Halbmikroküvetten durchgeführt. Dazu wurden 540 µl eines Assay-Mix, der NADPH

(0,1 mM), GSH (1 mM) und GR (1 U/ml) enthielt, in den Küvetten vorgelegt, anschließend jeweils 30 µl der Probe und CumH₂O₂ hinzugegeben. Um den Blindwert zu generieren wurde an Stelle der Probe Kaliumphosphat-Puffer verwendet. Anschließend wurde mit dem Handmixer gut gerührt und die Messung im Photometer gestartet. Dabei wurde der Extinktionsverlauf bei einer Wellenlänge von 340 nm über einen Zeitraum von 3 Minuten gemessen. Die Berechnung der Aktivität der GPx erfolgte über die zuvor durch Einsatz von 25-1000 mU/ml ermittelte GPx-Standardkurve, die in Abbildung 11 dargestellt ist.

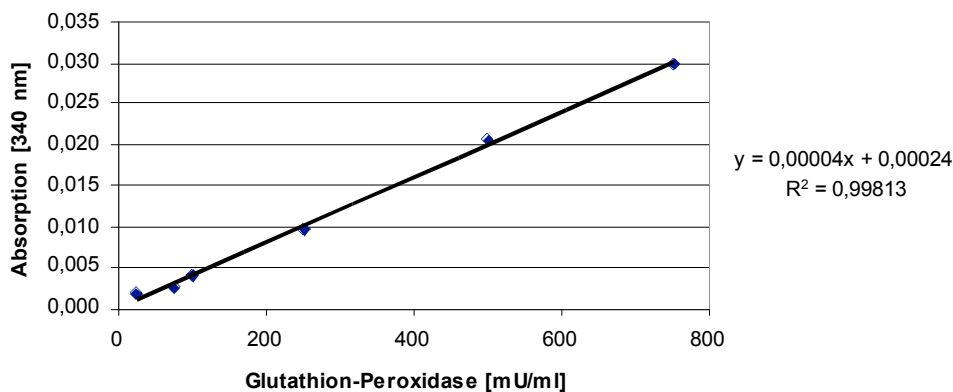


Abbildung 11: Exemplarische Standardkurve der GPx-Bestimmung

Die GPx-Aktivität wird in mU/ml angegeben, dabei entspricht 1 U der Enzymmenge, die 1 µmol NADPH pro Minute umsetzt.

2.4.5 Bestimmung der GST-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der GST erfolgte nach der von Habig und Jakoby (1981) entwickelten Methode, wobei das Substrat 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) durch die Aktivität der GST mit GSH zu einem Thioether, S-(2,4-dinitrophenyl) konjugiert wird. Da die Konjugatbildung der Enzymaktivität äquivalent ist, wird sie zur photometrischen Messung der GST-Aktivität herangezogen und bei einer Wellenlänge von 340 nm über einen Zeitraum von zwei Minuten aufgezeichnet.

Die Aktivität der GST wurde auf Mikrotiterplatten (96 wells) photometrisch ermittelt. Hierzu wurden die Proben auf Eis aufgetaut und mit Kaliumphosphatpuffer (0,1 M; pH 6,5) im Verhältnis 1:3 verdünnt. Der pH-Wert des Kaliumphosphatpuffers liegt im leicht sauren Bereich, da so eine nicht-enzymatische Katalyse der Reaktion verhindert wird. Ferner wurde ein Assay-Mix hergestellt, bestehend aus Kaliumphosphatpuffer (80 mM, pH 6,5), GSH (1 mM) und CDNB-Lösung (1 mM). Zur Erstellung der Standardkurve wurde ein GST-

Standard (200 U/ml) und mit dem Kaliumphosphatpuffer Verdünnungen im Arbeitsbereich von 100 bis 5000 mU hergestellt (siehe Abbildung 12). Im Anschluss wurden je 20 µl der Probe bzw. des Standards in ein Well einer Mikrotiterplatte pipettiert und mit 180 µl des Assay-Mix versetzt. Zur Ermittlung des Leerwertes wurden statt der Probe bzw. des Standards 20 µl des Kaliumphosphatpuffers verwendet. Dabei wurde von jeder Probe bzw. Standard oder Blindwert eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die photometrische Messung wurde bei 25 °C und einer Wellenlänge von 340 nm in einem Platten-Photometer (Labsystems, Finnland) durchgeführt.

Die Quantifizierung der Enzymaktivität erfolgte mittels der erstellten Eichgeraden (siehe Abbildung 12).

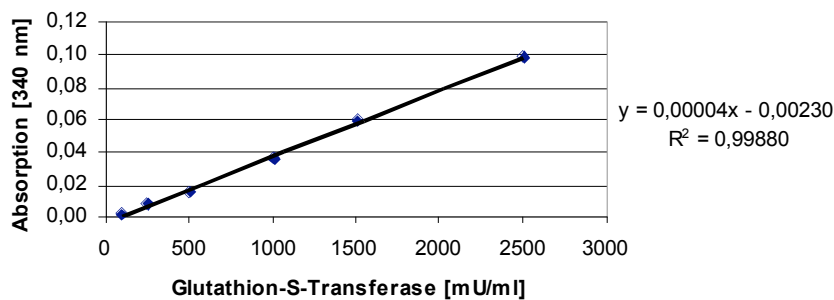


Abbildung 12: Exemplarische Standardkurve der GST-Bestimmung

Die Aktivität der GST wird in mU/ml angegeben, dabei ist 1 U als die Enzymmenge definiert, die zur Entstehung von 1 µmol Produkt (Thioether) führt.

2.4.6 Bestimmung des Glutathiongehalts

Zur Bestimmung des Gesamtglutathions (GS_x; GSH + 2 GSSG) wie auch des oxidierten Glutathions (GSSG) wurde die Methode nach Tietze (1969) mit Modifikationen nach Dringen und Hamprecht (1996) angewandt. Dabei wird die Reaktivität der Thiolgruppe des Glutathions zur quantitativen Bestimmung herangezogen: Reduziertes Glutathion (GSH) reagiert spontan mit der synthetischen 5,5'-Dithio-bis(nitrobenzoesäure) (DTNB) unter Bildung von GSTNB (enthält oxidiertes Glutathion). Dabei entsteht ein chromogenes Thiolprodukt, das TNB, das photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden kann. Das oxidierte Glutathion im GSTNB wird in Anwesenheit von NADPH durch die Glutathion-Reduktase unter Freisetzung eines weiteren Moleküls TNB in reduziertes Glutathion rücküberführt, welches erneut mit DTNB reagieren kann.

In der beschriebenen Reaktion wird der Gesamtgehalt an Glutathion erfasst. Zur Bestimmung von GSSG wird das in der Probe enthaltene GSH mit Hilfe von 2-Vinylpyridin derivatisiert, so dass beim Einsatz der Probe lediglich das GSSG reagieren kann. Subtraktion des gemessenen GSSG-Gehalts vom Gehalt an Gesamtglutathion ergibt dann den Gehalt an GSH. Im Rahmen der Bestimmung des Gehalts an GSx sowie GSSG wurden zunächst die Proben auf Eis aufgetaut. Für die Messung des GSx-Gehalts wurden die Proben 1:4 mit Natriumphosphatpuffer (0,1 M; pH 7,5; Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) verdünnt, für die Bestimmung des GSSG-Gehalts wurden sie 1:2 verdünnt. Anschließend wurde durch Zugabe von 1 %iger Sulfosalicylsäure im Verhältnis 1:1 das Protein der Proben gefällt. Für die GSx-Bestimmung wurden je 20 µl des proteinfreien Überstandes einer Probe und 80 µl bidestilliertes Wasser in ein Well einer Mikrotiterplatte (96 wells) pipettiert und anschließend 100 µl des Reaktionsmixes, bestehend aus 3 mM DTNB, 0,4 mM NADPH, 1 U/ml GR, 1 mM EDTA und 0,1 M Natriumphosphatpuffer (s. o.), hinzugefügt. Der Extinktionsverlauf der TNB-Bildung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm im Platten-Photometer (Labsystems, Finnland) über 3 Minuten gemessen. Für die GSSG-Messung wurden zunächst zur Derivatisierung des GSH 130 µl des proteinfreien Überstandes der Probe mit 5 µl 2-Vinylpyridin versetzt und mittels Zugabe von Tris (0,5 M; pH 8,0) ein pH-Wert von ca. 6 eingestellt und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung wurde dann wie bei der GSx-Bestimmung durchgeführt. Der Gehalt an GSx bzw. GSSG wurde durch eine zuvor ermittelte GSSG-Standardkurve (0-50 µM) (siehe Abbildung 13) berechnet.

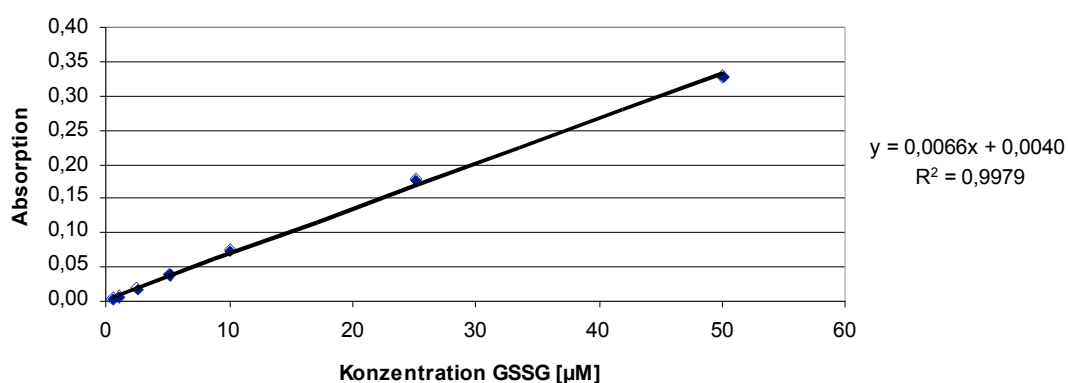


Abbildung 13: Exemplarische Standardkurve der Glutathion-Bestimmung

2.4.7 Proteinbestimmung

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Proteine in alkalischem Milieu mit Cu^{2+} -Ionen einen Komplex bilden; die Cu^{2+} -Ionen werden dabei zu Cu^+ -Ionen reduziert (Biuret-Reaktion). Diese reagieren dann mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violett gefärbten Chelatkomplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm photometrisch gemessen werden kann.

Da jedoch die Cu^{2+} -Ionen in der Biuret-Reaktion nicht vollständig reduziert werden und nicht alle Cu^+ -Ionen einen Komplex mit BCA bilden, muss die Proteinkonzentration über eine Eichkurve mit bovinem Serumalbumin (BSA) ermittelt werden.

Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe eines BCA Protein Assay Kits (Pierce, Rockford, USA) durchgeführt. Es besteht aus dem Reagenz A und dem Reagenz B, welche im Verhältnis 50:1 gemischt werden und so das Arbeitsreagenz ergeben. Ebenso ist BSA enthalten.

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und dann mit PBS im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die Messung erfolgte in Mikrotiterplatten (96 wells). Dazu wurden jeweils 10 μl der Probe bzw. des Standards in die Wells pipettiert und anschließend 200 μl des Arbeitsreagenz hinzugegeben. Für den Blindwert wurde statt der Probe bzw. des Standards PBS verwendet. Die Proben wurden zunächst bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und anschließend für weitere fünf Minuten bei 20°C inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Messung bei einer Wellenlänge vom 540 nm. Die durch bovines Serumalbumin (25-2000 $\mu\text{g/ml}$) ermittelte Standardkurve (siehe Abbildung 14) wurde aus den Blindwert-korrigierten Werten erstellt und zur Quantifizierung der Proteinkonzentrationen herangezogen.

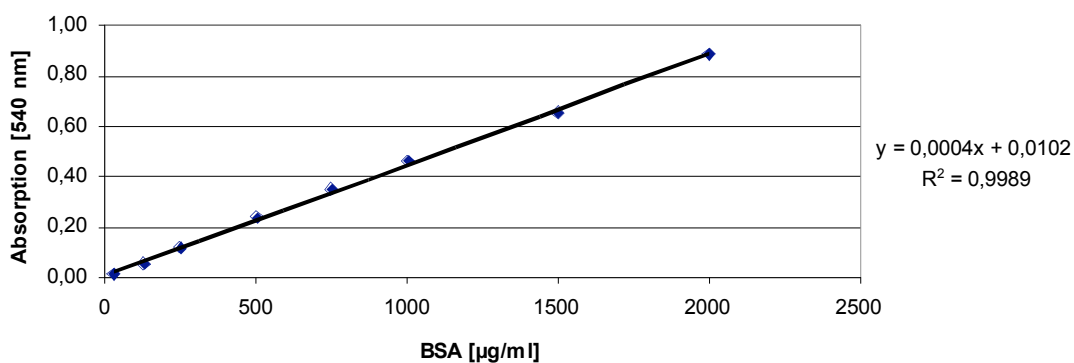


Abbildung 14: Exemplarische Standardkurve der Proteinbestimmung nach BCA-Methode

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten der Überlebensversuche nach der Infektion mit *Erwinia carotovora*, beziehungsweise nach der Injektion der Paraquat-Lösung wurde eine Cox Regressionsanalyse (Cox regression analysis) (SAS version 9.0: Proc PHREG) angewandt. Bei den Daten zu Glutathionspiegel und Enzymaktivitäten wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurden aus den Einzelergebnissen die Mittelwerte der Standardfehler der Mittelwerte für jede Gruppe der Ameisen mit Windows Excel 2003 (Microsoft) berechnet. Anschließend erfolgten die Berechnungen zur schließenden Statistik mit dem Programm SPSS Version 13.0. Um zu überprüfen, ob die einzelnen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikante Unterschiede aufwiesen, wurde zunächst eine einfaktorielle ANOVA (analysis of variance) durchgeführt, in der mit dem Levene-Test wurde auf Varianzhomogenität geprüft wurde. Bei vorliegender Varianzhomogenität wurde als Post-Hoc Test wurde der Dunnett-Test angewendet. Lag diese nicht vor, wurde der Test nach Games-Howell angewandt. Mit den Tests nach Kolmogorow-Smirnow und Shapiro-Wilk wurde auf Normalverteilung überprüft. Lag keine Normalverteilung vor, wurden die Werte ln-transformiert oder ein nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney-U-Test) angewandt.

3. Ergebnisse

Der Befund, dass durch Mutationen hervorgerufene Langlebigkeit oft einhergeht mit einer erhöhten Stress-Resistenz wird an der Ameise *Harpegnathos saltator*, die eine natürliche Variabilität und Flexibilität in Bezug auf ihre Lebensspanne zeigt, überprüft. Es werden langlebige und kurzlebige Gruppen mit den Stressoren reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) und Pathogene konfrontiert und ihre Überlebensraten als Maß für die Resistenz ermittelt. Des Weiteren sind die Einflüsse von einerseits natürlich auftretendem sozialem Stress durch aggressive Interaktionen und andererseits von künstlich erzeugtem sozialem Stress durch Isolation dargestellt. Um Anhaltspunkte für die molekularen Grundlagen der Variationen in der Stressresistenz der einzelnen Gruppen zu erhalten, sind im Anschluss daran die Aktivitäten einiger wichtiger Enzyme des antioxidativen Abwehrsystems (Catalase, Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und Glutathion-S-Transferase) und Quantität (Gesamtgehalt an Glutathion) und Qualität (relative Anteile von reduziertem und oxidiertem Glutathion) des Glutathionspiegels der Kategorien *Callows*, Männchen, Arbeiterinnen und Gamergaten dargestellt. Diese Werte finden sich im Anschluss auch für Arbeiterinnen unter dem natürlich auftretenden sozialen Stress der Dominanzkämpfe. Im Anschluss daran sind die Aktivitäten der Catalase und Superoxid-Dismutasen von Arbeiterinnen und Gamergaten unter künstlich erzeugtem, schwerem oxidativen Stress sowie von Arbeiterinnen unter dem künstlich erzeugten Stress sozialer Isolation dargestellt.

3.1 Oxidativer Stress

3.1.1 Gamergaten und Arbeiterinnen zeigen unterschiedliche Resistenz gegenüber oxidativem Stress

Die Resistenz gegen oxidativen Stress bei Gamergaten und Arbeiterinnen wurde anhand der Überlebensrate der Versuchstiere nach Behandlung mit einem oxidativen Stress auslösenden Agens ermittelt. Hierbei fanden die Gruppen „*Callows*“ und „Männchen“ keine Verwendung, da eine Injektion von Ringer bzw. Paraquat aufgrund ihres flexibeln Chitinpanzers nicht ohne physische Schädigung der Ameisen durchzuführen ist. Abbildung 15 zeigt die Überlebenskurven von Gamergaten und Arbeiterinnen nach Paraquat Injektion in Ringer-Lösung bzw. in den Kontrollgruppen nach Injektion von reiner Ringer-Lösung. Es ist deutlich zu sehen, dass bei den Ringer-Kontrollgruppen während der acht Tage des

Beobachtungszeitraums keine Sterbefälle auftraten. Von den mit Paraquat-Lösung behandelten Gamergaten überleben mehr als 60 % die ersten sechs Tage nach Injektion und 40 % die gesamten acht Tage des Versuchs. Bei den Arbeiterinnen ist bereits am zweiten Tag nach der Behandlung die 50 % Überlebensgrenze unterschritten. Vier Tage nach der Injektion sind nur noch 5 % der Arbeiterinnen am Leben. Diese überleben auch die restlichen 4 Beobachtungstage. Damit ist die Überlebensrate der Gamergaten nach Injektion von Paraquat-Lösung signifikant höher als die der Arbeiterinnen ($p < 0,001$).

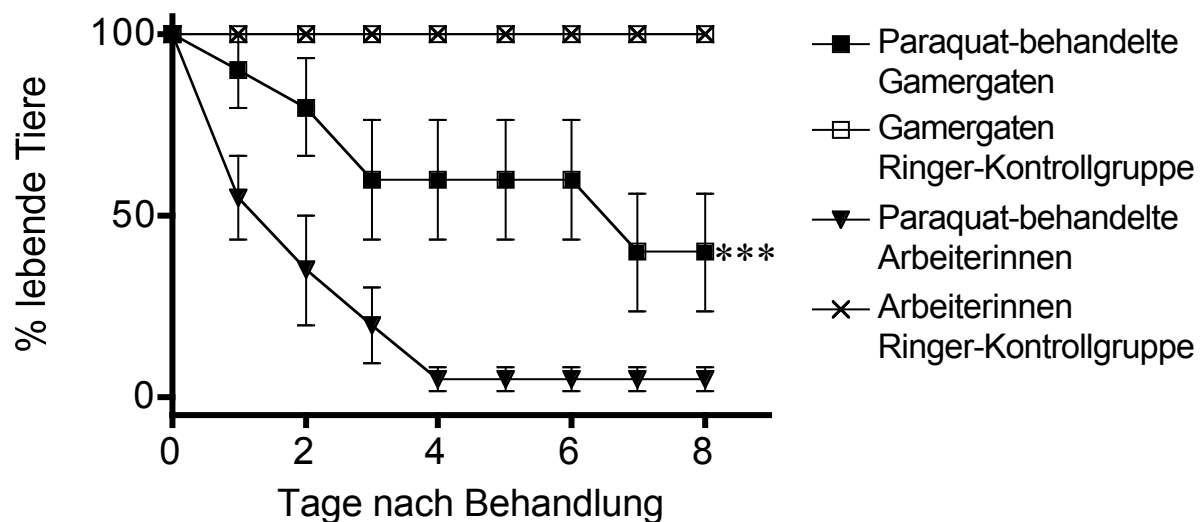


Abbildung 15: Überlebenskurven nach Induktion von oxidativem Stress.

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, $n = 20$
 ***=statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe „Paraquat-behandelte Arbeiterinnen“
 $p < 0,05$, Cox Regressionsanalyse

3.1.2 Sozialer Stress durch Aggression beeinflusst die ROS-Resistenz kaum

Die Folgen von Paraquat-induziertem oxidativen Stress auf Arbeiterinnen die sich in der Phase der Hierarchie-Kämpfe befinden ist in Abbildung 16 dargestellt. Die Gruppe der Arbeiterinnen erreicht die Marke von 50 % Überlebenden 48 Stunden nach der Behandlung während die Gruppe „aggressive Arbeiterinnen“ diese Marke bereits 24 Stunden nach der Behandlung erreicht. Vier Tage nach Injektion der Paraquat-Lösung sind alle aggressiven Arbeiterinnen tot, während 5% der Arbeiterinnen den Beobachtungszeitraum von 8 Tagen überlebt. Trotzdem unterscheidet sich die Überlebenschance der Arbeiterinnen nicht von der

der aggressiven Arbeiterinnen. Von den mit Ringer injizierten Tieren beider Gruppen verstarb keines während der Dauer des Versuchs.

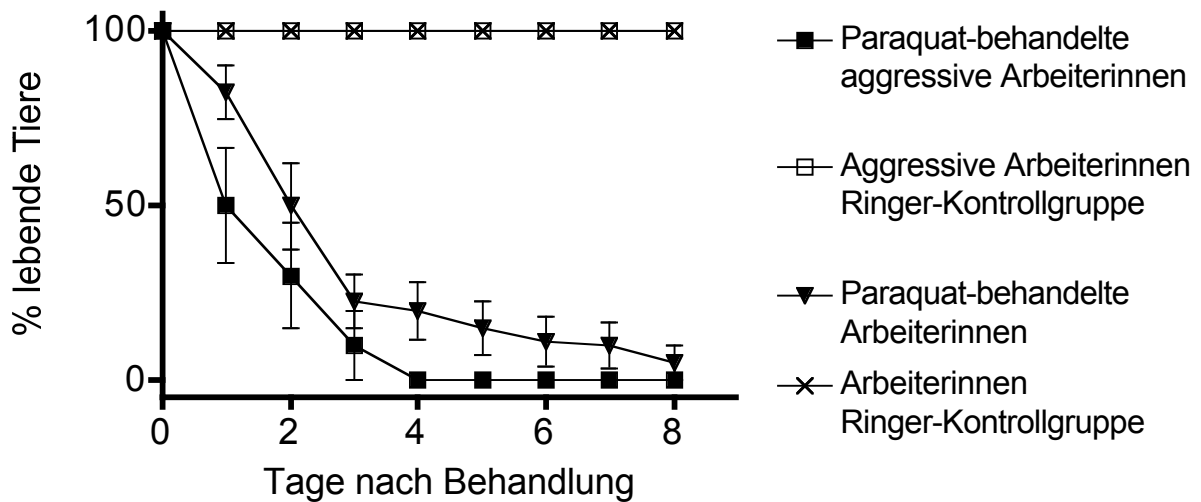


Abbildung 16: Überlebenskurven nach Induktion von oxidativem Stress.
 Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 20
 Cox Regressionsanalyse

3.2 Pathogene -

3.2.1 Unterschiedliche Resistenz von Gamergaten und Arbeiterinnen nach einer bakteriellen Infektion

Zur Bestimmung der natürlichen Unterschiede im Bezug auf die Resistenz gegen Pathogene wurden zwei Gruppen (Gamergaten, Arbeiterinnen) mit dem gram-negativen Bakterium *Erwinia carotovora* infiziert und der Anteil der überlebenden Tiere an acht Tagen nach der Infektion ermittelt. Junge Arbeiterinnen und Männchen wurden aufgrund ihres elastischen Exoskeletts nicht für die Versuche verwendet. Abbildung 17 zeigt die Überlebenskurven der infizierten Arbeiterinnen und infizierten Gamergaten sowie die mit Ringer behandelten Kontrollgruppen. Keines der Tiere der Kontrollgruppen starb in den acht Tagen nach der Injektion mit Ringer. Die Gruppe der infizierten Gamergaten unterschritt der Wert von 50 % überlebender Tiere nach sechs Tagen. 40 % der infizierten Gamergaten lebten am Ende des Beobachtungszeitraumes. Die Gruppe der Arbeiterinnen unterschritt die 50 % Marke bereits 48h nach der Infektion. Die Anzahl von 5% überlebender Tiere wurde nach vier Tagen erreicht und blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes konstant. Damit haben Gamergaten eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit eine Infektion mit *Erwinia carotovora* zu überleben.

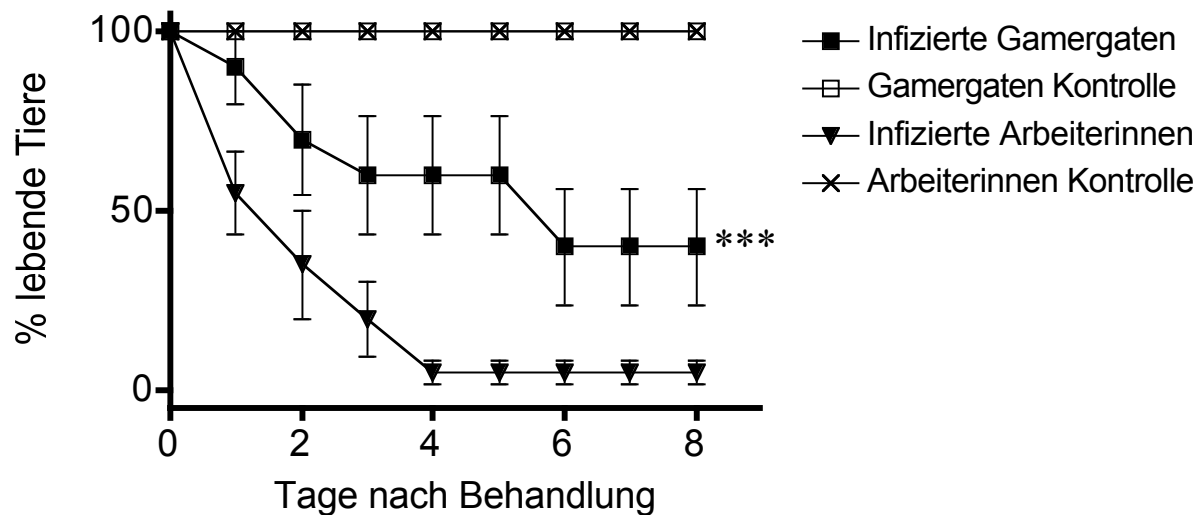


Abbildung 17: Überlebenskurven nach Infektion mit *Erwinia carotovora*.

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 20
 ***=statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe „Infizierte Arbeiterinnen“
 p < 0,001, Cox Regressionsanalyse

3.2.2 Aggression hat einen Einfluss auf das Immunsystem

Die Überlebensrate nach einer Infektion als Maß für die Resistenz gegen Pathogene wurde auch bei Arbeiterinnen ermittelt, die unter dem zusätzlichen Stress von Dominanzkämpfen stehen. Abbildung 18 zeigt die Überlebenskurven infizierter Arbeiterinnen, infizierter duellierender Arbeiterinnen und der jeweiligen Ringer-Kontrollgruppen. Wie bei allen Überlebens-Versuchen starb keines der mit Ringer behandelten Tiere innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Während normale Arbeiterinnen, wie bereits in Abbildung 17 gezeigt, die Marke von 50 % überlebenden Tieren nach zwei Tagen unterschreiten und nach vier Tagen auf das Endniveau von 5 % fielen, überlebten von den duellierenden Arbeiterinnen nur 10 % die ersten 24 Stunden nach der Infektion. Nach 48 Stunden sind alle infizierten Tiere der Gruppe „aggressive Arbeiterin“ tot.

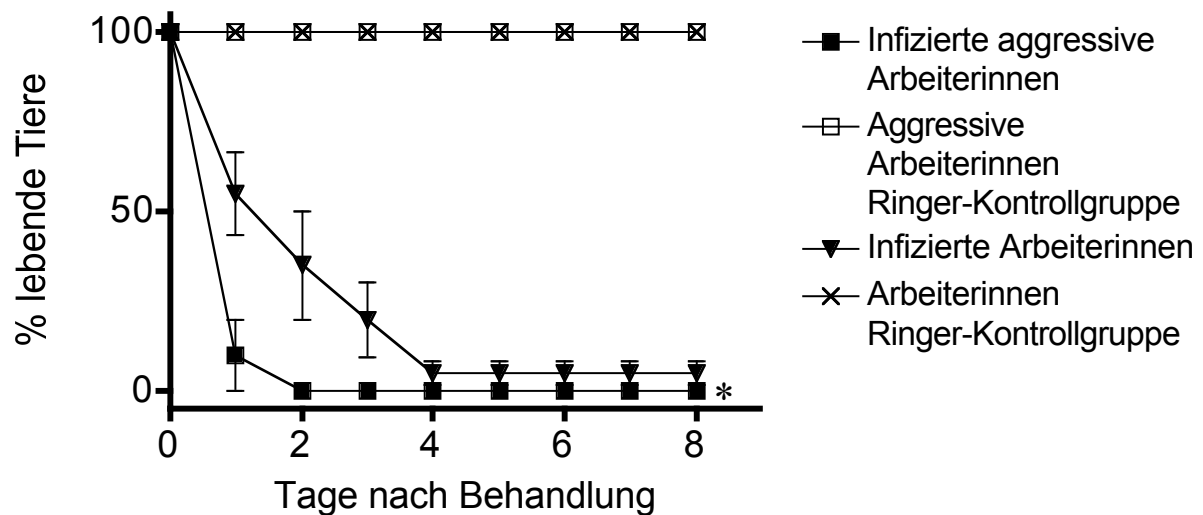


Abbildung 18: Überlebenskurven nach Infektion mit *Erwinia carotovora*.

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 20

*=statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe „Infizierte Arbeiterinnen“
p < 0,05, Cox Regressionsanalyse

3.3 Einfluss von durch Isolation ausgelöstem sozialem Stress auf die Resistenzen

3.3.1 In Isolation gehaltene Arbeiterinnen haben eine veränderte ROS-Resistenz

Bei Arbeiterinnen unter dem zusätzlichen Stress sozialer Isolation wurde ebenfalls die Überlebensrate nach Injektion von Paraquat-Lösung als Maß für die Resistenz gegen oxidativen Stress bestimmt. Abbildung 19 zeigt die Überlebenskurven von zwei verschiedenen Gruppen isolierter Arbeiterinnen: Arbeiterinnen die direkt im Anschluss an die Injektion isoliert wurden und Arbeiterinnen, die bereits 48h vor der Injektion von ihren Nestgenossinnen getrennt wurden und im Anschluss an die Behandlung weiter in Isolation gehalten wurden. Des Weiteren zeigt die Abbildung die Überlebenskurven der mit Ringer-Lösung behandelten Kontrollgruppen. Bei den Kontrollgruppen trat innerhalb des Beobachtungszeitraumes von acht Tagen kein Sterbefall auf. Die Gruppe der vorisolierten Arbeiterinnen erreicht die Marke von 50 % überlebender Tiere drei Tage nach der Behandlung mit Paraquat. Am Ende des Beobachtungszeitraumes leben noch 40 % der Tiere dieser Gruppe. Die Gruppe der nach der Paraquat-Injektion isolierten Arbeiterinnen unterschreitet die Marke von 50 % überlebender Tiere bereits 48h nach der Behandlung. Lediglich 10 % der Tiere dieser Gruppe überleben die acht Tage des Beobachtungszeitraumes.

Damit weisen die vorisolierten Tiere eine signifikant höhere Überlebenswahrscheinlichkeit auf als die Arbeiterinnen die nach der Behandlung isoliert wurden.

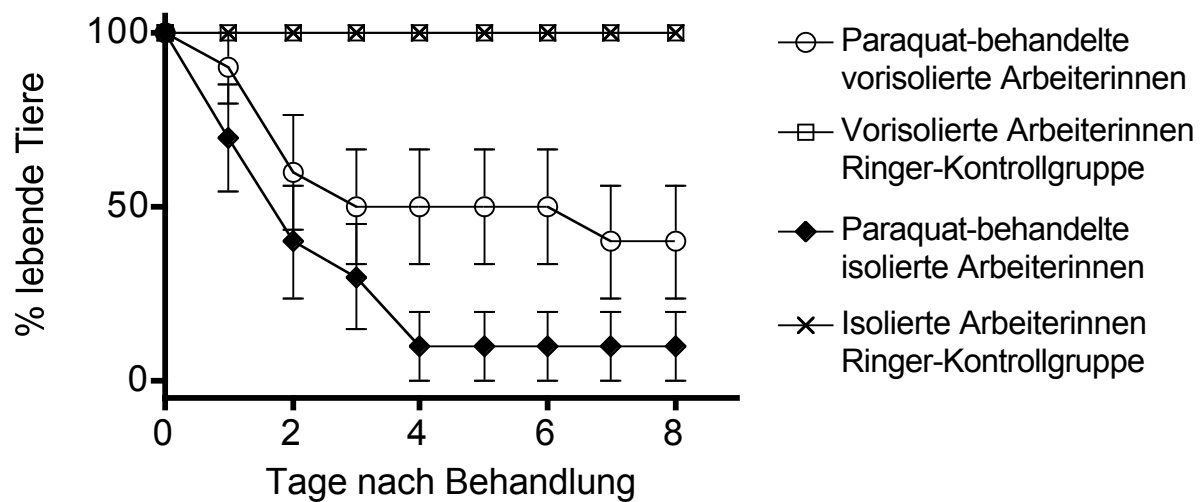


Abbildung 19: Überlebenskurven nach Induktion von oxidativem Stress.

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 20

Abbildung 20 zeigt die Überlebenskurve der nach der Isolation mit Paraquat behandelten Tiere im Vergleich zu den mit Paraquat behandelten Gamergaten und Arbeiterinnen. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Ringerkontrollen nicht mit abgebildet. Wie aus den Abbildungen 15 und 19 ersichtlich, starb keines der Kontrolltiere nach der Injektion mit Ringer. Beim Vergleich der Kurven wird deutlich, dass die Überlebenskurve der isolierten Tiere keine statistischen Unterschiede zu der Überlebenskurve der Arbeiterinnen zeigt, sich jedoch signifikant niedriger ist als die Überlebenskurve der Gamergaten.

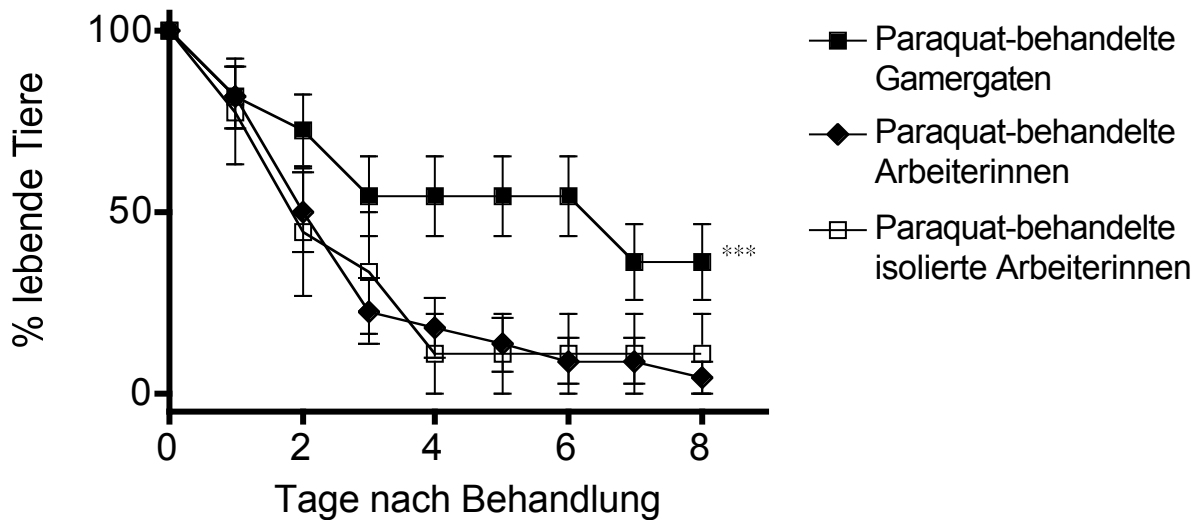


Abbildung 20: Überlebenskurven nach Induktion von oxidativem Stress.

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, $n = 20$
 ***=statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe „Paraquat-behandelte Arbeiterinnen“
 $p < 0,05$, Cox Regressionsanalyse

Die Überlebenskurven von vorisolierten Arbeiterinnen, Arbeiterinnen und Gamergaten nach Paraquat-Injektion werden in Abbildung 21 verglichen. Es wird wiederum auf die Darstellung der Überlebenskurven der mit Ringer behandelten Kontrollgruppen verzichtet.

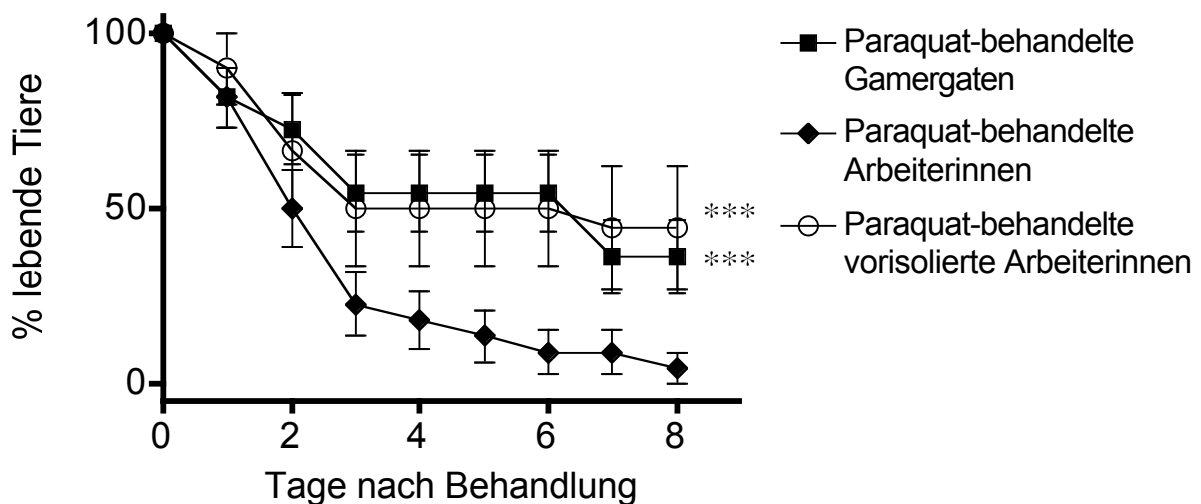


Abbildung 21: Überlebenskurven nach Induktion von oxidativem Stress.

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, $n = 20$
 ***=statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe „Paraquat-behandelte Arbeiterinnen“
 $p < 0,001$, Cox Regressionsanalyse

Die Überlebenskurve der vorisolierten Arbeiterinnen verläuft signifikant über derjenigen der Arbeiterinnen, unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der der Gamergaten.

3.3.2 Soziale Isolation hat Auswirkungen auf das Immunsystem von Arbeiterinnen

Die Überlebenskurven isolierter und vorisolierter Arbeiterinnen nach einer Infektion mit *Erwinia carotovora* sowie der mit Ringer injizierten Kontrollgruppen sind in Abbildung 22 dargestellt. Alle Tiere der Kontrollgruppen überlebten die acht Tage des Beobachtungszeitraumes. Die Gruppe der vorisolierten Arbeiterinnen unterschritt den Wert von 50 % überlebender Tiere 48h nach der Infektion. Vier Tage nach der Infektion erreicht die Gruppe den Wert von 30 % überlebender Tiere. Dieser Wert bleibt bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes konstant. Bei der Gruppe der isolierten Arbeiterinnen sterben alle Tiere innerhalb des Zeitraumes von 24 bis 48 Stunden.

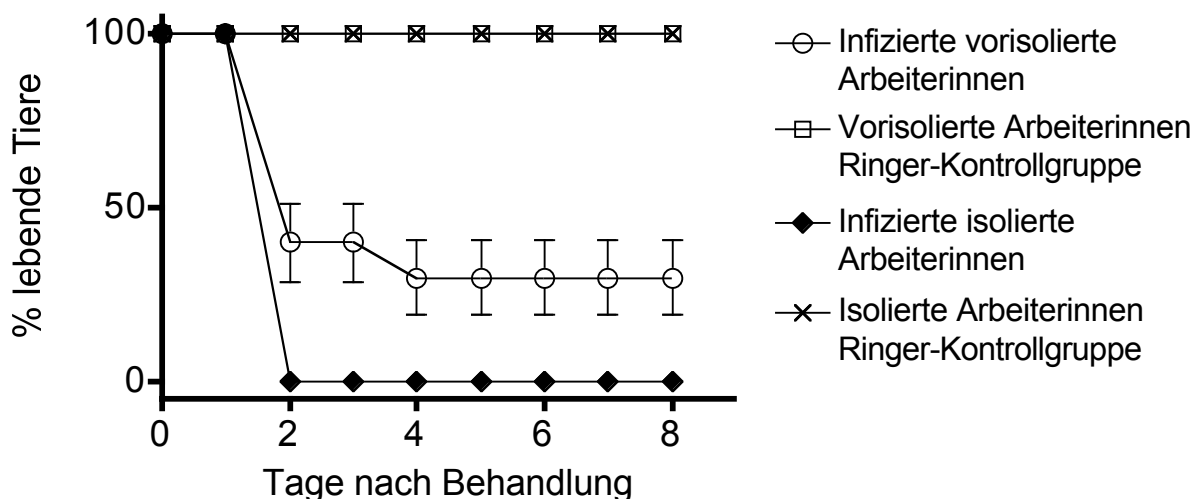


Abbildung 22: Überlebenskurven nach Infektion mit *Erwinia carotovora*.

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 20

Zur besseren Vergleichbarkeit der Überlebensrate der isolierten Arbeiterinnen mit den Gruppen der Arbeiterinnen und der Gamergaten wurden deren Überlebenskurven in Abbildung 23 ohne die Ringer-Kontrollgruppen dargestellt. Wie bereits in den Abbildungen 17 und 22 zu sehen ist, starb keines der Tiere der Kontrollgruppen während des Beobachtungszeitraumes. Die Überlebenskurve der isolierten Arbeiterinnen liegt deutlich

unter derjenigen der Gamergaten, unterscheidet sich jedoch nur nicht signifikant von derjenigen der Arbeiterinnen.

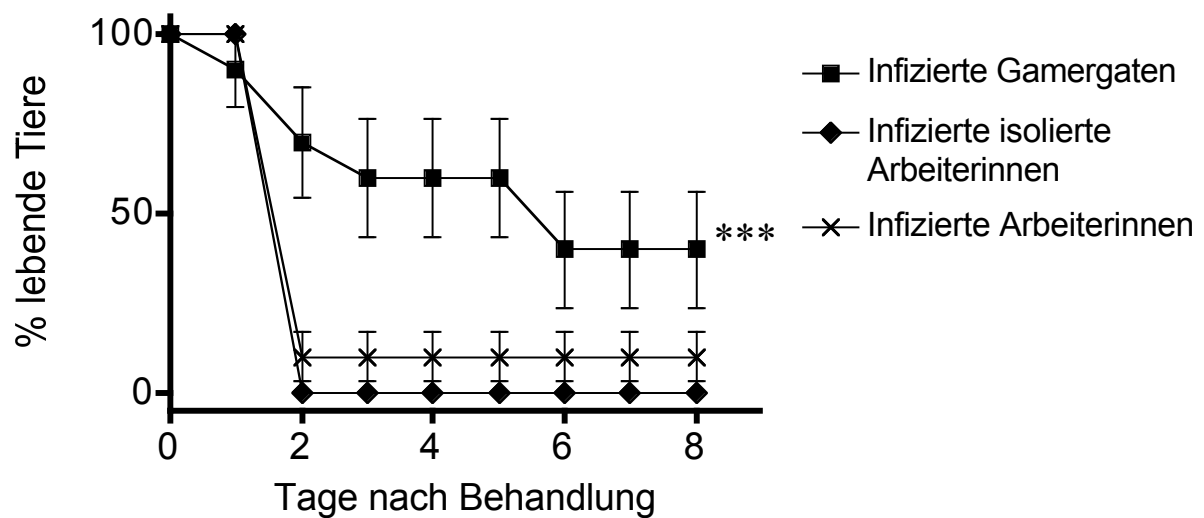


Abbildung 23: Überlebenskurven nach Infektion mit *Erwinia carotovora*.

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 20 statistisch
 ***=signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe „Infizierte Arbeiterinnen“
 $p < 0,001$, Cox Regressionsanalyse

Die Überlebenskurven der Gamergaten, Arbeiterinnen und vorisolierten Arbeiterinnen nach einer Infektion mit *Erwinia carotovora* finden sich nochmals kombiniert in Abbildung 24. Da keines der Ringer-Kontrolltiere während des Versuches starb, wurde wiederum zu Gunsten der Übersichtlichkeit auf deren Überlebenskurve verzichtet. Die Überlebenskurve der vorisolierten Arbeiterinnen liegt zwar unter der der Gamergaten, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Im Vergleich zu den Arbeiterinnen zeigen die vorisolierten Arbeiterinnen jedoch eine deutlich höhere Überlebenswahrscheinlichkeit als die Arbeiterinnen ($p < 0.001$).

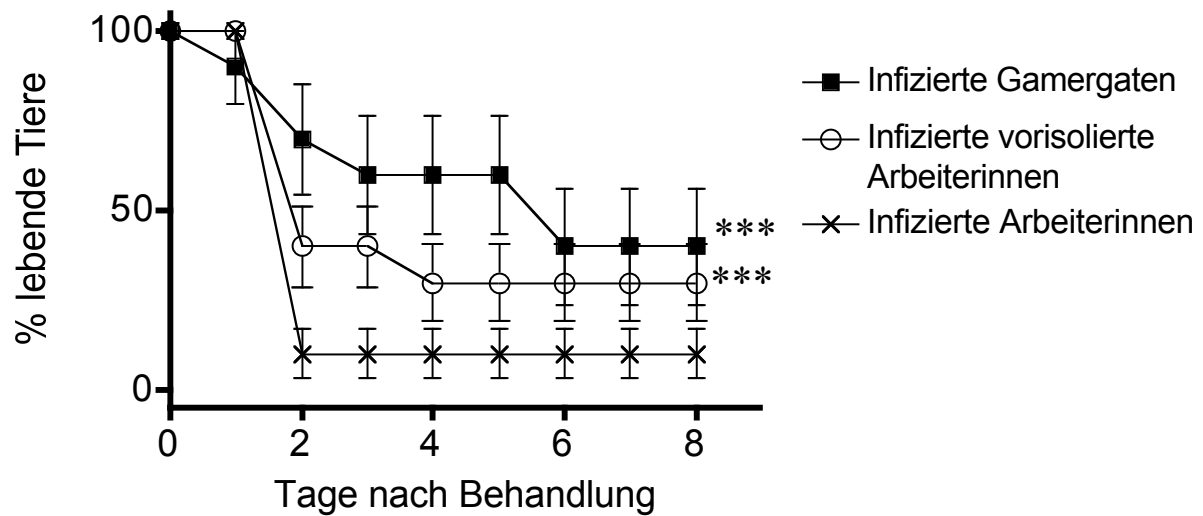


Abbildung 24: Überlebenskurven nach Infektion mit *Erwinia carotovora*.

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, $n = 20$
 ***=statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe „Infizierte Arbeiterin“
 $p < 0,001$, Cox Regressionsanalyse

3.4 Die antioxidativen Abwehrsysteme von *Harpegnathos saltator* variieren nach Alter, Gruppenzugehörigkeit und Stress

3.4.1 Aktivitäten des antioxidativen Abwehrsystems bei den Standard-Kategorien

Die Standard-Kategorien bilden die funktionale Gruppe der Gamergaten, die männlichen Tiere, Arbeiterinnen und sehr junge Arbeiterinnen (*Callows*) mit einem noch nicht vollständig ausgehärtetem Exoskelett. Bei diesen Gruppen wurden die Aktivitäten der Enzyme Catalase, Superoxid-Dismutasen, Glutathion-S-Transferasen und Glutathion-Peroxidasen gemessen. Des Weiteren wurde der Gesamtgehalt an Glutathion sowie die jeweiligen Anteile der reduzierten bzw. oxidierten Form des Glutathions am Gesamtgehalt.

3.4.1.1 Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen

Catalase

Die Aktivität der Catalase im Gesamtkörperhomogenat der Gruppen „Arbeiterin“, „Gamergate“, „Callow“ und „Männchen“ ist in Abbildung 25 dargestellt. Die Referenzgruppe „Arbeiterin“ weist mit 605 U/mg Protein den höchsten Wert der vier Gruppen auf. Mit 323 U/mg Protein weisen die Männchen eine signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Catalaseaktivität auf. Noch deutlicher von den Arbeiterinnen unterscheiden sich Gamergaten mit 192 U/mg Protein und *Callows* mit 155 U/mg Protein. In beiden Gruppen liegt die Catalaseaktivität hochsignifikant ($p < 0,001$) unter derjenigen der Arbeiterinnen.

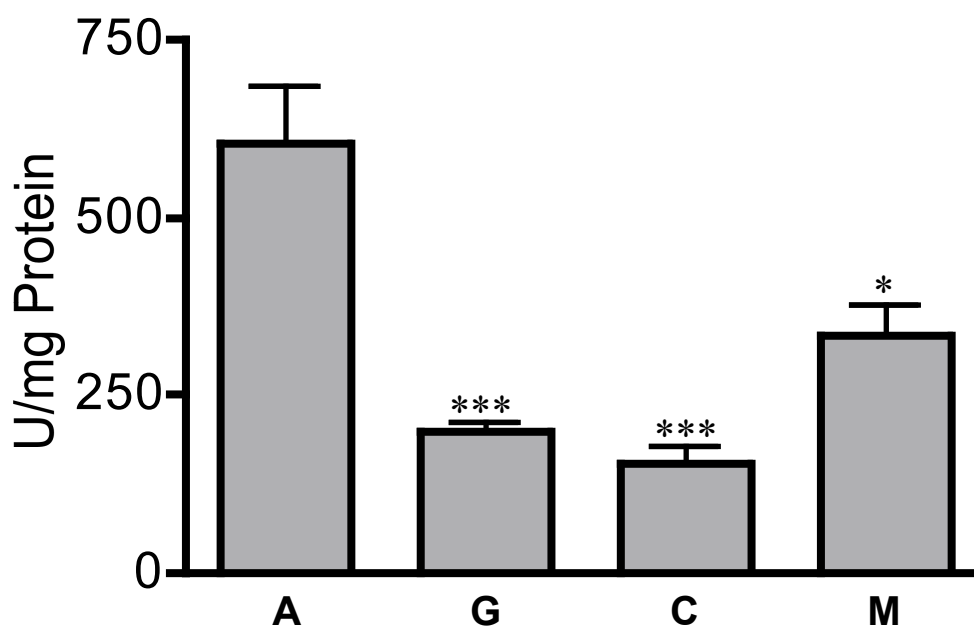


Abbildung 25: Aktivität der Catalase in Gesamtkörperhomogenaten der Standard-Kategorien

A=Arbeiterin, G=Gamergate, C=Callow, M=Männchen
 Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, $n = 10$
 * = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A),
 $p < 0,05$, Dunnett-T-Test nach ln-Transformierung
 *** = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A),
 $p < 0,001$, Dunnett-T-Test nach ln-Transformierung

Superoxid-Dismutasen

In Abbildung 26 sind die Aktivitäten der Superoxid-Dismutasen im Gesamtkörperhomogenat der Kategorien „Arbeiterin“, „Gamergaten“, „Callow“ und „Männchen“ dargestellt. Die Männchen zeigen als einzige Gruppe mit 25,2 U/mg Protein eine höhere Aktivität der Superoxid-Dismutasen als die Kontrollgruppe der Arbeiterin mit 24 U/mg Protein, während die Gamergaten mit 21,3 U/mg eine etwas geringere Aktivität aufweisen. Beide Unterschiede

sind jedoch statistisch nicht signifikant. Die Gruppe der *Callows* zeigt jedoch mit 8,5 U/mg Protein eine um 64,6 % niedrigere Superoxid-Dismutase Aktivität auf, als die Arbeiterin, was eine statistisch hoch signifikante ($p < 0,001$) Reduktion bedeutet.

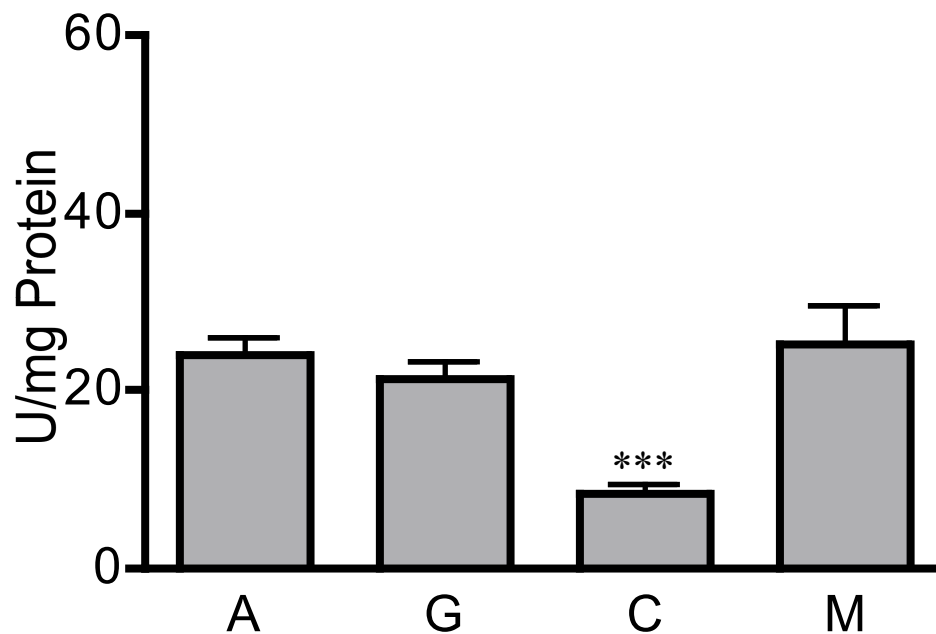


Abbildung 26: Aktivität der Superoxid-Dismutase im Gesamtkörperhomogenat der Standard-Kategorien.

A=Arbeiterin, G=Gamergate, C=Callow, M=Männchen

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, $n = 10$

*** = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe(A),

$p < 0,001$, Games-Howell-Test

Glutathion Peroxidase

Die Ergebnisse der Glutathion-Peroxidase Messungen sind in Abbildung 27 dargestellt. Die Kontrollgruppe „Arbeiterin“ weist eine Aktivität von 30,5 mU/mg Protein auf. Von diesem Wert weichen die Gamergaten mit 32 mU/mg Protein (plus 4,9 %) und die Männchen mit 37,9 mU/mg (plus 25 %) nach oben, sowie die *Callows* mit 23,4 mU/mg (minus 23 %) nach unten ab. Die Abweichungen sind jedoch statistisch nicht signifikant.

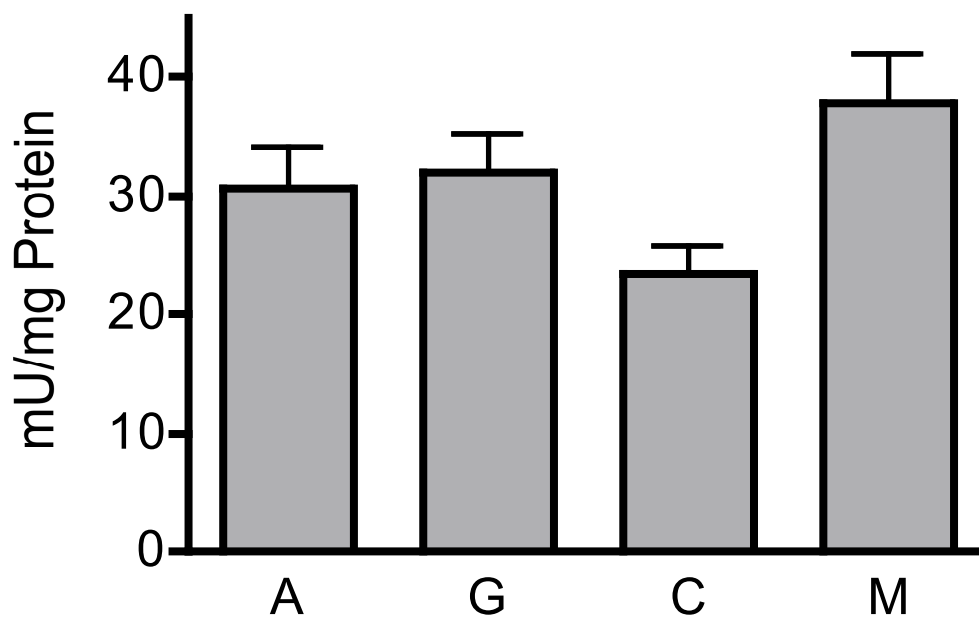


Abbildung 27: Aktivität der Glutathion-Peroxidase im Gesamtkörperhomogenat der Standardkategorien

A=Arbeiterin, G=Gamergate, C=Callow, M=Männchen

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 10

Dunnett-T-Test nach ln-Transformierung

Glutathion-S-Transferase

Die Werte der Glutathion-S-Transferase Aktivitätsmessungen sind in Abbildung 28 dargestellt. Die Gruppe „*Callows*“ zeigt mit 386 mU/mg Protein eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Aktivität gegenüber der Kontrollgruppe der Arbeiterinnen mit einer Aktivität von 661 mU/mg Protein. Die Männchen zeigen mit 616 mU/mg Protein ebenfalls eine geringere Aktivität als die Arbeiterinnen während die Gamergaten mit 801 mU/mg Protein als einzige eine höhere Aktivität aufweisen. Diese Unterschiede sind statistisch jedoch nicht signifikant.

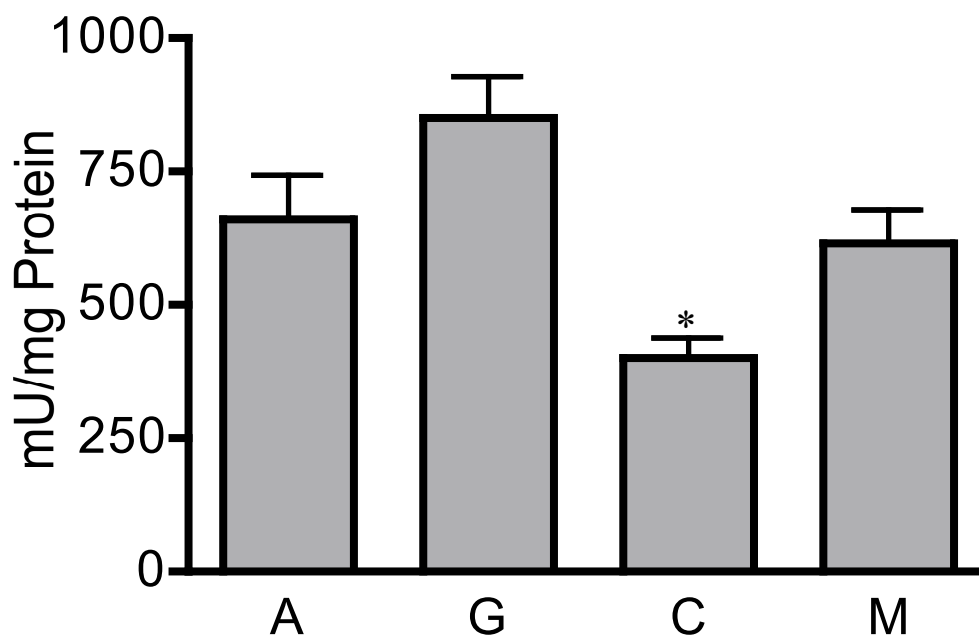


Abbildung 28: Aktivität der Glutathion-S-Transferase im Gesamtkörperhomogenat der Standard-Kategorien

A=Arbeiterin, G=Gamergate, C=Callow, M=Männchen

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, $n = 10$

* = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A),
 $p < 0,05$, Games-Howell-Test

3.4.1.2 Glutathiongehalte

Gesamtglutathion

Der Gehalt an Glutathion im Gesamtkörperhomogenisat der Standard-Kategorien ist in Abbildung 29 aufgeführt. Arbeiterinnen weisen einen Glutathiongehalt von 36,2 $\mu\text{mol/g}$ auf. Im Vergleich liegt der Glutathiongehalt der Gamergaten um 45 % (19,6 $\mu\text{mol/g}$) und der Callows um 64 % (13,1 $\mu\text{mol/g}$) niedriger (jeweils $p < 0,001$). Männchen zeigen mit 40,7 $\mu\text{mol/g}$ zwar einen um 12,6 % höheren Glutathionspiegel als die Kontrollgruppe, dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

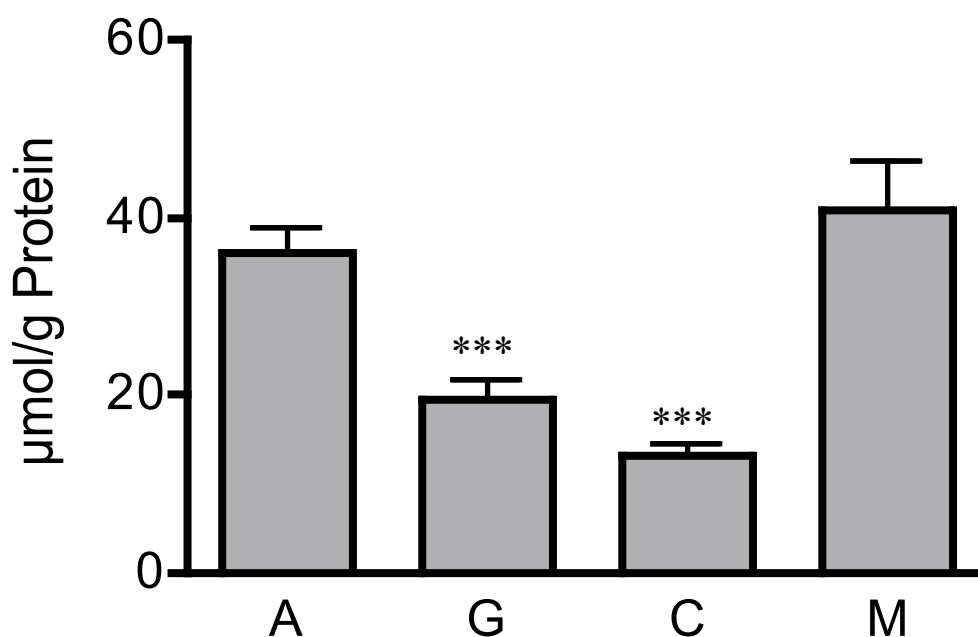


Abbildung 29: Gehalt an Gesamtglutathion im Gesamtkörperhomogenat der Standard-Kategorien

A=Arbeiterin, G=Gamergate, C=Callow, M=Männchen

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, $n = 10$

*** = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A),
 $p < 0,001$, Games-Howell-Test

Oxidiertes Glutathion

Die Menge des oxidierten Glutathions innerhalb des Gesamtglutathionspiegels wird in Abbildung 30 dargestellt. Wie zu sehen ist, weist die Kontrollgruppen „Arbeiterin“ mit $1,72\mu\text{mol/g}$ Protein den höchsten Gehalt an oxidiertem Glutathion auf. Die Gamergaten weisen mit $1,25\mu\text{mol/g}$ Protein zwar einen geringeren Gehalt an oxidiertem Glutathion auf, dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Der Gehalt an oxidiertem Glutathion ist bei den *Callows* mit $1,01\mu\text{mol/g}$ Protein und bei den Männchen mit $0,39\mu\text{mol/g}$ Protein signifikant (Männchen $p < 0,001$, *Callows* $p < 0,01$) niedriger als in der Kontrollgruppe. Bei diesen Gruppen liegt der Gehalt an oxidiertem Glutathion jedoch bei sechs (Männchen) beziehungsweise drei (*Callow*) Tieren unterhalb der Nachweisgrenze.

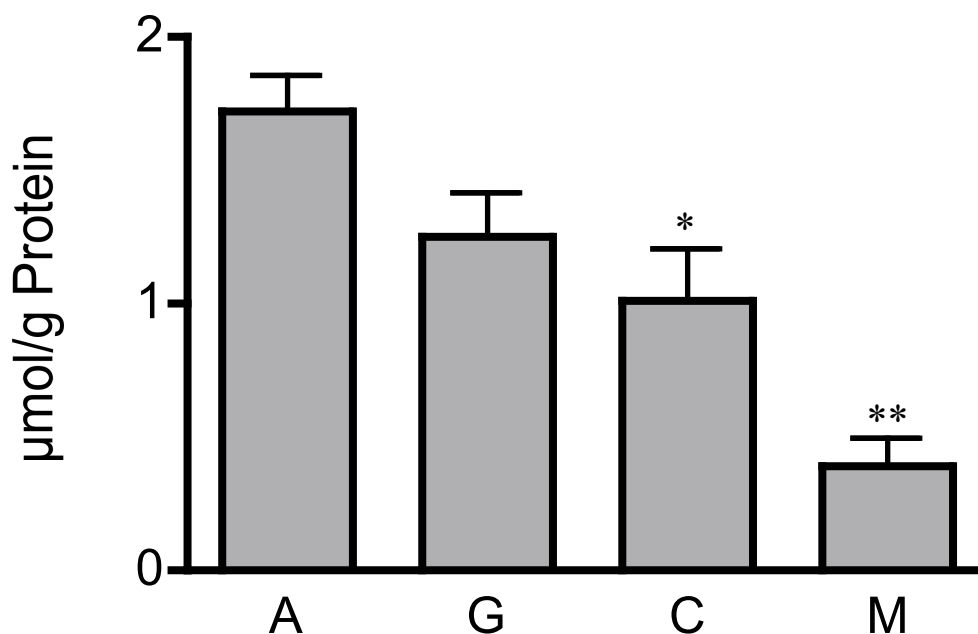


Abbildung 30: Gehalte an oxidiertem Glutathion im Gesamtkörperhomogenat der Standard-Kategorien

A=Arbeiterin, G=Gamergate, C=Callow, M=Männchen

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 10, Callow n = 7, Männchen n = 4

* = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A),

$p < 0,05$, Dunnett-T-Test

** = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A),

$p < 0,01$, Dunnett-T-Test

*** = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A),

$p < 0,001$, Dunnett-T-Test

Reduziertes Glutathion

Der in Abbildung 31 dargestellte Wert für den Gehalt an reduziertem Glutathion ergibt sich aus der Subtraktion des Wertes von oxidiertem Glutathion vom Gesamtglutathiongehalt. Sowohl Callows als auch Gamergaten weisen einen signifikant ($P < 0,001$) niedrigeren Gehalt an reduziertem Glutathion im Vergleich zu den Arbeiterinnen auf, wobei der Gehalt an reduziertem Glutathion bei den Gamergaten um 46,7 % und bei den Callows um 66,9 % niedriger liegt. Lediglich die Männchen weisen einen um 22 % höheren Gehalt an reduziertem Glutathion auf, was jedoch statistisch nicht signifikant ist.

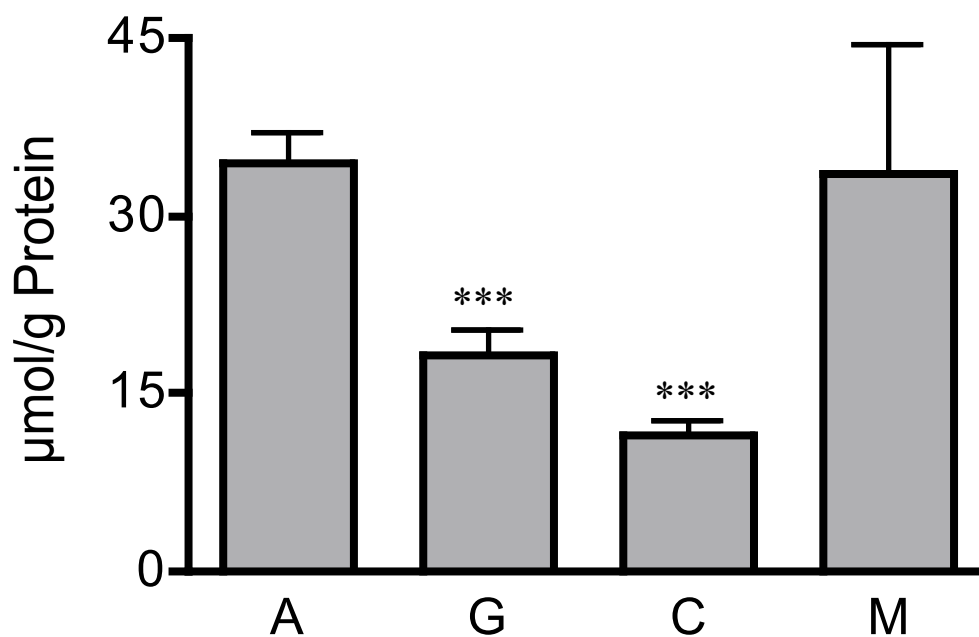


Abbildung 31: Gehalte an reduziertem Glutathion im Gesamtkörperhomogenat der Standard-Kategorien

A=Arbeiterin, G=Gamergate, C=Callow, M=Männchen

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 10, Callow = 7, Männchen n = 4

*** = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A)
 $p < 0,001$, Games- -Test

GSH/GSSG-Verhältnis

Das Verhältnis von Glutathion in seiner reduzierten Form zu oxidiertem Glutathion, ein Biomarker für oxidativen Stress, ist in Abbildung 32 dargestellt. Nur der Wert der Männchen unterscheidet sich mit 137 signifikant ($p < 0,01$) von der Kontrollgruppe mit 21. Der Wert der Gamergaten unterscheidet sich mit 21,5 kaum von dem der Kontrollgruppe während *Callows* mit einem Wert von 14,9 zwar einen geringeren Quotienten aufweisen, was jedoch statistisch nicht signifikant ist.

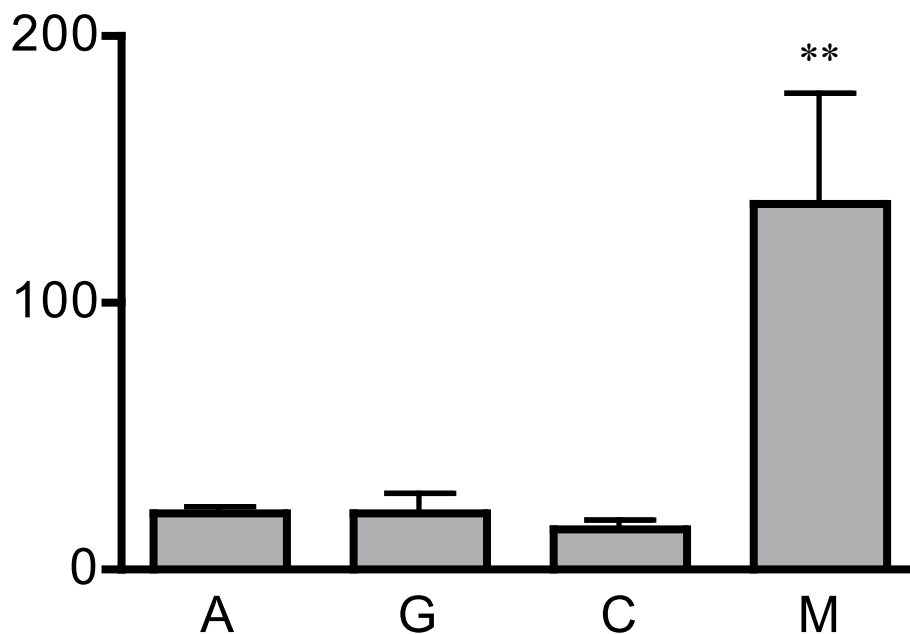


Abbildung 32: GSH/GSSG-Ratio der Standard-Kategorien

A=Arbeiterin, G=Gamergate, C=Callow, M=Männchen

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 10, Callow n = 7, Männchen n = 4

** = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A), $p < 0,01$, ermittelt durch Mann-Whitney-U-Test

3.4.2 Der Zustand des antioxidativen Abwehrsystems unter dem sozialen Stress der Dominanzkämpfe

3.4.2.1 Die Aktivitäten der Enzyme

Catalase

Die Catalaseaktivität der duellierenden Arbeiterinnen im Vergleich zu den normalen Arbeiterinnen ist in Abbildung 33 dargestellt. Mit 567 U/mg Protein liegt sie leicht unter der Aktivität der Kontrollgruppe mit 605 U/mg Protein.

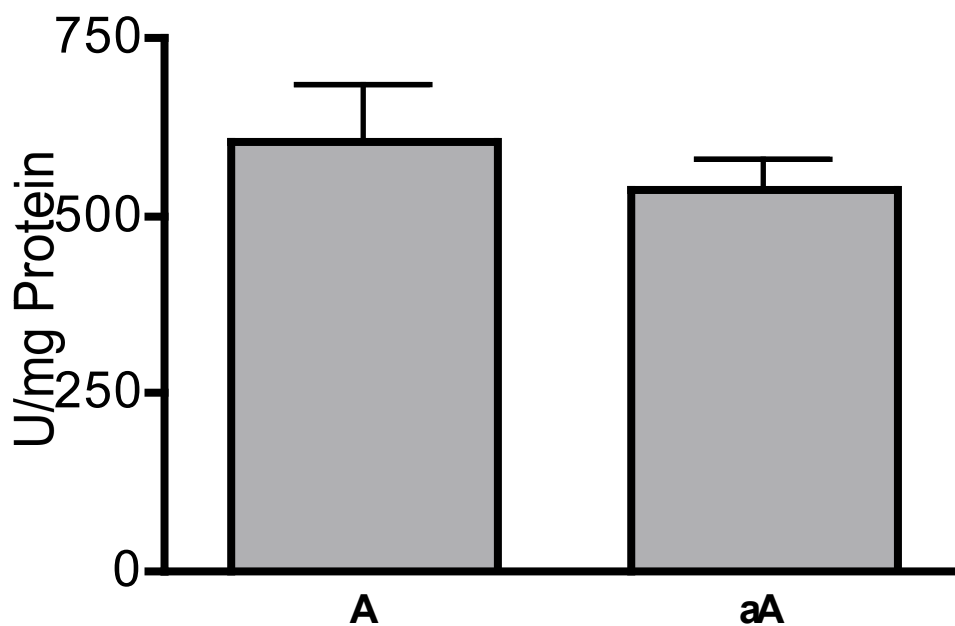


Abbildung 33: Aktivität der Catalase im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen.

A=Arbeiterin, aA=aggressive Arbeiterin

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 10

Dunnett-T-Test nach ln-Transformierung

Superoxid-Dismutasen

Die Aktivität der Superoxid-Dismutasen der Gruppe der duellierenden Arbeiterinnen liegt mit 19,4U/mg Protein ebenfalls leicht unter dem Wert von 24U/mg Protein der normalen Arbeiterinnen (Abbildung 34).

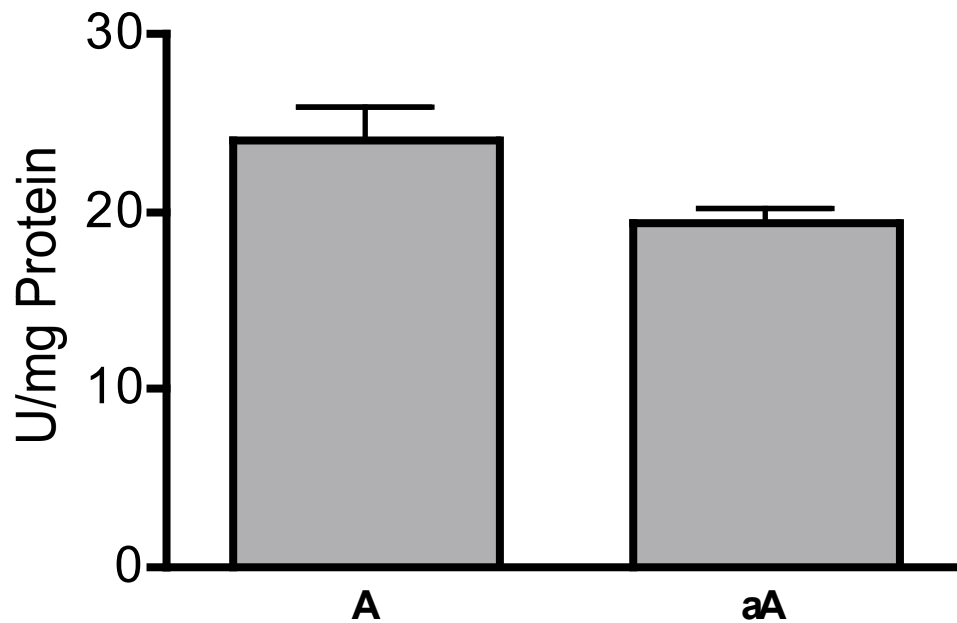


Abbildung 34: Aktivität der Superoxid-Dismutase im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen.

A=Arbeiterin, aA=aggressive Arbeiterin

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 10
Games-Howell-Test

Glutathion Peroxidase

Abbildung 35 zeigt die Aktivität der Glutathion-Peroxidasen von normalen Arbeiterinnen im Vergleich zu duellierenden Arbeiterinnen. Die Aktivitäten der duellierenden Arbeiterinnen lagen mit 64mU/mg Protein um 109 % über dem Wert von 30,5 mU/mg Protein der Kontrollgruppe. Damit ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$).

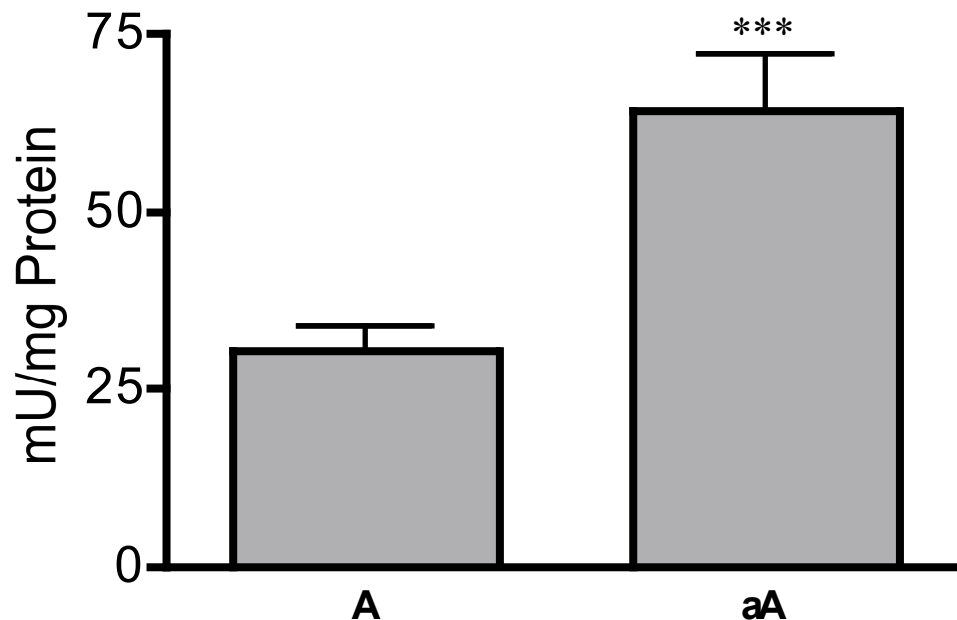


Abbildung 35: Aktivität der Glutathion-Peroxidase im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen.

A=Arbeiterin, aA=aggressive Arbeiterin

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, $n = 10$

*** = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A)

$p < 0,001$, Dunnett-T-Test nach ln-Transformierung

Glutathion-S-Transferase

Die in Abbildung 36 dargestellte Wert der Glutathion-S-Transferasen-Aktivität der duellierenden Arbeiterinnen liegt mit 270mU/mg Protein deutlich ($p < 0,001$) unter dem Wert der Kontrollgruppe von 661mU/mg.

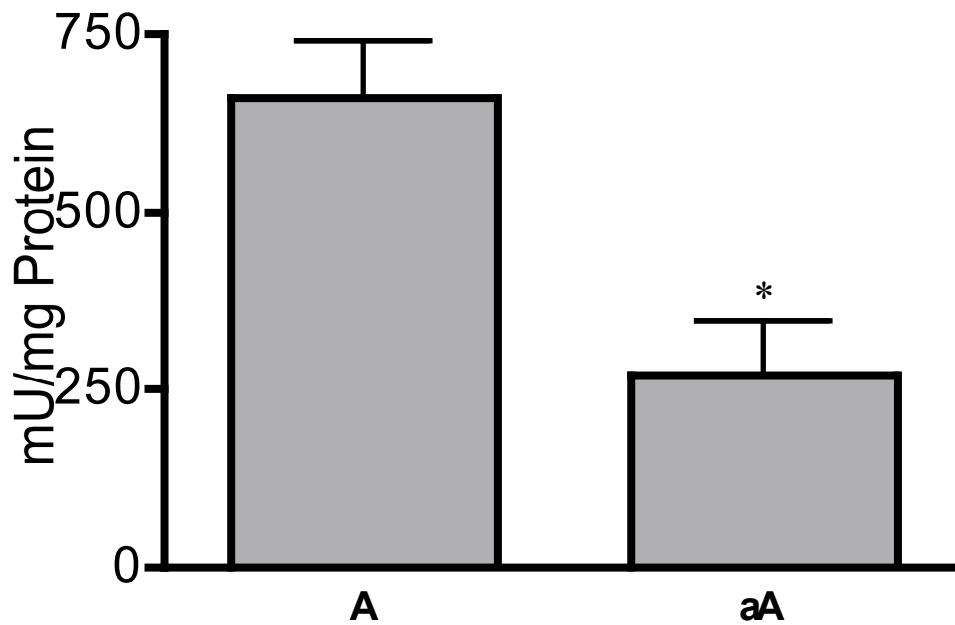


Abbildung 36: Aktivität der Glutathion-S-Transferase im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen.

A=Arbeiterin, aA=aggressive Arbeiterin

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, $n = 10$

*** = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A)

$p < 0,001$, Games-Howell-Test

Direkter Vergleich GST/GPx

In Abbildung 37 sind die Aktivitätswerte der Glutathion-Peroxidasen und der Glutathion-S-Transferasen aus den Abbildungen 35 und 36 nochmals in einer Graphik zusammengefasst, um die reziproke Entwicklung der beiden Enzymaktivitäten während der Phase der Hierarchiekämpfe zu verdeutlichen.

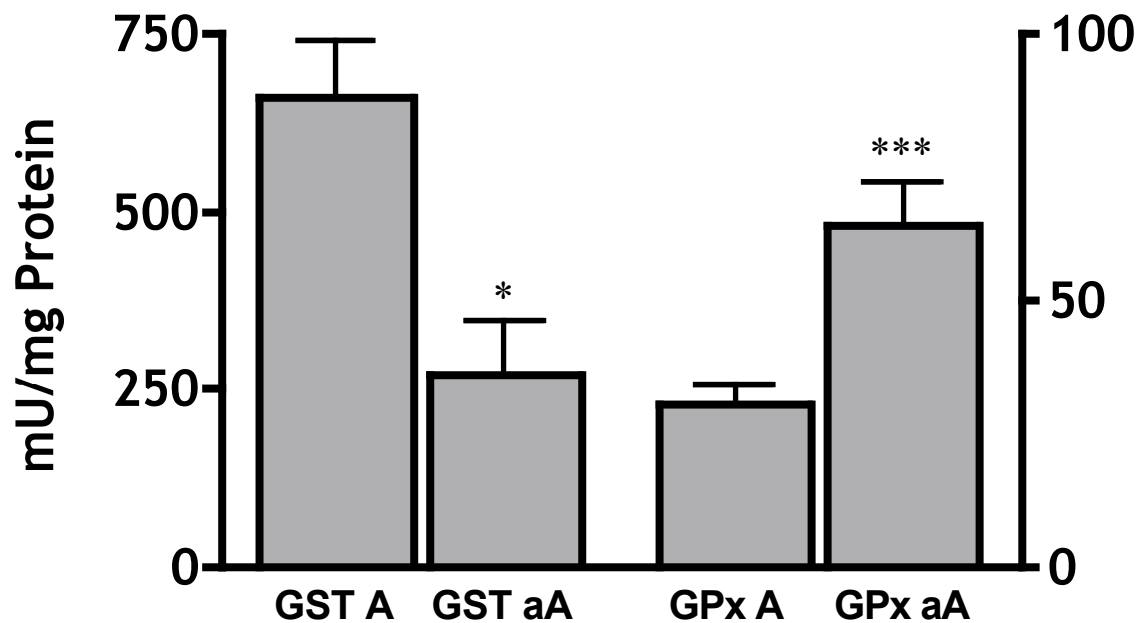


Abbildung 37: Aktivität der Glutathion-Peroxidase Glutathion-S-Transferase im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen.

GST A=GST Arbeiterin, GST aA=GST aggressive Arbeiterin GPx A=GPx Arbeiterin, GPx aA=GPx aggressive Arbeiterin

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 10

* = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A),

p < 0,05

*** = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A),

p < 0,001

Games-Howell-Test bei Glutathion-S-Transferase

Dunnett-T-Test nach ln-Transformierung bei Glutathion-Peroxidase

3.4.2.2 Der Glutathiongehalt

Glutathionspiegel

Der in Abbildung 38 dargestellte Gehalt an Gesamtglutathion (das heißt sowohl GSH als auch GSSG) liegt bei den aggressiven Arbeiterinnen 18,3 % unter dem Wert der Kontrollgruppe. Damit unterscheidet er sich jedoch nicht signifikant von der Gruppe „Arbeiterin“.

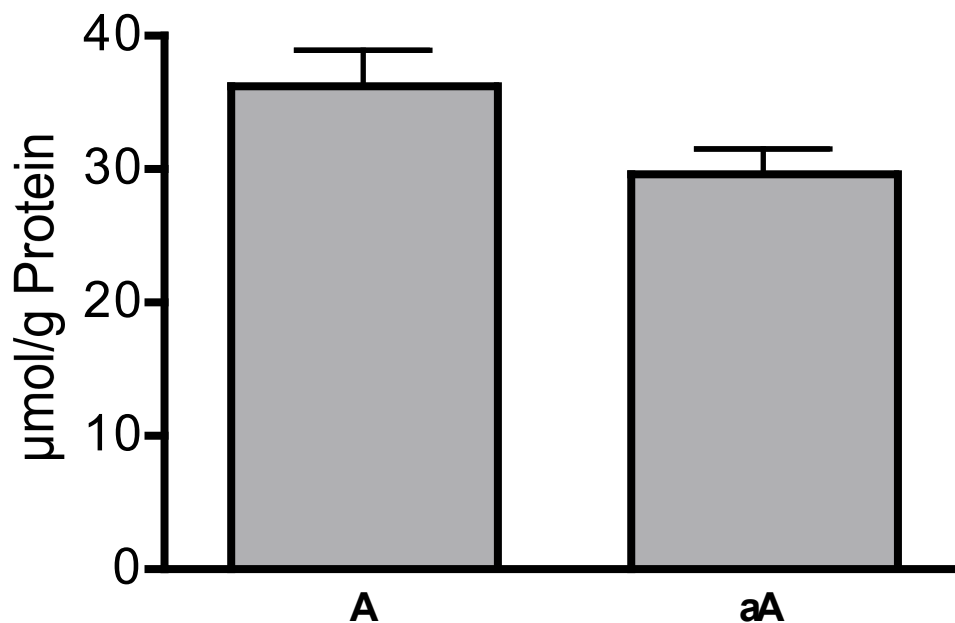


Abbildung 38: Gehalte an gesamtem Glutathion im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen

A=Arbeiterin, aggressive Arbeiterin=aA

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 10

Games-Howell-Test

Oxidiertes Glutathion

Mit einem Wert von $1,18 \mu\text{mol/g}$ Protein liegt der Gehalt an oxidiertem Glutathion bei den aggressiven Arbeiterinnen signifikant ($p < 0,05$) unter dem Wert der Kontrollgruppe, der bei $1,72 \mu\text{mol/g}$ Protein liegt (siehe Abbildung 39).

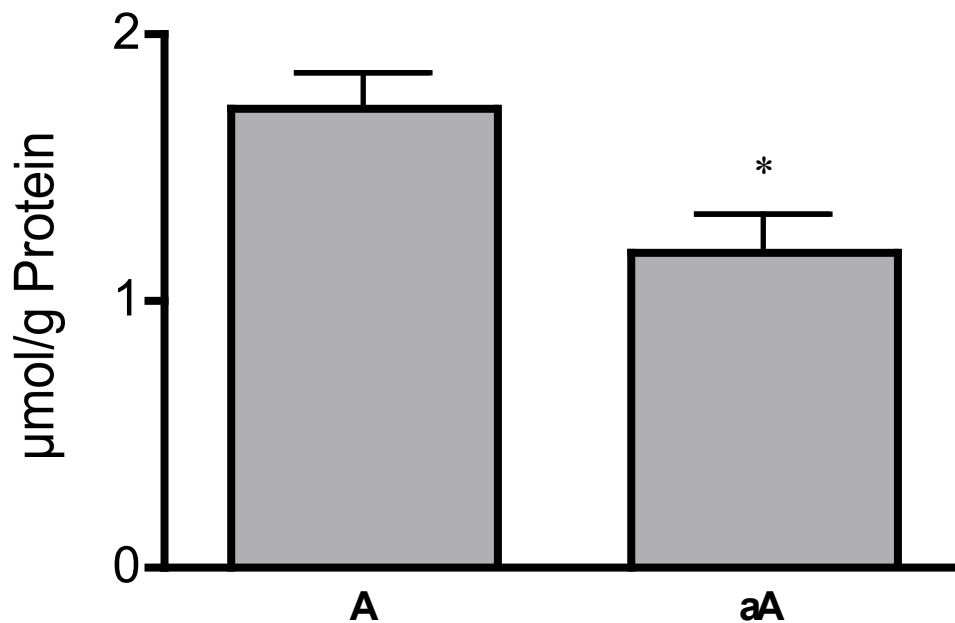


Abbildung 39: Gehalte an oxidiertem Glutathion im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen.

A=Arbeiterin, aggressive Arbeiterin=aA

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, $n = 10$

* = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A)

$p < 0,05$, Dunnett-T-Test

Reduziertes Glutathion

Der Gehalt an reduziertem Glutathion, der in Abbildung 40 dargestellt ist, liegt bei den aggressiven Arbeiterinnen um circa 17 % unter dem Wert der Kontrollgruppe, was statistisch nicht signifikant ist.

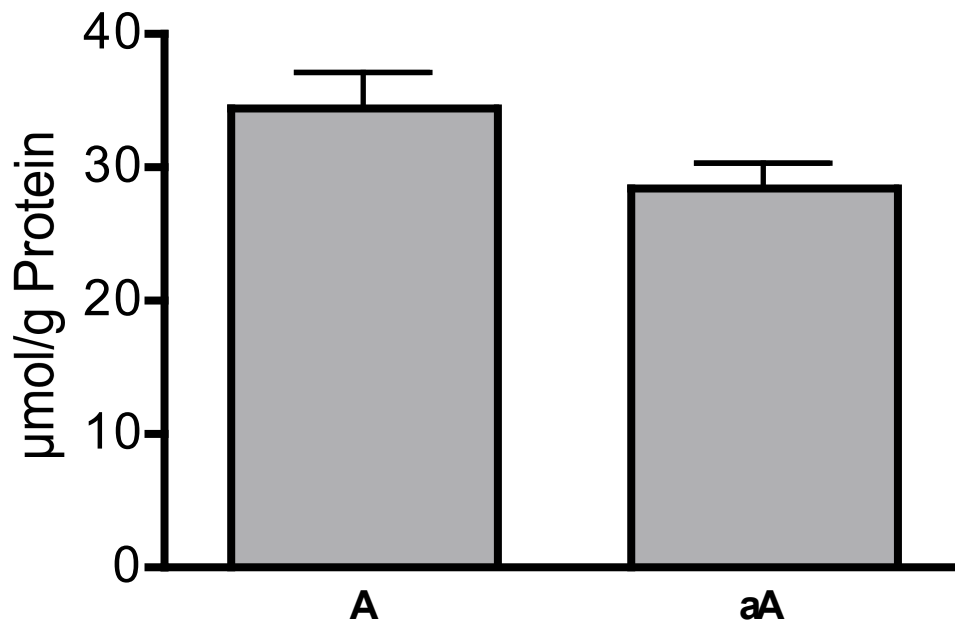


Abbildung 40: Gehalte an reduziertem Glutathion im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen

A=Arbeiterin, aggressive Arbeiterin=aA

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 10
Games-Howell-Test

Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion

Die GSH/GSSG-Ratio, die sich aus den in den Abbildungen 39 und 40 dargestellten Werten ergibt, liegt zwar bei den aggressiven Arbeiterinnen höher als bei der Kontrollgruppe, unterscheidet sich allerdings nicht signifikant von diesem (siehe Abbildung 41).

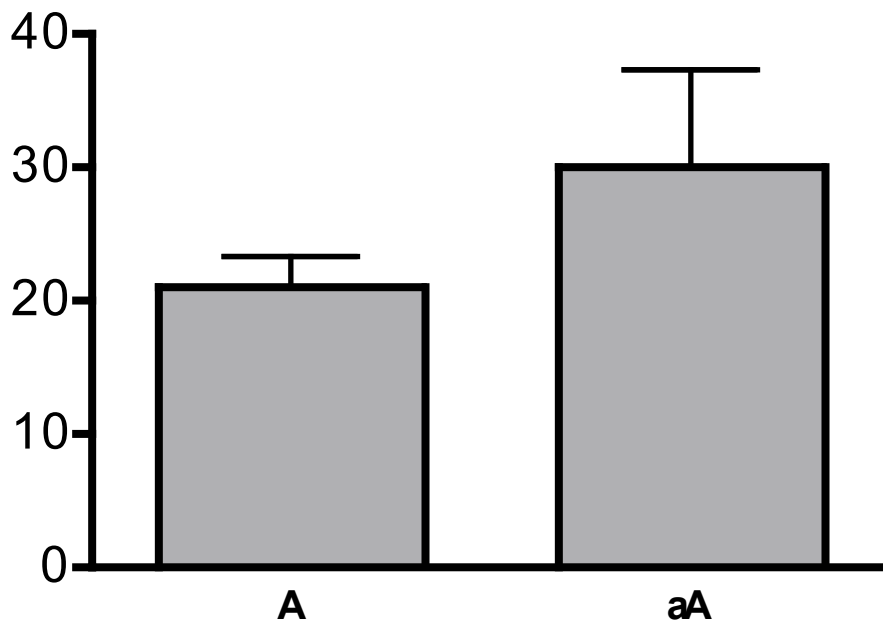


Abbildung 41: GSH/GSSG-Ratio der Arbeiterinnen und aggressiven Arbeiterinnen

A=Arbeiterin, aggressive Arbeiterin=aA

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 10
Mann-Whitney U-Test

3.4.3 Die Aktivitäten der Superoxid-Dismutasen und Catalase nach Induktion von oxidativem Stress bei Gamergaten und Arbeiterinnen

Catalase

Abbildung 42 zeigt die Catalaseaktivität im Ganzkörperhomogenisat von Arbeiterinnen und Gamergaten im Vergleich zu Arbeiterinnen und Gamergaten 48 Stunden nach Injektion der oxidativen Stress induzierenden Paraquat. Während normale Arbeiterinnen eine Aktivität von 605 U/mg Protein zeigen fällt dieser Wert nach Induktion von oxidativem Stress auf den Wert 109 U/mg Protein ab, was eine deutliche Reduktion bedeutet ($p < 0,001$). Auch bei den Gamergaten geht die Catalaseaktivität nach Injektion der Paraquat Lösung zurück: Sie sinkt von 192 U/mg Protein auf 164 U/mg Protein, was jedoch statistisch nicht signifikant ist.

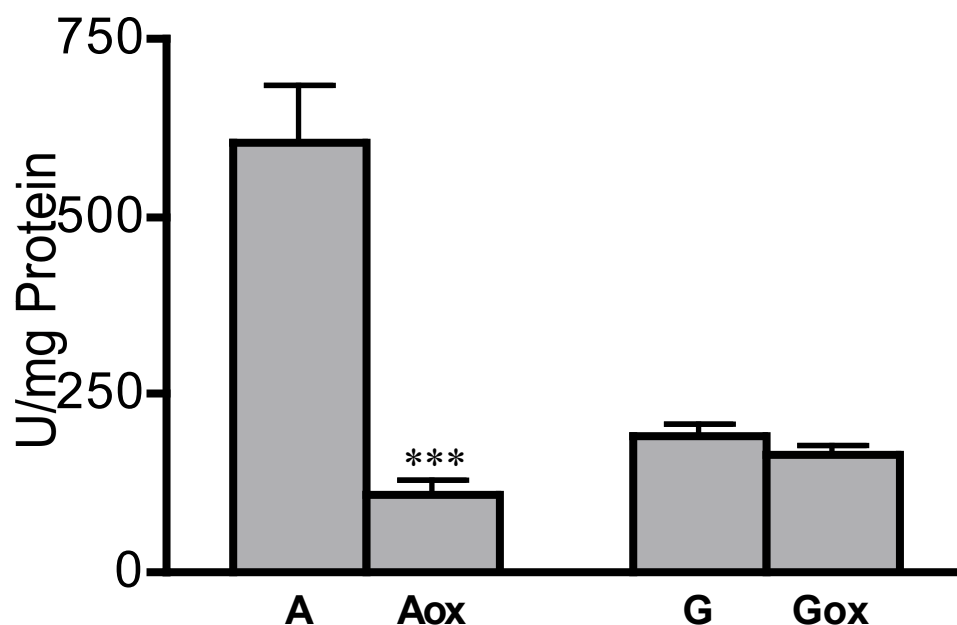


Abbildung 42: Aktivität der Catalase in Gesamtkörperhomogenat Arbeiterinnen und Gamergaten mit und ohne Paraquat-Behandlung.

A=Arbeiterin, G=Gamergate, Aox=mit Paraquat behandelte Arbeiterin, Gox=mit Paraquat behandelte Gamergate
 Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 10, Gox n=9
 *** = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (Aox zu A; Gox zu G),
 $p < 0,001$, Dunnett-T-Test nach ln-Transformierung

Superoxid-Dismutase

Die Aktivitäten der Superoxid-Dismutasen der unbehandelten Gruppen im Vergleich zu den Gruppen unter oxidativem Stress sind in Abbildung 43 dargestellt. Sowohl bei den Gamergaten als auch bei den Arbeiterinnen sinkt die Aktivität der Superoxid-Dismutasen nach Induktion von oxidativem Stress durch die Injektion der Paraquat-Lösung. Der Wert der Arbeiterinnen geht von ursprünglich 24 U/mg auf 16 U/mg Protein zurück während der Wert der Gamergaten von 21,3 U/mg Protein auf 14,9 U/mg Protein sinkt.

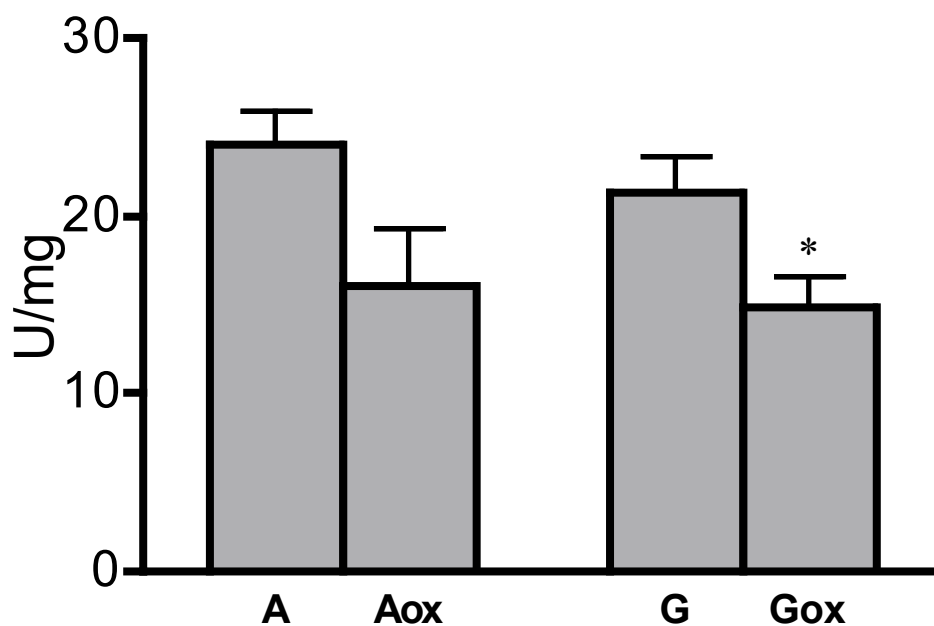


Abbildung 43: Aktivität der Superoxid-Dismutase im Gesamtkörperhomogenat Arbeiterinnen und Gamergaten mit und ohne Paraquat-Behandlung.

A=Arbeiterin, G=Gamergate, Ao=mit Paraquat behandelte Arbeiterin, Go=mit Paraquat behandelte Gamergate

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 10, Gox n=8

* = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Ao zu A, Go zu G),

p < 0,05, Games-Howell-Test

3.4.4 Der Einfluss von sozialer Isolation auf die Aktivitäten der Superoxid-Dismutasen und der Catalase

Catalase

Abbildung 44 zeigt die Catalaseaktivitäten der Ganzkörperhomogenate von Arbeiterinnen, Gamergaten und vorisolierten Arbeiterinnen. Wie bereits in Abbildung 25 gezeigt, beträgt die Aktivität der Arbeiterinnengruppe 605 U/mg Protein und die der Gamergatengruppe 192 U/mg Protein. Die Aktivität der vorisolierten Arbeiterinnen liegt mit 139 U/mg Protein signifikant ($p < 0,001$) unter der der Arbeiterinnen, unterscheidet sich jedoch nur leicht von der der Gamergaten.

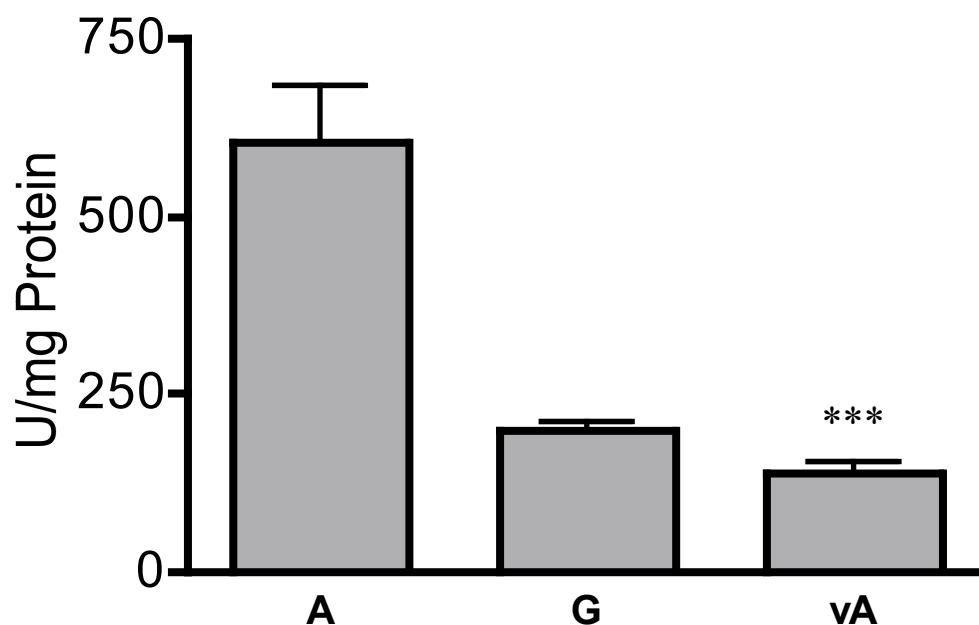


Abbildung 44: Aktivität der Catalase im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen, Gamergaten und vorisolierten Arbeiterinnen.

Arbeiterinnen=A, Gamergaten=G, vorisolierte Arbeiterinnen=vA
Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, $n = 10$
*** = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A),
 $p < 0,001$, Dunnett-T-Test nach ln-Transformierung

Superoxid-Dismutase

In Abbildung 45 sind die Aktivitäten der Superoxid-Dismutasen in den Ganzkörperhomogenaten der Gruppen „Arbeiterin“, „Gamergate“ und „vorisolierte Arbeiterin“ dargestellt. Die Werte der Gamergaten (21 U/mg Protein) und Arbeiterinnen (24 U/mg Protein) unterscheiden sich nicht signifikant. Die Aktivität der vorisolierten Arbeiterinnen ist mit 40 U/mg Protein zwar die höchste aller Gruppen, dieser Unterschied ist jedoch ebenfalls nicht signifikant.

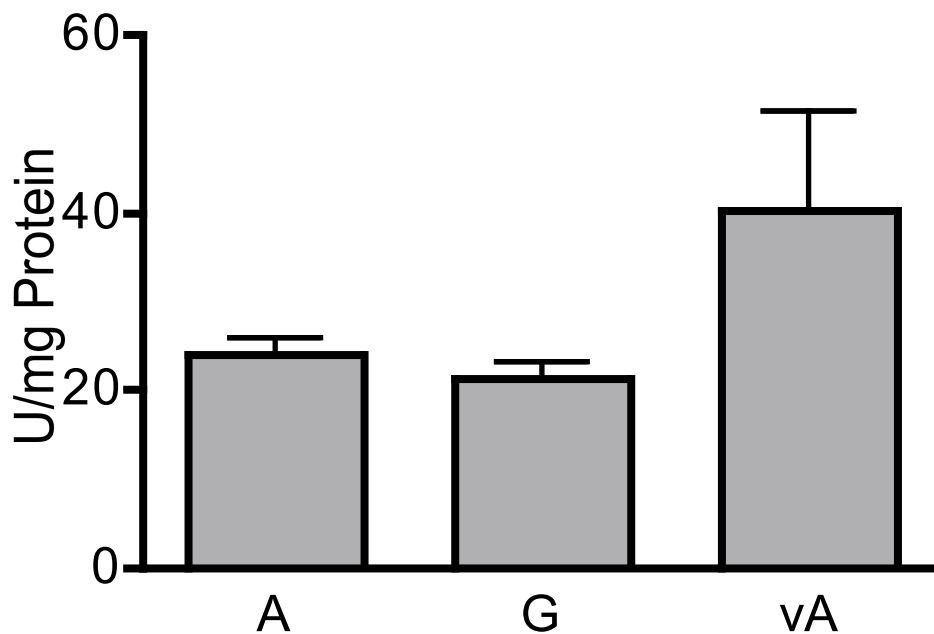


Abbildung 45 : Aktivität der Superoxid-Dismutase im Gesamtkörperhomogenat von Arbeiterinnen, Gamergaten und vorisolierten Arbeiterinnen.

Arbeiterinnen=A, Gamergaten=G, vorisolierte Arbeiterinnen=vA

Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts, n = 10

*** = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (A),
p < 0,001, Games-Howell-Test

3.5 Übersichtstabelle zu den Enzymaktivitäten und Glutathionspiegeln

In Tabelle 1 sind nochmals die Aktivitäten der Catalase, Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und der Glutathion-S-Transferase sowie die Spiegel des gesamten, des oxidierten, des reduzierten und der Quotient aus reduziertem und oxidiertem Glutathion der einzelnen Kategorien im Vergleich zu den Arbeiterinnen dargestellt. Gelb unterlegte Felder bedeuten, dass sich der Wert der Kategorie nicht signifikant vom Wert der Arbeiterinnen unterscheidet. Rot unterlegte Felder bedeuten einen niedrigeren Wert als die Kontrollgruppe und grün unterlegte Felder einen höheren Wert als die Kontrollgruppe. Dabei geben die in den Feldern befindlichen Sterne das Signifikanzniveau des Unterschiedes an (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Für die grau unterlegten Felder wurden keine Daten ermittelt.

	Gamergate	Callow	Männchen	Aggressive Arbeiterin	vorisierte Arbeiterin	Arbeiterin unter oxidativem Stress	Gamergate unter oxidativem Stress
Cat-Aktivität	***	***	*		***	***	***
SOD-Aktivität		***			***		*
GPx-Aktivität				***			
GST-Aktivität		*		***			
GSx-Gehalt	***	***					
GSSG-Gehalt		**	***	*			
GSH-Gehalt	***	***					
GSH/GSSG			**				

Tabelle 1: Zusammenfassung der Enzymaktivitäten und Glutathionspiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe Arbeiterin.

Dargestellt sind Abweichungen des Wertes von der Kontrollgruppe „Arbeiterin“

Rote Unterlegung: Abweichung nach unten

Grüne Unterlegung: Abweichung nach oben

Gelbe Unterlegung: Keine signifikante Abweichung

Graue Unterlegung: Keine Daten vorhanden

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Statistische Tests:

Cat; GPx; GSSG: Dunnett-T-Test nach In-Transformierung

SOD; GST; GSx; GSH: Games-Howell-Test

GSSG: Dunnett-T-Test

GSH/GSSG: Mann-Whitney-U-Test

4. Diskussion

Die Lebensspanne eines Organismus wird von mehreren Faktoren beeinflusst: Von zentraler Bedeutung ist die maximale Lebensspanne (MLSP) die der Spezies zu Eigen ist. Darüber hinaus haben zahlreiche extrinsische und intrinsische Faktoren großen Einfluss auf die Lebensspanne. Neben „*all-or-nothing*“ Faktoren wie dem Selektionsdruck durch Beutegreifer spielen vor allem Stress auslösende Faktoren eine wichtige Rolle im Alterungsprozess, dessen Fortschreiten letztendlich die Lebensdauer begrenzt. Bei eusozialen Hymenopteren tritt die besondere Situation auf, dass genetisch äußerst nahe verwandte Individuen einer Kolonie eine stark variierende MLSP aufweisen. Es tritt also die Situation auf, dass in einer Spezies verschiedenen MLSP vorkommen. Bei der ponerinen Ameisenart *Harpegnathos saltator* kommt als weitere Besonderheit hinzu, dass ihre Kolonien zwar aus Kasten mit verschiedenen MLSP bestehen, aber dass Individuen auch in der Lage sind, während ihres adulten Lebens von einer in die andere Gruppe zu wechseln und damit ihre MLSP um mehr als das doppelte zu steigern. Damit hat *Harpegnathos saltator* eine extrem variable MLSP. Diese einzigartige Situation ermöglicht es, diejenigen Faktoren zu identifizieren, die für eine Verlängerung der Lebensspanne verantwortlich sind. Aus diesem Grund habe ich die Resistenz der verschiedenen Gruppen, jenseits ihrer genetischen Disposition, gegen die Stressoren „radikale Sauerstoffspezies“ und „Infektion durch Pathogene“ getestet und somit Rückschlüsse auf deren Bedeutung für die Begrenzung der Lebensspanne in natürlichen Organismen gezogen. Zunächst wurden Tiere der Kasten „Gamergaten“ und „Arbeiterinnen“, die Unterschiede in ihrer Lebenserwartung aufweisen, mit dem ROS-induzierenden Agens Paraquat behandelt, beziehungsweise mit dem Gram-negativen Bakterium *Erwinia carotovora* infiziert. Anschließend wurden ihre Überlebenskurven als Maß für ihre Resistenz gegen diese Stressoren ermittelt. Die gleichen Verfahren wurden auch auf Arbeiterinnen angewandt, die sich im Prozess des Kasten- und MLSP-Wechsels befinden und unter zusätzlichem sozialen Stress durch aktives aggressives Verhalten stehen. Schließlich wurden die ROS- und Pathogen-Resistenzen von Arbeiterinnen unter dem Stressfaktor „soziale Isolation“ ermittelt. Bei diesen Versuchen wurde zusätzlich zwischen Tieren unterschieden, die bereits einige Zeit in Isolation gehalten wurden und Tieren, die erst nach ihrer Behandlung von ihren Nestgenossinnen getrennt wurden.

Um den molekularen Grundlagen der kasten-abhängigen bzw. stress-beeinflussten Unterschiede in der ROS-Resistenz auf die Spur zu kommen, wurden die Aktivitäten einiger

Enzyme des ROS-Abwehrsystems (Catalase, Superoxid-Dismutasen, Glutathion-S-Transferasen, Glutathion-Peroxidasen) sowie die Quantität und Qualität des Glutathionspiegels der einzelnen Kategorien ermittelt. Um bessere Vergleichsmöglichkeiten zu schaffen, wurden nicht nur die Werte der Arbeiterinnen und Gamergaten gemessen, sondern darüber hinaus auch die Werte vom Männchen, die eine Lebenserwartung von einigen Tagen bis Wochen besitzen und jungen Arbeiterinnen mit einer Rest-Lebenserwartung von circa 18 Monaten ermittelt.

Die gleichen Messungen wurden an den aggressiven Arbeiterinnen aus Kolonien, die sich in der Phase der Dominanzkämpfe befinden, durchgeführt. Des Weiteren wurden die Catalase- und Superoxid-Dismutasen-Aktivitäten der mit Paraquat behandelten Arbeiterinnen und Gamergaten sowie der in Isolation gehaltenen Arbeiterinnen ermittelt.

4.1 Die Situation der natürlichen Gruppen

4.1.1 Die Resistenzen gegen ROS und Pathogene sind kasten- und situationsspezifisch

Die freie-Radikale-Theorie des Alterns postuliert, dass die Ursache des Alterungsprozess die Akkumulation von Schäden an Biomolekülen ist, die durch freie Radikale, insbesondere jedoch durch reaktive Sauerstoffspezies, hervorgerufen werden (Harman 1956). Von Gamergaten ist bekannt, dass sie mit einer MLSP von über vier Jahren die MLSP von normalen Arbeiterinnen derselben Kolonie um mehr als das Doppelte übertreffen können (persönliche Mitteilung von Jürgen Liebig). Nimmt man an, dass ROS tatsächlich einen entscheidenden Beitrag zum physiologischen Alterungsprozess leisten, liegt es nahe, die antioxidativen Abwehrsysteme dieser beiden Kasten auf Unterschiede in ihrer Effizienz zu überprüfen. Tatsächlich überleben mit Paraquat-Lösung injizierte Gamergaten die ersten acht Tage nach der Behandlung zu einem signifikant höheren Prozentsatz als Arbeiterinnen.

Neben einer erhöhten Resistenz gegen oxidativen Stress weisen Gamergaten im Vergleich zu Arbeiterinnen ihrer Kolonie auch eine erhöhte Resistenz gegen das Insekten- und Phytopathogen *Erwinia carotovora* auf. Von anderen eusozialen Insekten ist bekannt, dass die reproduktiven Weibchen Unterschiede im Immunsystem gegenüber den Arbeiterinnen aufweisen: Die im Vergleich zu ihren Arbeiterinnen extrem langlebigen Königinnen der schwarzen Wegameise *Lasius niger* zeigen eine erhöhte Expression einiger Gene, die eine Rolle bei der Immunantwort spielen. So ist zum Beispiel die Expression eines Serin-Proteinase-Inhibitor-Homologs bei den Königinnen im Vergleich zu den Arbeiterinnen stark

erhöht (Gräff *et al* 2007). Serin-Proteinase-Inhibitoren spielen in Arthropoden eine Rolle bei der Abwehr bakterieller Serin-Proteinasen sowie bei der Regulation der proteolytischen Kaskaden sie zu Coagulation der Hämolymphe und zu Melanisierung nach Verwundungen und Infektionen führen (Kanost 1999).

4.1.2 Die verschiedenen Kasten von *Harpegnathos saltator* weisen Unterschiede in ihren ROS-Abwehrsystemen auf

4.1.2.1 Zwischen den Gruppen bestehen Unterschiede in den Aktivitäten des antioxidativen Abwehrsystems

Die Aktivität der Superoxid-Dismutasen, die die erste Reihe im Abwehrkampf gegen ROS bilden, unterscheidet sich zwischen Gamergaten und Arbeiterinnen nicht signifikant. Auch die Aktivität der Superoxid-Dismutasen in der Kategorie „Männchen“ unterscheidet sich kaum von der Kontrollgruppe. Lediglich *Callows* weisen eine signifikant geringere Superoxid-Dismutase Aktivität auf. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der bisher veröffentlichten Literatur bei eusozialen Insekten. So konnte bei den besonders langlebigen Königinnen der schwarzen Wegameise *Lasius niger*, die ein Alter von 28 Jahren erreichen kann (Hölldobler & Wilson 1990), keine erhöhte Expression der Cu/ZnSOD im Vergleich zu den Arbeiterinnen nachgewiesen werden (Parker *et al.* 2004). Diese Muster findet sich auch bei der Königin der Honigbiene *Apis mellifera* (Corona *et al.* 2005). Geht man weiterhin davon aus, dass der von ROS ausgelöste Stress mit fortschreitendem Alter durch eine verstärkte ROS-Produktion zunimmt (Wei *et al.* 2001), kann die niedrige Aktivität der Superoxid-Dismutasen in der Gruppe *Callows* ein Hinweis darauf sein, dass die jungen Tiere noch nicht in dem gleichen Maß unter dem Einfluss von oxidativem Stress stehen wie Arbeiterinnen im fortgeschrittenen Alter. Die Aktivitätswerte der Männchen, die sich nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe unterscheiden, zu interpretieren, stellt sich angesichts ihrer unterschiedlichen Morphologie, Physiologie, Ontogenie, genetischen Ausstattung und „*life history*“ etwas schwieriger dar. Männchen sind, wie *Callows*, sehr junge, nur wenige Tage alte Tiere. Anders als *Callows*, die eine Lebenserwartung von circa 18 Monaten als Arbeiterinnen beziehungsweise über 4 Jahre besitzen, gesetzt den Fall sie setzten sich als Gamergate durch, haben die Männchen lediglich eine restliche Lebenserwartung von ein bis zwei Wochen, also maximal etwa ein Vierzigstel ihrer Schwestern. Die relativ hohen Superoxid-Dismutase Aktivitäten stellen unter Umständen eine Vorbereitung auf die physiologischen Belastungen des Hochzeitflugs dar.

Die Superoxid-Dismutase Aktivitätswerte der Gamergaten stehen in Einklang mit denen der

langlebigen Königinnen-Kaste bei *Lasius niger* (siehe oben). Auch bei den Königinnen der Honigbiene finden sich keine im Vergleich zu den Arbeiterinnen erhöhte Aktivitäten der Enzyme des antioxidativen Abwehrsystems (Corona *et al.* 2005). Ein Gegensatz besteht allerdings zu den in der Literatur zu findenden Werten von genetisch manipulierten Modellorganismen mit erhöhter ROS-Resistenz und Lebenserwartung. So wurde nachgewiesen, dass eine Überexpression der SOD1 in *Saccharomyces cerevisiae* zu einer Steigerung der Lebenserwartung führt (Fabrizio *et al.* 2003). Auch die konzertierte Steigerung der Cu/Zn-SOD Expression und der Expression der Catalase in *Drosophila melanogaster* führt zu einer Steigerung der Lebenserwartung um 34 % (Orr & Sohal 1994). Diese Steigerung der Lebenserwartung geht einher mit einem Rückgang an Schädigungen durch oxidativen Stress (Sohal *et al.* 1995). Eine alleinige Steigerung der Expression der Catalase (Orr & Sohal 1992) beziehungsweise der Cu/Zn-SOD (Orr & Sohal 1993) keinerlei Effekt auf die Lebenserwartung der Taufliegen hatte und ein Verlust der SOD1 Aktivität zu einem Rückgang der Resistenz gegen oxidativen Stress und der Lebenserwartung führte (Phillips *et al.* 1989). Neuere Studien gehen jedoch davon aus, dass die Erhöhung der Lebensspanne durch eine Steigerung der Cu/Zn-SOD Expression in Verbindung mit der Expression Catalase unter experimentellen Bedingungen nicht aussagekräftig ist (Orr & Sohal 2003), da in *Drosophila melanogaster* Wildtypen keine altersabhängigen Schwankungen der Cu/Zn-SOD Expression vorkommen (Sohal *et al.* 1990) und in verwandten Spezies keinerlei Zusammenhang zwischen Lebenserwartung und Expression der Cu/Zn-SOD festzustellen ist. Die Catalaseaktivität der langlebigen und ROS-resistenteren Gamergaten ist im Vergleich zu derjenigen der Arbeiterinnen signifikant niedriger. Auch die Aktivitätswerte der *Callows* unterscheiden sich stark von denen der Arbeiterinnen und liegen etwa auf dem Niveau der Werte der Gamergaten. Die Werte der Männchen bewegen sich zwischen denen der Gamergaten und der Arbeiterinnen, sind jedoch ebenfalls signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe. Für die niedrigen Werte der *Callows* kommt wie bei der Superoxid-Dismutase eine altersbedingte niedrigere Belastung durch ROS in Frage. Ein ähnliches Phänomen wurde auch bei *Drosophila melanogaster* beschrieben. Bei der Taufliege steigt die Catalase-Aktivität zunächst kontinuierlich an, bevor sie ab der Mitte der Lebensspanne wieder zurückgeht (Sohal *et al.* 1990, Durusoy *et al.* 1995, Arking *et al.* 2000). Die geringen Werte der Gamergaten sind jedoch erstaunlich, denn die Erhöhung eines einzelnen Parameters des ROS-Abwehrsystems, insbesondere der Superoxid-Dismutasen als erste Abwehr gegenüber ROS (Zelko *et al.* 2002), könnte zur intrazellulären Akkumulation von ROS führen und damit negative Auswirkungen haben (Wenk *et al.* 1999). Geht man davon aus, dass nicht die

Erhöhung der Superoxid-Dismutasen *per se*, sondern die Entstehung eines Missverhältnis` von Superoxid-Dismutasen-Aktivität und nachgeschalteter Catalase-Aktivität zur Akkumulation von ROS führt, erscheinen die Werte paradox. Des Weiteren scheint der Rückgang der Catalase-Aktivität im Widerspruch zur Erhöhung der Lebensspanne bei *Drosophila melanogaster* durch eine konzertierte Erhöhung der Expression der Cu/Zn-SOD und Catalase zu stehen (Orr & Sohal, 1994). Die Aussagekraft dieser Studie in Bezug auf den Zusammenhang der Steigerung der ROS-Resistenz und der Lebenserwartung wird jedoch, wie oben bereits erwähnt, bezweifelt (Orr & Sohal 2003).

Allerdings finden sich in der Literatur ausreichend Beispiele, dass Spezies mit einer hohen Lebenserwartung keinesfalls eine besonders hohe Catalase-Aktivität zeigen (Perez-Campo *et al.* 1998, Buffenstein *et al.* 2007). Unter dem Aspekt des Verhältnis SOD/Catalase scheint auch die geringe Catalaseaktivität der Männchen ungewöhnlich.

Um die reaktionen des Antioxidative Abwehrsystems auf eine akute Herausforderung zu untersuchen und so weitere Einblicke Aktivitäten der SODs und der Catalase nach einer Paraquat-Injektion gemessen. Sowohl bei Arbeiterinnen wie auch bei Gamergaten unter starkem oxidativem Stress geht die Superoxid-Dismutase Aktivität zurück. Diese Unterschiede sind bei den Gamergaten signifikant ($p < 0,05$). Anders verhält es sich bei den Aktivitäten der Catalase: Auch hier findet sowohl bei den Arbeiterinnen als auch bei den Gamergaten ein Rückgang der Aktivität nach der Induktion von oxidativem Stress statt. In diesem Fall ist diese Veränderung bei der Gruppe der Arbeiterinnen hoch signifikant ($p < 0,001$). Diese Daten lassen darauf schließen, dass sowohl die Catalase als auch die Superoxid-Dismutasen nicht die wichtigsten Enzyme bei der Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies bei Gamergaten darstellen, da sie unter akutem Stress kaum reguliert beziehungsweise herunter reguliert. Die Überlebensversuche belegen, dass Gamergaten eine signifikant höhere Resistenz gegenüber oxidativem Stress aufweisen als Arbeiterinnen. Gleichzeitig besitzen sie eine signifikant geringere Catalase-Aktivität. Unter oxidativem Stress ist die Aktivität ihrer Catalase relativ stabil, während die Aktivität der Superoxid-Dismutasen, trotz ihrer ausgeprägten Resistenz gegen oxidativen Stress, signifikant abnimmt. Im Vergleich dazu bricht die Catalaseaktivität der Arbeiterinnen unter oxidativem Stress dramatisch ein. Vor allem diese spezifische Änderung der Catalaseaktivität in Arbeiterinnen, im Verbund mit der konstant geringen Aktivität bei Gamergaten, lässt darauf schließen, dass die Catalase bei den Gamergaten eine weniger wichtige Rolle spielt als bei den Arbeiterinnen. Bei Arbeiterinnen anderer eusozialer Hymenopteren findet sich ein anderes Muster: Im Gegensatz zu den SOD-Aktivitäten bei *Harpegnathos saltator* steigt bei Arbeiterinnen der

Hummelart *Bombus ignitus* die Transkriptionsraten der BiSOD1 in den Stunden nach einer Behandlung mit Paraquat signifikant an (Jin *et al.* 2006). Diese Steigerung, wie auch die hohe Sterblichkeit der *Harpegnathos saltator* Arbeiterinnen nach Paraquat-Injektion, mag ein Hinweis auf die Bedeutung der Höhe der Belastung mit reaktiven Sauerstoffspezies sein: Während die Arbeiterinnen von *Bombus ignitus* nach einer Behandlung mit 10µl 10mM Paraquat-Lösung in der Lage sind, ihr BiSOD1 als Antwort auf den akuten Stress zu erhöhen, könnte die Dosis von 41nl 500mM Paraquat-Lösung bei den Arbeiterinnen von *Harpegnathos saltator* bereits einen zu starke Schäden durch oxidativen Stress auslösen und eine Gegenreaktion unmöglich machen. Das könnte wiederum darauf hindeuten, dass bei Gamergaten die klassischen antioxidativen Enzyme SOD und Catalase nur eine untergeordnete Rolle bei der Abwehr von ROS spielen: Da die injizierte Paraquat-Dosis bei Gamergaten einen geringeren Schaden anrichtet als bei Arbeiterinnen, ist nicht auszuschließen, dass sie noch in der Lage wären, ihre SOD-Aktivität in einem vergleichbaren Maß wie *Bombus ignitus* Arbeiterinnen anzupassen, zumal etwa die Hälfte der Gamergaten die zum Zeitpunkt der Aktivitätsmessung noch leben, die Paraquat-Behandlung überlebt hätten. Da diese Steigerung jedoch unterbleibt, muss das gesteigerte Aufkommen an reaktiven Sauerstoffspezies auf anderem Weg als durch Superoxid-Dismutasen bewältigt werden. Die Aktivität der Glutathion-Peroxidasen oder genauer gesagt die von Enzymen mit Glutathion-Peroxidase-Aktivität (siehe Einleitung) unterscheidet sich zwischen den einzelnen Gruppen kaum. Wiederum weisen die langlebigen Gamergaten keine erhöhte Aktivität eines Enzyms des antioxidativen Abwehrsystems auf. Somit liefert auch die Glutathion-Peroxidase-Aktivität keine Erklärung für die gesteigerte Resistenz der Gamergaten gegen oxidativen Stress. Die Glutathion-Peroxidase-Aktivität der *Callows* unterscheidet sich zwar nicht signifikant von der der Kontrollgruppe, weist jedoch eine Tendenz zu einer geringeren Aktivität auf, was wiederum auf ein noch nicht voll ausgeprägtes antioxidatives Abwehrsystem schließen lässt. Der Wert der Glutathion-S-Transferase-Aktivität ist in der Gruppe *Callows* signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Dies ist eventuell wieder darauf zurückzuführen, dass *Callows* in den wenigen Tagen bis Wochen ihres adulten Lebens noch kaum schädlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt waren. Nach dem Konzept der Hormese benötigen die Abwehrsysteme eines Organismus eine entsprechende Herausforderung durch einen Stressor der einen gewissen Grenzwert jedoch nicht überschreiten darf um ihre maximale Leistung auszuschöpfen (Schulz *et al.* 2007). Es ist durchaus möglich, dass *Callows* in ihrem Leben diesem Eustress noch nicht ausgesetzt waren. Die Werte der anderen beiden Gruppen, Männchen und Gamergaten, weichen wiederum nicht signifikant von dem der Kontrollgruppe

ab. Die Glutathion-S-Transferasen kommen also ebenfalls nicht als Vermittler der gesteigerten Resistenz der Gamergaten gegen reaktive Sauerstoffspezies in Frage.

4.1.2.2 Der Glutathionhaushalt der natürlichen Gruppen

Für eine Beurteilung der Aktivitäten von Enzymen, deren Substrat Glutathion ist, ist es unerlässlich, auch den Glutathionhaushalt in die Betrachtung einzubeziehen. Zunächst soll der Gesamtglutathiongehalt der Gruppen diskutiert werden. Im Anschluss daran wird näher auf die Zusammensetzung aus oxidiertem, d.h. verbrauchtem und reduziertem d.h. unverbrauchtem Glutathion eingegangen.

Gamergaten und *Callows* haben einen signifikant geringeren Gehalt an Glutathion als die Kontrollgruppe, während der Gehalt der Männchen dem der Arbeiterinnen gleicht. Wie schon die Aktivität der Catalase so kann wohl auch der Glutathionspiegel keinen Anhaltspunkt für die signifikant höhere Überlebensquote der Gamergaten nach der Behandlung mit Paraquat liefern. Bei den *Callows* bietet sich das gleiche Bild wie bei den zuvor diskutierten Enzymaktivitäten: Der niedrige Glutathionspiegel ist eventuell auf fehlende Stimulationen des antioxidativen Abwehrsystems durch Eustress zurückzuführen.

Oxidiertes Glutathion stellt das Nebenprodukt der Reaktionen der Glutathion-S-Transferasen und der Glutathion-Peroxidasen unter natürlichen Bedingungen dar. Der Gehalt an oxidiertem Glutathion aller Gruppen ist niedriger als der der Kontrollgruppe, wenn auch der Unterschied bei den Gamergaten nicht signifikant ist. Da bei Gamergaten und *Callows* auch der Gesamtgehalt an Glutathion geringer ist als bei den Arbeiterinnen, verwundert es nicht, dass auch der Gehalt an oxidiertem Glutathion geringer ist. Der Gehalt an unverbrauchtem Glutathion, wie auch der Gehalt an Gesamtglutathion und oxidiertem Glutathion ist bei den Gamergaten und den *Callows* signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe der Arbeiterinnen. Lediglich die Männchen zeigen einen, wenn auch nicht signifikant, höheren Spiegel an reduziertem Glutathion.

Das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion ist ein Biomarker für den oxidativen Stress, dem ein Organismus unterliegt (Maher 2005). Auch wenn sich die Spiegel des Gesamtglutathions bei den jungen Arbeiterinnen und Gamergaten von dem Wert der Kontrollgruppe unterscheiden, so weisen die Gruppen doch keine Unterschiede im Verhältnis der von oxidiertem zu reduziertem Glutathion auf. Das sehr hohe GSH/GSSG-Verhältnis der Männchen deutet auf eine geringe Belastung durch oxidativen Stress hin und ist vermutlich auf ihre Lebensweise zurückzuführen: Sie beteiligen sich nicht an den Pflege-, Bau- und Foragier-Aufgaben der Weibchen und können unter Laborbedingung keinen Hochzeitsflug antreten, was vermutlich zu einem geringen Energieumsatz und folglich einer geringen

Belastung durch oxidativen Stress führt.

4.1.3 Vergleich von *Harpegnathos saltator* mit Modelorganismen und anderen eusozialen Hymenopteren

Wie bei Modellorganismen, bei denen eine durch genetische Manipulation erhöhte Lebensspanne mit einer erhöhten Resistenz gegen die Stressoren „Pathogene“ und „reaktive Sauerstoffspezies“ einhergeht, so zeigen auch die reproduktiv aktiven Weibchen von *Harpegnathos saltator*, die der funktionalen Kaste der Gamergaten angehören, diesen Zusammenhang zwischen einer Verlängerung der Lebensspanne und einer erhöhten Resistenz gegen Umweltstressoren. Ein genauerer Blick auf die molekularen Grundlagen der Vermittlung der Resistenz gegen oxidativen Stress zeigt jedoch, dass wesentliche Unterschiede bestehen. Während in vielen Modellorganismen die Erhöhung der Stressresistenz und Lebensdauer mit einer konzertierten Steigerung der Aktivitäten der Catalase und Superoxid-Dismutasen einhergeht, weisen bei *Harpegnathos saltator* die Individuen mit der größten Lebensspanne die geringste Catalaseaktivität auf. In diesem Punkt gleichen sie vielen Spezies, die von Natur aus mit einer hohen MLSP ausgestattet sind. Die natürliche Steigerung der Lebensspanne von *Harpegnathos saltator* scheint also auf anderen Mechanismen zu beruhen, als die durch Manipulation herbeigeführte Steigerung der Lebensdauer von im Wildtyp kurzlebigen Modellorganismen wie *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* und der Maus. Das wird auch von Untersuchungen an der Honigbiene *Apis mellifera* gestützt, bei der sich ein ähnliches Muster findet: Auch hier weisen die langlebigen Königinnen eine gleiche beziehungsweise geringere Aktivität der Enzyme der antioxidativen Abwehrsysteme auf wie die kurzlebigeren Arbeiterinnen (Corona *et al.* 2005).

Eine mögliche Erklärung für die Stressresistenz der Gamergaten liegt in ihrer Lebensweise begründet: Da reaktive Sauerstoffspezies vor allem bei der Energiegewinnung in den Mitochondrien entstehen (Turrens 2003, Genova *et al.* 2004, Jezek & Hlavata 2005) könnte ein verringerter Stoffwechsel letztendlich zu einer geringeren Belastung durch oxidativen Stress führen, was sowohl eine Erklärung für die gesteigerte Lebenserwartung als auch für die in Folge freier Kapazitäten des antioxidativen Abwehrsystems erhöhte Resistenz liefert. Tatsächlich gibt es Hinweise, dass Gamergaten aufgrund ihrer Lebensweise geringeren körperlichen Belastungen ausgesetzt sind: Bei einer anderen Ameisenart, *Diacamma cf. Rugosum*, sind die Gamergaten tatsächlich weniger körperlich aktiv, weshalb gemutmaßt

wurde, dass diese geringere Belastung zu der Erhöhung der Lebensspanne beiträgt (Tsuji *et al.* 1996). Ähnliches könnte auch bei *Harpegnathos saltator* der Fall sein. Des Weiteren ist bekannt, dass eine der physiologischen Veränderungen, die eine weibliche *Harpegnathos saltator* beim Übergang von der Arbeiterin zur Gamergate erfährt, eine Reduktion der Gehirnmasse im Bereich der optischen Loben ist, was zu einer zusätzlichen Reduktion des Energieverbrauchs beiträgt (Gronenberg & Liebig 1999).

4.2 Der Einfluss sozialen Stresses

Obwohl Arbeiterinnen wie gezeigt eine signifikant geringere Überlebenschance nach der Injektion der Paraquat-Lösung zeigen als Gamergaten, kann daraus nicht direkt geschlossen werden, dass die Steigerung der Lebenserwartung nach dem Übergang Gamergate/Arbeiterin tatsächlich mit einer Steigerung der Effizienz der ROS-Abwehrsysteme und des Immunsystems einhergeht. Eine alternative Hypothesen drängt sich hier auf:

Gamergaten besitzen schon in ihrem frühen Lebensabschnitt als Arbeiterin eine höhere Stress-Resistenz und Lebenserwartung als durchschnittliche Arbeiterinnen. Als Gründe dafür kommen z.B. eine ontogenetische Determination oder ein Zeitfenster im adulten Leben in dem die ROS-Abwehrsysteme besonders aktiv sind in Frage. D.h., dass eine ausgeprägte Resistenz gegen Stressoren und eine hohe Lebenserwartung keine Konsequenz des Übergangs vom Leben als Arbeiterin zum Leben als Gamergate darstellen, sondern eine Voraussetzung. Das würde wiederum bedeuten, dass nur ein geringer Prozentsatz der Mitglieder einer Kolonie in der Lage ist, sich zu einer Gamergate zu entwickeln.

Um die Erhöhung der Resistenzen tatsächlich mit der Erhöhung der Lebenserwartung durch den Übergang von der Arbeiterin zur Gamergate zu korrelieren, wurden Arbeiterinnen verschiedenen zusätzlichen Stressoren ausgesetzt und ihrer Überlebensrate unter diesen Umständen überprüft. So müssen Gamergaten an den Dominanzkämpfen teilnehmen, um ihren Status zu erreichen. Falls die erhöhte Resistenz tatsächlich eine Voraussetzung für den Übergang zur Gamergate darstellt, sollte der Anteil der Ameisen, die diese mitbringen unter den kämpfenden Tieren besonders hoch sein. Da der zusätzliche Stress jedoch die Resistenz negativ beeinflussen könnte, wurden zusätzlich die Resistenzen einer Gruppe beliebiger Arbeiterinnen unter Isolationsstress ermittelt.

4.2.1 Aggression als Stressor

4.2.1.1 Individuen, die aktiv in Dominanzkämpfe verwickelt sind, weisen eine geringere Toleranz gegenüber Pathogenen, nicht jedoch gegenüber oxidativen Stress auf.

Während der Phase der Dominanzkämpfe zwischen den Arbeiterinnen einer Kolonie sind die aktiv an den aggressiven Interaktionen beteiligten Individuen signifikant anfälliger für einen tödlichen Verlauf einer Infektion mit *Erwinia carotovora*. Diese erhöhte Anfälligkeit ist jedoch auf Infektionen begrenzt. Die Resistenz der duellierenden Tiere gegen durch Paraquat induzierten oxidativen Stress unterscheidet sich nicht signifikant von der Resistenz normaler Arbeiterinnen. Ein negativer Einfluss von sozialem Stress auf das Immunsystem ist durch zahlreiche Studien belegt (Bosch et al. 2009, Curtin et al 2009).

4.2.1.2 Glutathionspiegel und Enzymaktivitäten unter durch Aggression ausgelösten Stress

Individuen, die aktiv in Dominanzkämpfe verwickelt sind, weisen eine geringere Toleranz gegen Pathogene, nicht jedoch gegen oxidativen Stress auf. Während der Phase der Dominanzkämpfe zwischen den Arbeiterinnen einer Kolonie sind die aktiv an den aggressiven Interaktionen beteiligten Individuen signifikant anfälliger für einen tödlichen Verlauf einer Infektion mit *Erwinia carotovora*. Diese erhöhte Anfälligkeit ist jedoch auf Infektionen begrenzt. Die Resistenz der duellierenden Tiere gegen durch Paraquat induzierten oxidativen Stress unterscheidet sich nicht signifikant von der Resistenz normaler Arbeiterinnen. Der Einfluss von sozialem Stress auf das Immunsystem ist durch zahlreiche Studien belegt. Einen Hinweis darauf, dass die Phase der Dominanzkämpfe tatsächlich einen sozialen Stressor, zumindest auf Ebene der Kolonie, darstellt, bietet die Tatsache, dass die Versorgung des Nachwuchses während dieses Zeitraums zurückgeht (pers. Mitteilung, von Kemmling & Liebig).

Arbeiterinnen, die aktiv an den Dominanzkämpfen nach Zusammenbruch der Koloniehierarchie teilnehmen, weisen gegenüber der Kontrollgruppe kaum Veränderungen in den Aktivitäten der Superoxid-Dismutasen und der Catalase auf. Zwar liegen die Aktivitätswerte bei den aggressiven Tieren leicht unter denen der normalen Arbeiterin, diese Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant.

Der Gehalt an Gesamtglutathion sowie der Gehalt an reduziertem Glutathion unterscheidet sich bei den aggressiven Arbeiterinnen nicht signifikant von der Kontrollgruppe der

Arbeiterinnen. Im Gegensatz dazu liegt der Gehalt an oxidiertem Glutathion signifikant unter dem Wert der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied ist jedoch aufgrund der absoluten Gehalte an reduziertem und oxidiertem Glutathion nicht groß genug, um einen signifikanten Unterschied in dem GSH/GSSG-Verhältnis zwischen Kontrollgruppe und aggressiven Arbeiterinnen auszumachen. Tendenziell weisen aggressive Arbeiterinnen jedoch ein vorteilhafteres Verhältnis von GSH zu GSSG auf. Interessanterweise verhalten sich die Aktivitäten der GSH als Substrat verwendenden Enzyme Glutathion-S-Transferase und Glutathion-Peroxidase reziprok. Während die Aktivität der Glutathion-S-Transferase nach einsetzen der Dominanzkämpfe um fast 41 % zurückging stieg die Glutathion-Peroxidase-Aktivität im gleichen Zeitraum um 109 % an. Es hat also offensichtlich eine Verschiebung in der Nutzung des Glutathionvorrats stattgefunden.

Zusammengefasst zeigt sich also folgendes Bild: Die unter dem sozialen Stress der Dominanzkämpfe stehenden Arbeiterinnen zeigen eine verminderte Resistenz gegen Infektionen nicht jedoch gegen oxidativen Stress. Dieses geht einher mit einer Verminderung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität bei gleichzeitiger Steigerung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität.

Bei der Ameisenart *Pachycondyla obscuricornis*, die eine ähnliche Phase der Dominanzkämpfe zeigt wie *Harpegnathos saltator*, steigt die CO₂-Emission der Kolonie während des Zeitraums an, in dem es zu aggressiven Interaktionen zwischen den Kolonimitgliedern kommt. Das lässt auf einen erhöhten Stoffwechsel der kämpfenden Arbeiterinnen innerhalb der Kolonie (Gobin *et al.* 2003) und damit sehr wahrscheinlich auf eine gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies schließen. Nimmt man an, dass dies auch auf *Harpegnathos saltator* zutrifft, so muss das antioxidative Abwehrsystem der Gruppe der aggressiven Arbeiterinnen ein erhöhtes Aufkommen an reaktiven Sauerstoffspezies abfangen und unschädlich machen. Das wiederum könnte zu einer auf einem Hormesis-Effekt beruhenden Steigerung der Aktivitäten des antioxidativen Abwehrsystems führen, wie es nach künstlich induziertem oxidativen Stress beim Nematoden *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen wurde (Schulz *et al.* 2007). Wie die Messungen zeigen, geschieht dies jedoch nicht über eine Steigerung der Aktivitäten der Superoxid-Dismutasen und Catalase. Die Aktivität der Glutathion-Peroxidase, die ebenfalls zur Entgiftung von ROS beiträgt, steigt jedoch stark an und könnte für die Stabilität der Resistenz gegen den experimentell induzierten oxidativen Stress während der Kampfphase verantwortlich sein. Dieser Zusammenhang könnte auch eine Erklärung für den Rückgang der Glutathion-S-Transferase-Aktivität bieten. Da die Glutathion-Peroxidase für ihre Reaktion Glutathion benötigt und der

Glutathionspiegel, wie die Messungen belegen, kurzfristig nicht angehoben wird, geht die Erhöhung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität unter Umständen zu Lasten der Glutathion-S-Transferase-Aktivität, die ebenfalls Glutathion als Substrat benötigt. Auch wenn der gleichzeitige Rückgang der Aktivität der Glutathion-S-Transferase bei Steigerung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität einen über den begrenzten Glutathion-Vorrat vermittelten direkten Zusammenhang nahe legt, ist dies bislang nicht experimentell bestätigt. Eine verminderte Aktivität der Glutathion-S-Transferase liefert unter Umständen auch einen Hinweis auf die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Pathogenen, welche die kämpfenden Arbeiterinnen auszeichnet: Die pathogene Eigenschaft von *Erwinia carotovora* wird durch den *Erwinia virulence factor* Evf vermittelt. Dabei handelt es sich um ein Protein, das es *Erwinia* erlaubt, an die Phospholipide von Biomembranen zu binden. Die Grundlage dieser Eigenschaft bildet ein konservierter Cystein-Rest an den eine Palmitoyle Säure kovalent gebunden ist. Wird der Cystein-Rest reduziert und so von der Palmitoyle Säure getrennt, verliert das Protein seine Funktion und *Erwinia* damit seine pathogene Eigenschaft (Quevillon-Cheruel *et al.* 2009). Da die Reduktion von Cystein-Resten eine von Glutathion-S-Transferasen vermittelte Reaktion darstellt, könnte der Rückgang an GST-Aktivität zur erhöhten Anfälligkeit der aggressiven Arbeiterinnen gegenüber *Erwinia carotovora* beitragen. Ein solcher Zusammenhang ist bislang jedoch nicht experimentell bestätigt.

4.2.2 Isolation als Stressor

4.2.2.1 Isolierte Arbeiterinnen regulieren ihre Stresstoleranz

Arbeiterinnen, die in sozialer Isolation gehalten werden, zeigen eine dramatische Veränderung in ihren Resistenzen sowohl gegen *Erwinia carotovora* als auch gegen durch paraquat-induzierten Stress. Während Arbeiterinnen, die direkt im Anschluss an die Injektion mit der Paraquat-Lösung beziehungsweise der Bakterien-Suspension von ihren Nestgenossinnen isoliert wurden, sich in ihrer Überlebenskurve nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden, zeigen Tiere, die vor der experimentellen Behandlung bereits 48 Stunden in Isolation verbrachten, Überlebenskurven, die sich nicht signifikant von denen der Gamergaten unterscheiden. Erstaunlicher Weise steigt die Resistenz dieser Gruppe unter dem vermeintlichen Stress sozialer Isolation auf Werte ähnlich denen der Gamergaten an. Arbeiterinnen, die in sozialer Isolation gehalten werden, zeigen eine dramatische Veränderung in ihren Resistenzen sowohl gegen *Erwinia carotovora* wie auch gegen durch Paraquat-induzierten Stress. Während Arbeiterinnen, die direkt im Anschluss an die Injektion mit der Paraquat-Lösung beziehungsweise der Bakterien-Suspension von ihren

Nestgenossinnen isoliert wurden, sich in ihrer Überlebenskurve nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden, zeigen Tiere, die vor der experimentellen Behandlung bereits 48 Stunden in Isolation verbrachten, Überlebenskurven, die sich nicht signifikant von denen der Gamergaten unterscheiden.

4.2.2.2 Die Aktivitäten der Catalase verändern sich bei in Isolation gehaltenen Tieren

Wie bereits dargestellt, gleichen sich die Resistenzen von Arbeiterinnen die isoliert von ihren Nestgenossinnen leben, bereits nach 48 Stunden denen von etablierten, sich reproduzierenden Gamergaten an. Dass die Änderung der Resistenzen einen Prozess darstellt und nicht auf einer zufälligen Auswahl resistenter Tiere für das Experiment beruht unterstreicht die Tatsache, dass Arbeiterinnen, die erst nach ihrer Behandlung mit Paraquat bzw. Pathogenen in Isolation verbracht werden nicht über die gleiche Resistenz gegen diese Stressoren verfügen wie ihre vorisolierten Artgenossen. Um einen möglichst genauen Vergleich zwischen der ROS-Resistenz von vorisolierten Arbeiterinnen, Arbeiterinnen und Gamergaten ziehen zu können, wurden auch die SOD- und Catalaseaktivitäten der vorisolierten Arbeiterinnen gemessen. Der starke Rückgang der Catalaseaktivität 48 Stunden nach Beginn der sozialen Isolierung mag auf den ersten Blick, besonders unter Berücksichtigung der im gleichen Zeitraum stark angestiegenen Resistenz gegen reaktive Sauerstoffspezies, verwundern, deckt sich jedoch mit der Catalaseaktivität der Gamergaten. Die vorisolierten Arbeiterinnen weisen allerdings den höchsten Wert an Superoxid-Dismutase-Aktivität aller gemessenen Kategorien auf, wenn dieser Unterschied statistisch auch nicht signifikant ist. Das ist insofern erstaunlich, da eine alleinige Steigerung der Aktivität der Superoxid-Dismutase zu einer Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies führen kann (Wenk *et al.* 1999). Es ist allerdings durchaus möglich, dass Enzyme mit Glutathion-Peroxidase-Aktivität den Verlust an Catalaseaktivität kompensieren. Hierzu liegen jedoch keine Daten vor.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die den Gamergaten angeglichenen Resistenzen der nach zwei Tagen Isolation behandelten Tiere liegt im Koloniezyklus von *Harpegnathos saltator*: Bei der Rossameise *Camponotus floridanus* verbreitet die Königin ein chemisches Signal, dass ihren Arbeiterinnen ihre Fertilität signalisiert und diese davon abhält, ihre Ovarien zu entwickeln und haploide Eier zu produzieren. Aufgrund der Grösse der Kolonien wird dieses Signal nicht nur direkt von der Königin an die Arbeiterinnen weitergegeben, sondern befindet sich auch auf den von der Königin produzierten Eiern als Medium (Endler *et al.* 2006). Daraus ergibt sich nach dem Tod der Königin eine Karenzzeit, in der das an den Eiern befindliche Königinnsignal die Entwicklung der Arbeiterinnen-Ovarien verhindert. Da

Kolonien von *Harpegnathos saltator* mit wenigen hundert Tieren sehr viel kleiner sind als Kolonien von *Camponotus floridanus*, besteht keine Notwendigkeit ein theoretisches Gamergaten-Signal über die Eier als Medium zu verbreiten. Ein Hinweis darauf liefert die Tatsache, dass unter Laborbedingungen innerhalb weniger Stunden nach Entnahme der Gamergaten aus der Kolonie die Dominanzkämpfe ausbrechen. Die isolierten Tiere werden einerseits durch ihre Isolation vom Gamergaten-Signal abgeschnitten, andererseits werden sie auch nicht durch Dominanzkämpfe in Anspruch genommen. Möglicherweise ist es ihnen deshalb möglich, den Übergang zur Gamergate sehr viel schneller zu initiieren als Tiere die an Dominanzkämpfen teilnehmen und damit auch ihre Resistenz gegen oxidativen Stress und Pathogene zu steigern.

4.3 Alternative Hypothesen zum Zusammenhang zwischen Resistenz und Lebensspanne

Eine höhere Lebenserwartung der reproduktiv aktiven Tiere einer Kolonie ist ein unter Arten die in eusozialen Strukturen leben weit verbreitetes Phänomen, das nicht nur auf Hymenopteren beschränkt ist, sondern auch Isopteren und sogar Säugetiere einschließt (Carey & Judge 2001, Buffenstein *et al.* 2007). Interessanterweise geht diese Verlängerung der Lebensspanne nicht einher mit einem Fitnessverlust. In vielen Modellorganismen, die eine künstliche Verlängerung der Lebensspanne durch Mutationen erfahren haben, wird die zusätzliche Lebenszeit mit einem Verlust an Fitness bezahlt (Jenkins *et al.* 2004, Marden *et al.* 2003, Walker *et al.* 2000). Dieser Verlust an Fitness sollte verhindern, dass sich derartige Veränderungen in natürlichen Populationen durchsetzen (Keller & Jemielity 2006). In Modellorganismen konnten einige Signalwege identifiziert werden, deren Modulation einen veritablen Einfluss auf die Lebensspanne hat. Beispielhaft sei hier der *Insulin/Insulin-like growth factor signaling pathway* (ILS) genannt: Im Nematoden *Caenorhabditis elegans* beeinflusst der ILS Fertilität und Seneszenz antagonistisch (Dillin *et al.* 2002) und auch in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wird durch eine gesteigerte ILS Aktivität eine erhöhte Fertilität mit einer kürzeren adulten Lebensspanne vergolten (Tu & Tartar 2003, Giannakou *et al.* 2004). So reguliert das Juvenilhormon, das bei *Drosophila melanogaster* Teil des ILS ist (Tatar *et al.* 2003), die Expression des Dotter-Vorläuferproteins Vitellogenin und somatische Reparaturmechanismen antagonistisch (Tu & Tartar 2003). Auch bei *Caenorhabditis elegans* führt eine geringere Expressionsrate Vitellogenin codierender Gene zu einer gesteigerten Lebensspanne (Murphy *et al.* 2003). Eine solche negative Korrelation zwischen Fertilität und

Langlebigkeit fehlt allerdings bei eusozialen Insekten (Hartmann & Heinze 2003), auch wenn die grundlegenden Komponenten vorhanden sind, die bei den oben genannten Arten für die Regulation der Reproduktion und der Seneszenz verantwortlich sind: Juvenilhormon spielt eine Rolle bei der alters- und situationsabhängigen Steuerung des Verhaltens bei den Arbeiterinnen der Honigbiene *Apis mellifera* (Amdam & Omholt 2003, Amdam *et al.* 2004) und Vitellogenin wird fortwährend in den langlebigen Königinnen (Engels *et al.* 1975, Fluri *et al.* 1981) sowie in langlebigen Arbeiterinnen (Fluri *et al.* 1982) synthetisiert. Das Fehlen einer negativen Korrelation zwischen Fertilität und Lebensspanne bei eusozialen Insekten hat in letzter Zeit zur Formulierung neuer Theorien geführt, die grundlegende Regelmechanismen der Entwicklung, des Alterns und der Reproduktion im Verlauf der Evolution eusozialer Hymenopteren postulieren (Seehuus *et al.* 2006). Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Expression des Vitellogenins, wie sie in langlebigen Arbeiterinnen und Königinnen der Honigbiene zu beobachten ist, die Tiere vor oxidativem Stress schützt (Seehuus *et al.* 2006). Es bleibt jedoch unklar, ob dieses auf direktem Wege, durch antioxidative Eigenschaften des Proteins selbst erfolgt (Seehuss *et al.* 2006). Bei *Harpegnathos saltator* ist ein Anstieg der Vitellogenin-Expression bei Gamergaten zwar bislang nicht nachgewiesen, ein solcher Anstieg ist jedoch aufgrund der reproduktiven Aktivität der Gamergaten sehr wahrscheinlich. Sollte Vitellogenin also tatsächlich direkt an der Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sein, stellt es einen aussichtsreichen Kandidaten zur Erklärung der gesteigerten Resistenz gegenüber oxidativem Stress der Gamergaten dar.

4.4 Fazit

Die vorliegenden Daten lassen zwei eindeutige Aussagen zu: Zum Einen, dass der Übergang von der normalen Arbeiterin zur Gamergate, der mit einer außerordentlichen Erhöhung der Lebensspanne von über 100 % einhergeht, von einer signifikanten Steigerung der Resistenzen gegen durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelösten oxidativen Stress und gegen eine Infektion mit Pathogenen begleitet wird. In diesem Punkt gleicht die natürliche Steigerung der Lebenserwartung beim Kastenübergang von *Harpegnathos saltator* der durch genetische Manipulation künstlich herbeigeführten wie sie bei den Modellorganismen *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* und der Maus zu finden ist. Aufgrund der ebenfalls erhöhten Resistenzen gegen diese Stressoren, wie sie sich bei Arbeiterinnen findet, die 48 Stunden in sozialer Isolation gehalten wurden, kann ausgeschlossen werden, dass es sich beim Resistenzunterschied zwischen Gamergaten und

Arbeiterinnen um eine Voraussetzung für den Übergang von der kurzlebigen Arbeiterin zur langlebigen Gamergate handelt und nicht um eine Folge dieser Veränderung.

Zum Anderen kann aufgrund der vorliegenden Aktivitätswerte des antioxidativen Abwehrsystems und der Qualität und Quantität des Glutathionspiegels weitgehend ausgeschlossen werden, dass die Steigerung der Resistenz gegen oxidativen Stress beim Übergang von der Arbeiterin zur Gamergate durch die gleichen Mechanismen vermittelt wird wie die Unterschiede in den Resistenzen zwischen kurzlebigen Wildtypen und langlebigen Mutanten bei den oben genannten Modellorganismen. Andererseits finden sich bei Organismen, deren Lebenserwartung natürlicherweise recht hoch ist, wie bei den Gamergaten relativ geringer Aktivitätswerte in den klassischen antioxidativen Abwehrsystemen.

Zusätzlich zu diesen beiden Aussagen kann festgehalten werden, dass die Aktivitätswerte der sehr jungen Arbeiterinnen darauf hindeuten, dass diese über ein noch nicht voll ausgeprägtes antioxidatives Abwehrsystem verfügen. Ausserdem deuten die Überlebenskurven der aggressiven Arbeiterinnen darauf hin, dass die negativen Auswirkungen eines Stressors nicht unspezifisch sind, sondern sehr spezifische negative Konsequenzen haben können, wie aus der gesteigerten Anfälligkeit gegen Pathogeninfektionen nicht jedoch gegen oxidativen Stress ersichtlich wird.

Aufgrund dieser Eigenschaften, der natürlichen Verlängerung der Lebenserwartung in Einklang mit erhöhter Resistenz gegen Stressoren, die nicht über die bekannten molekularen Mechanismen vermittelt werden, stellt *Harpegnathos saltator* ein vielversprechendes Modell für die Erforschung des Alterungsprozess` und den Einfluss von Stressoren auf diesen Prozess dar.

5.a Summary

This work deals with the relation between the resistance towards stressors and the progression of senescence. Even though the process of biological aging is a central aspect in the life of all multicellular organisms, among them man, are its cause to this day not well understood, which is highlighted by the sheer number, more than 300 exist, of scientific theories. One important aspect of the mechanisms of aging seem to be various stress-inducing factors. In the spotlight of attention are, among others, pathogens and especially reactive oxygen species, which cause oxidative stress. In recent years, many studies proofed a relationship between the resistance towards these stressors and the life expectancy of an organism. In genetically easily to manipulate model organisms, mutants were created, which possess a higher life expectancy compared to the wild type. Many of these mutants also feature an improved resistance towards various stressors. What comes to the disadvantage of these models is the fact, that even this increased life expectancy is rather short. Another disadvantage is the fact that these artificial changes might not stand up to natural conditions. Therefore this work tries to establish a new model for the research on the aging process: The ant *Harpegnathos saltator* is able to improve its life expectancy by more than 100% under natural conditions. Using this organism, the relationship of higher stress resistance and increased life expectancy was tested under natural conditions. It has been shown that the individuals with a high life expectancy have a highly increased resistance against the stress caused by pathogens and reactive oxygen species compared to the group of individuals with a low life expectancy from which they originated. By measuring the activities of the antioxidative defense system, it was shown that the increase in resistance to oxidative stress is not mediated via the same mechanisms as in manipulated model organisms: The activities of the Superoxide-dismutases and the Catalase are not elevated in long-living ants as they are in long-living mutants of model organisms. Furthermore it was shown that social stress indeed influences the resistance to pathogens and oxidative stress. But this influence is highly specific and necessarily negative. To conclude, it can be stated that the knowledge that about the process of aging that was acquainted through

5.b Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Zusammenhängen der Resistenz gegen Stressoren und dem Fortschreiten des biologischen Alterungsprozess. Obwohl der Alterungsprozess einen zentralen Themenkomplex im Leben eines jeden mehrzelligen Organismus, darunter nicht zuletzt auch der Mensch, darstellt, sind seine Ursachen bis heute nicht eingehend verstanden, was die schiere Anzahl wissenschaftlicher Theorien zu diesem Thema, es sind über 300, verdeutlicht. Ein wichtiger Aspekt der Mechanismen die dem Alterungsprozess zugrunde liegen scheinen jedoch verschiedenste stressauslösende Faktoren zu sein. Eine herausragende Position unter diesen Stressoren nehmen Pathogene und der durch endogene und exogene reaktive Sauerstoffspezies hervorgerufene oxidative Stress dar. In den letzten Jahren wurde in vielen Studien belegt, dass ein Zusammenhang zwischen der Resistenz gegenüber diesen beiden Stressoren und der Lebenserwartung eines Organismus besteht. Bei etablierten, genetischen Manipulationen zugänglichen Modellorganismen, können Mutanten geschaffen werden, die sich durch eine im Vergleich zu den Wildtypen erhöhte Lebenserwartung auszeichnen. Viele dieser Mutanten weisen zusätzlich zu ihrer gesteigerten Lebenserwartung auch gesteigerte Resistenzen gegen eine Vielzahl von Stressoren auf. Ihnen allen ist jedoch gemein, dass sie kurzlebige Spezies sind und selbst die gesteigerte Lebenserwartung nicht besonders hoch ist. Einen weiteren Nachteil stellt die Tatsache dar, dass die Veränderungen artifiziell hervorgerufen wurden und sich unter Umständen unter natürlichen Bedingungen nicht notwendigerweise als robust erweisen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, einen neuen Organismus für die Altersforschung zu erschliessen. Die Ameisenart *Harpegnathos saltator* verfügt über die Eigenschaft, unter natürlichen Bedingungen ihre Lebensspanne um mehr als 100% gegenüber dem Normalwert steigern zu können. Diese Eigenschaft wurde genutzt um den Zusammenhang zwischen gesteigerten Resistenzen und einer gesteigerten Lebenserwartung in einem natürlichen System zu überprüfen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die langlebigen Individuen gegenüber der Gruppe der kurzlebigen Individuen, aus der sie hervorgegangen waren, eine stark erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress und Pathogenen zeigte. Durch Messungen der Aktivitäten des antioxidativen Abwehrsystems konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass die Resistenz gegen oxidativen Stress nicht auf gleichem Weg vermittelt wird, wie bei den Modellorganismen: Die Aktivitäten der Catalase und der Superoxid-Dismutasen waren bei langlebigen *Harpegnathos saltator* im Gegensatz zu vielen Mutantenlinien nicht erhöht. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass das

Immunsystem und die antioxidative Abwehr auch von psychischem Stress beeinflusst wird. Dieser Einfluss ist jedoch hoch spezifisch und nicht *per se* negativ. Abschliessend kann gesagt werden, dass die vorliegende Arbeit eindeutig zeigt, dass Erkenntnisse zum Alterungsprozess, die an kurzlebigen Modellorganismen gewonnen werden, nicht immer ohne Abstriche auf langlebige natürliche Systeme zu übertragen sind.

6. Literaturverzeichnis

- Abbott, M.H., Murphy, E.A., Bolling, D.R., Abbey, H. (1974): The familial component in longevity– A study of offspring of nonagenarians - II. Preliminary analysis of the completed study. *The Johns Hopkins Medical Journal*, **134**, 1-16
- Cutler, R.G. (1979): Evolution of human longevity: A critical overview. *Mechanisms of Ageing and Development*. **9**, 337-354.
- Adelman, R.C., Britton, G.W. und Rotenberg, S. (1978): Endocrine regulation of gene activity in aging animals of different genotypes. In: Bergsma D, Harrison DE, editors. Genetic effects on aging. New York: Alan R. Liss; Seite 355.
- Ahmad, S. (1992): Biochemical Defence of Pro-oxidant Plant Allelochemicals by Herbivorous Insects. *Biochemical Systematics and Ecology*. **20**, 269-296.
- Amdam, G.V. und Omholt, S.W. (2003): The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*. **223**, 451-464.
- Amdam, G.V., Simoes, Z.L.P., Hagen, A., Norberg, K., Schroder, K., Mikkelsen, O., Kirkwood, T.B.L. und Omholt, S.W. (2004): Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology*. **39**, 767–773.
- Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W., Harley, C.B. (1992): Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89**, 10114-10118.
- Arking, R., Burde, V., Graves, K., Hari, R., Feldman, E., Zeevi, A., Soliman, S., Saraiya, A., Buck, S., Vettriano, J., Sathrasala, K. (2000): Identical longevity phenotypes are characterized by different patterns of gene expression and oxidative damage. *Experimental Gerontology*. **35**, 353-373.
- Arthur, J.R. (2000): The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **57**, 1825-1835.
- Barondeau, D.P., Kassman, C.J., Burns, C.K., Tainer, J.A., und Getzoff, E.D. (2004): Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism. *Biochemistry*. **43**, 8038-8047.
- Bao, Y., Jemth, P., Mannervik, B. und Williamson, G. (1997): Reduction of thymine hydroperoxide by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and glutathione transferases. *FEBS Letters*. **410**, 210-212.
- Basset, A., Khush, R.S., und Braun, A. (2000): The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America.* **97**, 3376-3381.
- Berlett, B.S. und Stadtman, E.R. (1997): Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry.* **272**, 20313-20316.
- Berry, R.J. und Bronson, F.H. (1992): Life history and bioeconomy of the house mouse. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society.* **67**, 519–550.
- Bonawitz, N.D., Rodeheffer, M.S., und Shadel, G.S. (2006): Defective Mitochondrial Gene Expression Results in Reactive Oxygen Species-Mediated Inhibition of Respiration and Reduction of Yeast Life Span. *Molecular and Cellular Biology.* **26**, 4818-4829.
- Bosch, J.A., Fischer, J.E. und Fishcher, J.C. (2009): Psychologically adverse work conditions are associated with CD8+T cell differentiation indicative of immunesenescence. *Brain Behaviour and Immunity.* **23**, 527-534.
- Bourke, A.F.G. (1999): Colony size, social complexity and reproductive conflict in social insects. *Journal of evolutionary Biology.* **12**, 245-257.
- Buffenstein, R., Andziak, B., Cheung, R., et al. (2007): Holes in the oxidative stress theory of aging: ROS resistance and rodents with disparate longevity. *Age.* **29**, 120-120.
- Campisi, J. (2001): Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *TRENDS in Cell Biology.* **11**, 27-31.
- Campisi, J. (2005): Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbours. *Cell.* **120**, 513-522.
- Campisi, J., Dimri, G., und Hara, E. (1996): Control of Replicative Senescence. In: Schneider, E.L. und Rowe, J.W. (Hrsg.): Handbook of The Biology of Aging. 4. Auflage, Academic Press, San Diego, 121-149.
- Carey, J.R. (2001): Demographic mechanisms for the evolution of long life in social insects. *Experimental Gerontology.* **36**, 713-722.
- Carey, J.R. und Judge, D.S. (2001): Longevity records: Life spans of mammals, birds, amphibians, reptiles and fish. Odense University Press, Odense.
- Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Landum, R.W., Cheng, M.S., Wu, J.F. und Floyd, R.A. (1991): Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl- α -phenylnitrone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **88**, 3633-3636.
- Carrard, G., Bulteau, A.L. und Petropoulos, I. (2002) Impairment of proteasome structure and function in aging. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* **34**, 1461-1474.
- Castorina, C., Campisi, A., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Russo, A. und Vanella, A. (1992): Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymatic Systems in Rat Retina as a Function of Age. *Neurochemical Research.* **17**, 599-604.

- Chakravarti B. und Abraham G.N. (1999): Aging and T-cell-mediated immunity. *Mechanisms of Ageing & Development*. **108**, 183–206.
- Choudhury, S.B., Lee, J.W., Davidson, G., Yim, Y.I., Bose, K., Sharma, M.L., Kang, S.O., Cabelli, D.E. und Maroney, M.J. (1999): Examination of the Nickel Site Structure and Reaction Mechanism in *Streptomyces seoulensis* Superoxide Dismutase. *Biochemistry*. **38**, 3744-3752.
- Comhair, S.A.A., und Erzurum, S.C. (2005): The Regulation and Role of Extracellular Glutathione Peroxidase. *Antioxidants & Redox Signaling*. **7**, 72-79.
- Corona, M., Hughes, K.A., Weaver, D.B. und Robinson, G.E. (2005): Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mechanisms of Ageing & Development*. **126**, 1230–1238.
- Cremer, S., Armitage, S.A.O. und Schmid-Hempel, P. (2007): Social immunity, *Current Biology*. **17**, 693-702.
- Culotta, V.C., Tang, M., und O'Halloran, T.V. (2006): Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1763**, 747-758.
- Curtin, N.M., Boyle, N.T., Mills, K.H.G., et al. (2009): Psychological stress suppresses innate IFN-gamma production via glucocorticoid receptor activation: Reversal by the anxiolytic chlordiazepoxide. *Brain Behaviour and Immunity*. **23**, 535-547.
- Cutler, R.G. (1979): Evolution of human longevity: A critical overview. *Mechanisms of Ageing and Development*. **9**, 337-354.
- Cutler, R.G., und Mattson, M.P. (2006): Introduction: The adversities of aging. *Aging Research Reviews*. **5**, 221-238.
- Deisseroth, A., und Dounce, A.L. (1970): Catalase: Physical and Chemical Properties, Mechanism of Catalysis, and Physiological Role. *Physiological Reviews*. **50**, 319-375.
- De Semir, D., Nosrati, M., Li, S. und Kashani-Sabet, M. (2007): Telomerase. *Cell Cycle*. **6**, 546-549.
- De Vale, D., Brummel, T. und Seroude, L. (2004): Immunity and aging: the enemy within? *Aging Cell*. **4**, 195-208.
- Dickinson, D.A., und Forman, H.J. (2002): Glutathione in Defense and Signaling: Lessons from a Small Thiol. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **973**, 488-504.
- Dillin, A., Crawford, D.K. und Kenyon, C. (2002): Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *C-elegans*. *Science*. **298**, 830-834.
- Dobzhansky, T. (1973): Nothing in Biology makes sense, except in the light of evolution. *The American Biology Teacher*. **35**, 125–129.
- Dogu-Abbasoglu, S., Tamer, K., Toptani, S., Ugurnal, B., Kocak-Toker, N., Aykac-Toker, G. und Uysal, M. (1997): Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in livers and brains of aged rats. *Mechanisms of Ageing and Development*. **98**, 177-180.

- Dong, C.K., Masutomi, K., und Hahn, W.C. (2005): Telomerase: regulation, function and transformation. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. **54**, 85-93.
- Dong, Y., Taylor, H.G. und Dimopoulos, G. (2006): AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system, *Public Library of Science Biology*. **4**, 229.
- Dringen, R., und Hamprecht, B. (1996): Glutathione Content as an Indicator for the Presence of Metabolic Pathways of Amino Acids in Astroglial Cultures. *Journal of Neurochemistry*. **67**, 1375-1382.
- Dudas, S.P. und Arking, R., (1995): A coordinate upregulation of antioxidant gene activities is associated with the delayed onset of senescence in a long-lived strain of *Drosophila*. *Journal of Gerontology Series A—Biological Science Medical Science*. **50**, 1117–1127.
- Durusoy, M., Diril, N., und Bozcuk, N. (1995): Age-related activity of catalase in different genotypes of *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*. **30**, 77-86.
- Duttaroy, A., Paul, A., Kundu, M. und Belton, A. (2003): A Sod2 null mutation confers severely reduced adult life span in *Drosophila*. *Genetics*. **165**, 2295–2299.
- Eaton, D.L., und Bammler, T.K. (1999): Concise Review of the Glutathione S-Transferase and their Significance to Toxicology. *Toxicological Sciences*. **49**, 156-164.
- Elchuri, S., Oberley, T.D., Qi, W., Eisenstein, R.S. und Jackson Roberts L. (2005): CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*. **24**, 367–380.
- Endler, A., Liebig, J. und Hölldobler, B. (2006): Queen fertility, egg marking and colony size in the ant *Camponotus floridanus*. *Behavioural Ecology and Sociobiology*. **59**, 490-499.
- Engels, W., Fahrenhorst, H., Drescher, W. et al (1975): Female-specific Proteins in Gynandromorphes of *Apis-Mellifica*. *Wilhelm Rouxs Archives of developmental Biology*. **178**, 79-88.
- Fabrizio, P., Liou, L.L., Moy, V.N., et al. (2003): SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics*. **163**, 35-46.
- Failla, G. (1958): The aging process and carcinogenesis. *Annals of the New York Academy of Science*. **71**, 1124 – 1140.
- Farooqui, M.Y.H., Day, W.W., und Zamorano, D.M. (1987): Glutathione and lipid peroxidation in the aging rat. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **88B**, 177-180.
- Feldhaar, H., und Gross, R. (2008): Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes and Infection*. **10**, 1082-1088.
- Feldser, D.M. und Greider, C.W. (2007): Short Telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell*. **11**, 461-469.
- Felton, G.W., und Summers, C.B. (1995): Antioxidant Systems in Insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. **29**, 187-197.

- Ferrandon, D., Imler, J.L., Hetru, C. und Hoffmann, J.A. (2007): The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signaling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews of Immunology*. **7**, 862-874.
- Finch, C.E. (1990): Introduction: definitions and concepts. In: Finch CE. Longevity, senescence, and the genome. Chicago: University of Chicago Press; 1990.
- Finch, C. E., und Tanzi, R.E. (1997): Genetics of Aging. *Science*, **278**, 407-411.
- Fleming, J.E., Miquel, J., Cottrell, S.F. et al.(1982) : Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome? *Gerontology*. **28**, 44 – 53.
- Flohe, L., Günzler, W.A., und Schock, H.H. (1973): Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Letters*. **32**, 132-134.
- Fluri, P., Sabatini, A.G., Vecchi, M.A. et al. (1981): Blood juvenile-hormon, protein and vitellogenin titers in laying and non-laying queen Honeybees. *Journal of Apicultural Research*. **20**, 221-225.
- Fluri, P., Luscher, H., Wille, H. und Gerig, L.,(1982): Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honeybees. *Journal of Insect Physiology*. **28**, 61–68.
- Fridovich, I. (1978): The Biology of Oxygen Radicals. *Science*, **201**, 875-881.
- Fridovich I. (1989): Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *Journal of Biological Chemistry*. **264**, 7761 – 7764.
- Fridovich, I. (1995): Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. **64**, 97-112.
- Genova, M.L., Pich, M.M., Bernacchia, A., Bianchi, C., Biondi, A., Bovina, C., Falasca, A.I., Formiggini, G., Castelli, G.P. und Lenaz, G. (2004): The Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species in Relation to Aging and Pathology. *Annals of the New York Academy of Science*. **1011**, 86-100.
- Giannakou, M.E., Goss, M., Junger, M.A., et al.(2004): Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science*. **305**, 361-361.
- Giglio, A.M., Hunter, T., Bannister, J.V., Bannister, W.H. und Hunter, G.J. (1994): The copper/zinc superoxide dismutase gene of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry & Molecular Biology International*. **33**, 41–44.
- Gladyshev, V.N., und Hatfield, D.L. (1999): Selenocysteine-Containing Proteins in Mammals. *Journal of Biomedical Science*. **6**, 151-160.
- Gobin, B., Heinze, J., Strätz, M. und Roces, F. (2003): The energetic cost of reproductive conflicts in the ant *Pachycondyla obscuricornis*. *Journal of Insect Physiology*, **49**, 747-752.
- Golden, T.R., Hinerfeld, D.A., und Melov, S. (2002): Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell*. **1**, 117-123.

- Gräff, J., Jemielity, S., Parker, J.D., Parker, K.M. und Keller, L. (2007): Differential gene expression between adult queens and workers in the ant *Lasius niger*. *Molecular Ecology*. **16**, 675-683.
- Greider, C.W. (1990): Telomeres, Telomerase and Senescence. *BioEssays*. **12**, 363-369.
- Gronenberg, W., und Liebig, J. (1999): Smaller Brains and Optic Lobes in Reproductive Workers of the Ant *Harpegnathos*. *Naturwissenschaften*. **86**, 343-345.
- Habig, W.H., und Jakoby, W.B. (1981): Assays for Differentiation of Glutathione S-Transferase. *Methods in Enzymology*. **77**, 398-405.
- Halliwell, B. (1994): Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. *Nutrition Reviews*. **52**, 253-265.
- Halliwell, B., und Gutteridge, J.M.C. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*. **219**, 1-14.
- Halliwell, B., und Gutteridge, J.M.C. (2007): Free Radicals in Biology and Medicine. 4. Auflage, Oxford University Press, Oxford.
- Hamilton, W.D. (1964) The genetical evolution of social behaviour I and II. *Journal of Theoretical Biology*. **7**, 1-16 und 17-52.
- Harley, CB (1991): Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation Research*. **256**, 271 – 282.
- Harman, D. (1956): Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*. **11**, 298-300.
- Harman, D. (1972): The Biologic Clock: The Mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society*. **20**, 145-147.
- Harman, D. (1981): The aging process. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **78**, 7124-7128.
- Harman, D. (1998): Aging: Phenomena and Theories. *Annals of the New York Academy of Science*. **854**, 1-7.
- Hartmann, A und Heinze, J (2003): Lay eggs, live longer: Division of labor and life span in a clonal ant species. *Evolution*. **57**, 2424-2429.
- Hayashi, J.I., Ohta, S., Kikuchi, A., Takemitsu, M., Goto, Y.I. und Nonaka, I. (1991): Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **88**, 106154-10618.
- Hayes, J.D., und Pulford, D.J. (1995): The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprevention and Drug Resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **30**, 445-600.
- Hayflick, L., und Moorhead, P.S. (1965): The serial cultivation of human diploid cell strains.

- Experimental Cell Research*. **25**, 585-621.
- Helms-Cahan, S. und Keller, L. (2003): Complex hybrid origin of genetic caste determination in harvester ants. *Nature*. **424**, 306-9.
- Herrero, A., und Barja, G. (1999): 8-oxo-deoxyguanosine levels in heart and brain mitochondrial and nuclear DNA of two mammals and three birds in relation to their different rates of aging. *Aging*, **11**, 294-300.
- Hölldobler, B., und Wilson, E.O. (1990): *The Ants*. Springer-Verlag, Berlin.
- Hunter, T., Bannister, W.H. und Hunter GJ (1997) Cloning, expression, and characterization of two manganese superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*. **272**, 28652–28659.
- Hurst, R., Bao, Y., Jemth, P., Mannervik, B. und Williamson, G. (1998): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. *Biochemical Journal*. **332**, 97-100.
- Jamieson, D. (1989): Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free Radical Biology & Medicine*. **7**, 87-108.
- Jazwinski, S.M. (1996): Longevity, genes, and aging. *Science*. **273**, 54-59.
- Jemielity, S., Chapuisat, M., Parker, J.D. und Keller, L. (2005): Long live the queen: studying aging in social insects. *Age*. **27**, 241-248.
- Jenkins, N.L., McColl, G., und Lithgow, G.J. (2004). Fitness cost of extended lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Proceeding of the Royal Society. of London. B. Biological Science*. **271**, 2523–2526.
- Jezek, P., und Hlavata, L. (2005): Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **37**, 2478-2503.
- Jin, B.R., Choi, Y.S., Lee, K.S., Yoon, H.J., Kim, I. und Sohn, H.D. (2006): *Bombus ignitus* Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1): cDNA cloning, gene structure, and up-regulation in response to paraquat, temperature stress, or lipopolysaccharide stimulation. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. **144**, 365-371.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L. und Söderhall, K.(2006): Cell-mediated immunity inarthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonozation.*Immunobiology*. **211**, 213-236.
- Johansson, L.H., und Borg, L.A. (1988): A Spectrophotometric Method for Determination of Catalase Activity in Small Tissue Samples. *Analytical Biochemistry*. **174**, 331-336.
- Johnson, F., und Giulivi, C. (2005): Superoxide dismutates and their impact on human health. *Molecular Aspects of Medicine*. **26**, 340-352.
- Johnson, F.B., Sinclair, D.A. und Guarente, L. (1999): Molecular Biology of Aging. *Cell*. **96**.

- 291-302.
- Johnson, N. P. A. S. und Mueller, J. D. (2002): Updating the Accounts: Global Mortality of the 1918-1920 „Spanish“ Influenza Pandemic“. *Bulletin of the History of Medicine*. **76**, 105–115.
- Johnson, T.E, Cypser, J., De Castro, E., De Castro, S., Henderson, S., Murakami, S., Rikke, B., Tedesco, P. und Link, C. (2000): Gerontogenes mediate health and longevity in nematodes through increasing resistance to environmental toxins and stressors. *Experimental Gerontology*. **35**, 687-694.
- Kanost, M.R. (1999) Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Developmental and Comparative Immunology*. **23**, 291–301.
- Keele, B.B., McCord, J.M. und Fridovich, I. (1970): Superoxide Dismutase from Escherichia coli B. *The Journal of Biological Chemistry*. **245**, 6176-6181.
- Keller, L., und Genoud, M. (1997): Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories in ageing. *Nature*. **389**, 958-960.
- Keller, L., und Jemielity, S. (2006): Social insects as a model to study the molecular basis of ageing. *Experimental Gerontology*. **41**, 553-556.
- Kenyon, C. (2001): A Conserved Regulatory System for Aging. *Cell*. **105**, 165-168.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A. und Tabitiang, R. (1993): A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type. *Science*. **366**, 461-464.
- Kirby, K., Hu, J., Hilliker, A.J. und Phillips, J.P.(2002): RNA interference-mediated silencing of Sod2 in Drosophila leads to early adult-onset mortality and elevated endogenous oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*. **99**. 16162–16167.
- Kirkwood, T.B.L. (1977). Evolution of ageing. *Nature*. **270**, 301–304.
- Kirkwood, T.B.L. (2005): Understanding the Odd Science of Aging. *Cell*. **120**, 437-447.
- Kirkwood ,T.B.L. und Rose, M.R. (1991): Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Science*. **332**,15 – 24.
- Kirkwood, T.B.L. und Holliday, R. (1979): The evolution of aging and longevity. *Proceeding of the Royal Society of London. B. Biological Science*. **205**, 531–546.
- Klapper, W., Parwaresch, R., und Krupp, G. (2001): Telomere biology in human aging and aging syndromes. *Mechanisms of Ageing and Development*, **122**, 695-712.
- Knight, J.A. (2000): The biochemistry of aging. *Advances in Clinical Chemistry*, **35**, 1-62.
- Landis, G.N., und Tower, J. (2005): Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Aging and Development*. **126**, 907-908.
- Larsen, P.L. (1993): Aging and resistance to oxidative damage in Caenorhabditis elegans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **90**,

8905-8909.

- Lawrence, R.A., und Burk, R.F. (1976): Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **71**, 952-958.
- Lee, H.C., Lim, M.L.R., Lu, C.Y., Liu, V.W.S., Fahn, H.J., Zhang, C., Nagley, P. und Wei, Y.H. (1999): Concurrent Increase of Oxidative DNA Damage and Lipid Peroxidation Together with Mitochondrial DNA Mutation in Human Lung Tissues during Aging – Smoking Enhances Oxidative Stress on the Aged Tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **362**, 309-316.
- Lemaitre, B. und Hoffmann, J. (2007): The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Reviews of Immunology*. **25**, 697-743.
- Leroi, A.M., Bartke, A., De Benedictis, G., Franceschi, C., Gartner, A., Gonos, E., Feder, M.E., Kivisild, T., Lee, S., Kartal-Özer, N., Schumacher, M., Sikora, E., Slagboom, E., Tatar, M., Yashin, A.I., Vijg, J. und Zwaan B. (2005). What evidence is there for the existence of individual genes with antagonistic pleiotropic effects? *Mechanisms of Aging and Development*. **126**, 421-429.
- Liebig, J. (1998): Eusociality, female caste specialization, and regulation of reproduction in the ponerine ant *Harpegnathos saltator* Jerdon. Wissenschaft und Technik Verlag, Berlin
- Liebig, J. und Poethke, H.J. (2004): Queen lifespan and colony longevity in the ant *Harpegnathos saltator*. *Ecological Entomology*. **29**, 203-207.
- Lin, Y.J., Seroude, L. und Benzer, S. (1998): Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant *methuselah*. *Science*. **282**, 943-946.
- Linnane, A.W., Zhang, C., Baumer, A. und Nagley, P. (1992): Mitochondrial DNA mutation and the ageing process: bioenergy and pharmacological intervention. *Mutation Research*. **275**, 195 – 208.
- Lindsey, J., McGill, N.I., Lindsey, L.A., et al. (1991) In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutation Research*. **256**, 45– 48.
- Longo, V.D., Gralla, E.B. und Valentine, J.S. (1996): Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. **271**, 12275–12280.
- Longo, V.D., Liou, L.L., Valentine, J.S. und Gralla, E.B. (1999) Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **365**, 131–142.
- Lowe, S.W., Cepero, E., und Evan, G. (2004): Intrinsic tumor suppression. *Nature*. **432**, 307-315.
- Maher, P. (2005): The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Research Reviews*. **4**, 288-314.
- Mandavilli, B.S., Santos, J.H., und Van Houten, B. (2002): Mitochondrial DNA repair and

- aging. *Mutation Research*. **509**, 127-151.
- Marden, J.H., Rogina, B., Montooth, K.L. und Helfand, S.L. (2003): Conditional tradeoffs between aging and organismal performance of indy long-lived mutant flies. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. **100**, 3369–3373.
- Marklund, S., und Marklund, G. (1974): Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*. **47**, 469-474.
- Martin, G.M., Sprague, C.A., und Epstein CJ.(1970): Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Laboratory Investigation*. **23**, 86 – 92.
- McCord, J.M., und Fridovich, I. (1969): Superoxide Dismutase: An enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*. **244**, 6049-6055.
- McGlauchlen, K.S. und Vogel, L.A. (2003): Ineffective humoral immunity in the elderly. *Microbes and Infection*. **5**, 1279–1284.
- Medvedev, Z.A. (1990): An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biological Reviews*. **65**, 375-398.
- Meister, A., und Anderson, M.E. (1983): Glutathione. *Annual Reviews of Biochemistry*. **52**, 711-760.
- Miller, R.A. (1996): Aging and the immune response. In *Handbook of the Biology of Aging* (Schneider E.L., Rowe J.W., eds). San Diego: Academic Press, 355–392.
- Miller, R.A. (2000): Effect of aging on T lymphocyte activation. *Vaccine*. **18**, 1654–1660.
- Miller, R.A. (2001): Biomarkers of aging: prediction of longevity by using age-sensitive T-cell subset determinations in a middle-aged, genetically heterogeneous mouse population. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*. **56**, 180–186.
- Miquel, J. (1991): An integrated theory of aging as the result of mitochondrial-DNA mutation in different cells. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. **12**, 99-117.
- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J., Johnson, J.E. (1981): Mitochondrial role in cell aging. *Experimental Gerontology*. **15**, 575-591.
- Murphy, C.T., McCarroll, S.A., Bargmann, C.I., et al. (2003): Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **424**, 277-284.
- Orgel, L.E. (1963) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. **49**, 517 – 521.
- Orr, W.C., und Sohal, R.S. (1992): Effects of Catalase Gene Overexpression on Life Span and Resistance to Oxidative Stress in Transgenic *Drosophila melanogaster*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **297**, 35-41.
- Orr, W.C., und Sohal, R.S. (1993): Effects of Cu-Zn Superoxide Dismutase Overexpression on Life Span and Resistance to Oxidative Stress in Transgenic *Drosophila melanogaster*.

- Archives of Biochemistry and Biophysics*. **301**, 34-40.
- Orr, W.C., und Sohal, R.S. (1994): Extension of Life-Span by Overexpression of Superoxide Dismutase and Catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*. **263**, 1128-1130.
- Orr, W.C., und Sohal, R.S. (2003): Does overexpression of Cu,Zn-SOD extend life span in *Drosophila melanogaster*? *Experimental Gerontology*. **38**, 227-230.
- Packer, L., Weber, S.U., und Rimbach, G. (2001): Molecular Aspects of γ -Tocotrienol Antioxidant Action and Cell Signaling. *Journal of Nutrition*. **131**, 369-373.
- Palinek, B., Brahamsha, B., Larmier, F.W., Land, M., Hauser, L., Chain, P., Lamerdin, J., Regala, W., Allen, E.E., McCarren, J., Paulsen, I., Dufresne, A., Partensky, F., Webb, E.A. und Waterbury, J. (2003): The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature*. **424**, 1037-1042.
- Pansarara, O., Bertorelli, L., Vecchiet, J., Felzani, G. und Marzatico, F., (1999): Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radical Biology & Medicine*. **27**, 617-622.
- Parker, J.D., Parker, K.M., Sohal, B.H., Sohal, R.S. und Keller, L. (2004): Decreased expression of Cu-Zn superoxide dismutase 1 in ants with extreme lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**, 3486-3489.
- Parkes, T.L., Hilliker, A.J. und Phillips, J.P. (1999): Motorneurons, reactive oxygen, and lifespan in *Drosophila*. *Neurobiology of Aging*. **20**, 531-535.
- Passos, J.F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., Wappler, I., Birket, M.J., Harold, G., Schaeble, K., Birch-Machin, M.A., Kirkwood, T.B. und Von Zglinicki, T. (2007): Mitochondrial Dysfunction Accounts for the Stochastic Heterogeneity in Telomere-Dependent Senescence. *PLoS Biology*. **5**, 1138-1151.
- Peeters, C. (1991): The occurrence of sexual reproduction among ant workers. *Biological Journal of the Linnean Society*. **44**, 141-152.
- Peeters, C., und Hölldobler, B. (1995): Reproductive cooperation between queens and their mated workers: The complex life history of an ant with a valuable nest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**, 10977-10979.
- Peeters, C., Liebig, J., und Hölldobler, B. (2000): Sexual reproduction by both queens and workers in the ponerine ant *Harpegnathos saltator*. *Insectes sociaux*, **47**, 325-332.
- Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M., Cadenas, S., Rojas, C. und Barja, G. (1998): The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *Journal of Comparative Physiology B*. **168**, 149-158.
- Perls, T., Kunkel, L.M. und Puca, A.A. (2002): The genetics of exceptional human longevity. *Journal of Molecular Neuroscience*. **19**, 233-238.
- Perls, T., und Terry, D. (2003): Genetics of exceptional longevity. *Experimental Gerontology*. **38**, 725-730.

- Pham, L.N., Dionne, M.S. Shirasu-Hiza, M. und Schneider, D.S. (2007): A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathogens*. **3**, 26.
- Phelan, J.P., und Austad, S.N. (1989). Natural selection, dietary restriction and extended longevity. *Growth Development & Aging*. **53**, 4–6.
- Phillips, J.P., Campbell, S.D., Michaud, D., Charbonneau, M. und Hilliker, A.J. (1989): Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **86**, 2761–2765.
- Pignolo, R.J., Masoro, E.J., Nichols, W.W., Bradt, C.I. und Cristofalo, V.J. (1992): Skin Fibroblasts from Aged Fisher 344 Rats Undergo Similar Changes in Replicative Life Span but Not Immortalization with Caloric Restriction of Donors. *Experimental Cell Research*. **201**, 16-22.
- Pletcher, S.D., Macdonald, S.J., Marguerie, R., Certa, U., Stearns, S.C., Goldstein, D.B. und Partridge, L. (2002) Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*. **12**, 712–723.
- Quevillon-Cheruel, S., Leulliot, N. und Acosta, C. (2009): Evf, a Virulence Factor Produced by the *Drosophila* Pathogen *Erwinia carotovora*, Is an S-Palmitoylated Protein with a New Fold That Binds to Lipid Vesicles. *Journal of Biological Chemistry*. **284**, 3552-3562.
- Reznick, D.N., Bryant, M.J., Roff, D., Ghalambor, C.K., und Ghalambor, D.E. (2004): Effect of extrinsic mortality on the evolution of senescence in guppies. *Nature*. **431**, 1095–1099.
- Ricklefs, R.E. (1998): Evolutionary theories of aging: confirmation of a fundamental prediction, with implications for the genetic basis and evolution of life span. *American Naturalist*. **152**, 24–44.
- Robine, J.M. und Allard, J (1998): The oldest human. *Science*, **279**, 1834-1835.
- Rose, M.R. und Graves, J.L. (1989): What evolutionary biology can do for gerontology. *Journal of Gerontology*. **44**, 27 –29.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C. und Vousden, K.H. (2001): Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current Opinions in Cell Biology*. **13**, 332 – 337.
- Sager, R. (1991): Senescence As a Mode of Tumor Suppression. *Environmental Health Perspectives*. **93**, 59-62.
- Schneider, E.L. und Rowe, J.W., editors (1996): Handbook of the biology of aging. San Diego (CA): Academic Press.
- Schneider, S. (2005): Status- and Behaviour-dependent changes in the gene expression patterns of the ant *Harpegnathos saltor*. Diplomarbeit. Universität Würzburg.
- Schulz, T.J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M., und Ristow, M. (2007): Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metabolism*. **6**, 280-293.

- Seehuus, S., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T. und Amdam, G.V. (2006): Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**, 962-967.
- Sen, C.K. und Packer, L. (1996): Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB Journal*. **10**, 709 – 720.
- Shaw, F.H., Promislow, D.E.L., Tatar, M., Hughes, K.A., and Geyes, C.J. (1999): Toward reconciling inferences concerning genetic variation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **152**, 553–566.
- Shay, J.W., und Wright, W.E. (2005): Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*. **26**, 867-874.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A. (2001): Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*. **360**, 1-16.
- Shay, J.W. und Wright, W.E. (2007) Tissue culture as a hostile environment: Identifying conditions for breast cancer progression studies. *Cancer Cell*. **12**, 100-101.
- Shock, N.W. (1985) Longitudinal studies of aging in humans. In: Finch C.E., Schneider E.L., editors. *Handbook of the biology of aging*. New York: Van Nostrand Reinhold; 721.
- Schoenmaker, M., de Craen, A.J.M., de Meijer, P.H.E.M., Beekman, M., Blauw, G.J., Slagboom, P.E. und Westendorp, R.G.J. (2006): Evidence of genetic enrichment for exceptional survival using a family approach: the Leiden Longevity Study. *European Journal of Human Genetics*. **14**, 79-84.
- Shringarpure, R., Grune, T., Davies, K.J.A. (2001): Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. *Cellular and molecular Life*. **58**, 1442-1450.
- Sies, H. (1997): Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, **82**, 291-295.
- Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A. und Markesbery, W.R. (1991): Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 10540-10543.
- Starke-Reed, P.E., und Oliver, C.N. (1989): Protein Oxidation and Proteolysis during Aging and Oxidative Stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **275**, 559-567.
- Stuart, L.M., Boulais, J., Charriere, G.M., Hennessy, E.J., Brunet, S., Jutras, I., Goyette, G., Rondeau, C., Letarte, S., Huang, H., Ye, P., Morales, F., Kocks, C., Bader, J.S., Desjardins, M. und Ezekowitz, R.A. (2007): A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome. *Nature*. **445**, 95-101.
- Stuart, L.M. und Ezekowitz, R.A. (2008): Phagocytosis and comparative innate immunity:

- learning on the fly, *Nature Reviews Immunology*. **8**, 131-141.
- Sohal, R.S., Arnold, L., und Orr, W. (1990): Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺ in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development*. **56**, 223-235.
- Sohal, R.S., Ku, H.H., Agarwal, S., Forster, M.J. und Lal, H. (1994): Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mechanisms of Ageing and Development*. **74**, 121-133.
- Sohal, R.S., Svensson, I., Sohal, B.H. und Brunk U.T. (1989): Superoxide anion radical production in different animal species. *Mechanisms of Ageing and Development*. **49**, 129 – 135.
- Sohal, R.S., Agarwal, A., Agarwal, S, et al. (1995): Simultaneous overexpression of Copper-containing and Zink-Containing Superoxide-dismutase and Catalase Retards Age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*. **270**, 15671-15674.
- Sohal, R.S., Arnold, L. und Orr, W.C. (1990): Effect of age on Superoxide-dismutase, Catalase, Glutathione-reductase, TBA-reactive material, GSH GSSG, NADPH NADP⁺ and NADH NAD⁺ in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of aging & Development*. **56**, 223-235.
- Sohal, R.S., und Sohal, B.H. (1991): Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*. **57**, 187-202.
- Sohal, R.S. und Weindruch, R. (1996): Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. **273**, 59 – 63.
- Soti, C., und Csermely, P. (2003) Inhibition of Hsp90 as a special way to inhibit protein kinases. *Cellular & Molecular Biology Letters*. **8**, 514-515.
- Statistisches Bundesamt (2004). Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt und nach Geschlecht 2004. Wiesbaden
- Statistisches Bundesamt (2006): 11. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung – Annahmen und Ergebnisse. Wiesbaden.
- Suzuki, Y.J., Forman, H.J. und Sevanian, A. (1997): Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine*. **22**, 269 – 285.
- Susuki, H., Kumagai, T., Goto, A. und Sugiura, T. (1998): Increase in Intracellular Hydrogen Peroxide and Upregulation of a Nuclear Respiratory Gene Evoked by Impairment of Mitochondrial Electron Transfer in Human Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **249**, 542-545
- Szakal, A.K., Aydar, Y., Balogh, P. und Tew, J.G. (2002): Molecular interactions of FDCs with B-cells in aging. *Seminars in Immunology*. **14**, 267–274.

- Szilard L. (1959): On the nature of the aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **45**, 30 – 45.
- Tatar, M., Kopelman, A., Tu, M.P., Yin, C.M., Garofalo, R.S (2001): A Mutant *Drosophila* Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function. *Science*. **292**, 107-110.
- Tatar, M., Bartke, A. und Antebi, A. (2003): The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science*. **229**, 1346-1351.
- Tietze, F. (1969): Enzymic Method for Quantificative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. *Analytical Biochemistry*. **27**, 502-522.
- Tower, J. (1996): Aging mechanisms in fruit flies. *Bioessays*. **10**, 799-807.
- Tower, J. (2000): Transgenic methods for increasing *Drosophila* lifespan. *Mechanisms of Aging and Development*. **118**, 1-14.
- Troen, B.R. (2003): The Biology of Aging. *The Mount Sinai Journal of Medicine*. **70**, 3-22.
- Tsuji, K., Nakata, K., und Heinze, J. (1996): Lifespan and Reproduction in a Queenless Ant. *Naturwissenschaften*. **83**, 577-578.
- Tu, M. P. und Tatar, M. (2003) : Juvenile diet restriction and the aging and reproduction of adult *Drosophila melanogaster* *Aging Cell*. **2**, 327–333.
- Turker, M.S. und Martin, G.M (1999): Genetics of human disease, longevity and aging. In: Hazzard, W.R., Blass, J.P., Ettinger, W.H. und Halter, J.B. editors. Principles of geriatric medicine and gerontology. 4th ed. London: McGraw-Hill; 21 – 44.
- Turrens, J.F. (2003): Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. **552**, 335-344.
- Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., et al.(2002): p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. **415**, 45-53.
- Unlu, E.S. und Koc, A. (2007): Effects of deleting mitochondrial antioxidant genes on life span. *Annals of the New York Academy of Science*. **1100**, 505–509.
- Uysal, M., Seckin, S., Kocak-Toker, N. und Öz, H. (1989): Increased hepatic lipid peroxidation in aged mice. *Mechanisms of Ageing and Development*. **48**, 85-89.
- Vallyathan, V., und Shi, X. (1997): The Role of Oxygen Free Radicals in Occupational and Environmental Lung Diseases. *Environmental Health Perspectives*. **105**, 165-177.
- Vanfleteren, J.R. (1993): Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. *The Biochemical Journal*. **292**, 605-608.
- Vanfleteren, J.R., und De Vreese, A. (1995): The gerontogenes age-1 and daf-2 determine metabolic rate potential in aging *Caenorhabditis elegans*. *The FASEB Journal*. **9**, 1355-1361.
- Van Raamsdonk, J.M., und Hekimi, S. (2009): Deletion of the mitochondrial Superoxide

- Dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Public Library of Sciences Genetics*. **5**, 1-13.
- Vina, J., Borrás, C., und Miquel, J. (2007): Theories of Aging. *IUBMB Life*. **4-5**, 249-254.
- Walford RL. (1974): Immunologic theory of aging: current status. *Fed Proc*. **33**, 2020 – 2027.
- Walker, D.W., McColl, G., Jenkins, N.L., Harris, J. und Lithgow, G.J., (2000): Evolution of lifespan in *C. elegans*. *Nature*. **405**, 296–297.
- Wallace, D.C. (1992): Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science*. **256**, 628 – 632.
- Wawryn, J., Krzepilko, A., Myszka, A. und Bilinski, T. (1999): Deficiency in superoxide dismutases shortens life span of yeast cells. *Acta Biochimica Polonica*. **46**, 249–253.
- Wei, Y.H., Kao, S.H., und Lee, H.C. (1996): Simultaneous Increase of Mitochondrial DNA Deletions and Lipid Peroxidation in Human Aging. *Annals of the New York Academy of Science*. **786**, 24-43.
- Wei, Y.H., Lu, C.Y., Wei, C.Y., Ma, Y.S., Lee, H.C. (2001): Oxidative Stress in Human Aging and Mitochondrial Disease – Consequences of Defective Mitochondrial Respiration and Impaired Antioxidant Enzyme System. *Chinese Journal of Physiology*. **44**, 1-11.
- Weksler, M.E. (2000) Changes in the B-cell repertoire with age. *Vaccine*. **18**, 1624–1628.
- Wenk, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Poswig, A., Briviba, K., Oberley, T.D. und Scharffetter-Kochanek, K. (1999): Stable Overexpression of Manganese Superoxide Dismutase in Mitochondria Identifies Hydrogen Peroxide as a Major Oxidant in the AP-1-mediated Induction of Matrix-degrading Metalloprotease-1. *The Journal of Biological Chemistry*. **274**, 25869-25876.
- Wheeler, D.E. (1986): Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: Evolutionary implications. *The American Naturalist*. **128**, 13-34.
- Williams, M.J. (2007): *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *Journal of Immunology*. **178**, 4711-4716.
- Wilson, E.O. (1971): *The Insect Societies*. The Belknap Press, Cambridge Massachusetts.
- Wilson, E.O. (1977): *Sociobiology: the new Synthesis*. Harvard University Press, Cambridge Massachusetts.
- Wilson, E.O. und Hölldobler, B (2005): Eusociality: Origin and consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**, 13367-13371.
- Wintjens, R., Noel, C., May, A.C.W., Gerbod, D., Dufernez, F., Capron, M., Viscogliosi, E. und Rooman, M. (2004): Specificity and Phenetic Relationships of Iron- and Manganese-containing Superoxide Dismutases on the Basis of Structure and Sequence Comparisons. *The Journal of Biological Chemistry*. **279**, 9248-9254.
- Wood, W. und Jacinto, A. (2007): *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **8**, 542-551.

- Wozniak, A., Drewa, G., Wozniak, B. und Schachtschnabel, D.O. (2004): Activity of antioxidant enzymes and concentration of lipid peroxidation products in selected tissues of mice of different ages, both healthy and melanoma-bearing. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*. **37**, 184-189.
- Wuerges, J., Lee, J.W., Yim, Y.I., Yim, H.S., Kang, S.O., Carugo, K.D. (2004): Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**, 8569-8574.
- Yen, T.C., Chen, Y.S., King, K.L., Yeh, S.H., Wei, Y.H. (1989): Liver Mitochondrial Respiratory Functions Decline with Age. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. **165**, 994-1003.
- Yen, T.C., King, K.L., Lee, H.C., Yeh, S.H., Wei, Y.H. (1994): Age-dependent increase of mitochondrial DNA deletions together with lipid peroxides and superoxide dismutase in human liver mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine*. **16**, 207-214.
- Yost, F.J., und Fridovich, I. (1973): An Iron-containing Superoxide Dismutase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, **218**. 4905-4908.
- Youn, H.D., Kim, E.J., Roe, J.H., Hah, Y.C. und Kang, S.O. (1996a): A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* ssp. *Biochemical Journal*. **318**, 889-896.
- Yu, B.P., und Yang, R. (1996): Critical Evaluation of the Free Radical Theory of Aging-A Proposal for the Oxidative Stress Hypothesis. *Annals of the New York Academy of Science*. **786**, 1-11.
- Zamocky, M., und Koller, F. (1999): Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. **72**, 19-66.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J., und Folz, R.J. (2002): Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine*. **33**, 337-349.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Kiel, den 26. Mai 2009

Sebastian Schneider

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Roeder für die Überlassung des Themas, die kontinuierliche wissenschaftliche Unterstützung und persönliche Betreuung.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Zoophysiologie für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Jürgen Liebig danke ich für die Überlassung der Versuchstiere und die wertvollen Diskussionen.

Bei Prof. Dr. Gerald Rimbach und Charlotte Schrader bedanke ich mich für die Unterstützung bei den Aktivitätsmessungen und der Proteinbestimmung.

Gabi König, Britta Laubenstein, Christine Fink und Micha Reimer danke ich für die Unterstützung bei der Versorgung der Ameisenkolonien.

Dr. Heike Feldhaar und Dr. Marko Rohlf's danke ich für zahlreiche hilfreiche Diskussionen.

Mein Besonderer Dank gilt meinen Eltern und Dr. Jürgen Besgen für ihre fortwährende Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Sebastian Andreas Schneider

Geburtsdatum: 22. Februar 1980

Geburtsort: Werneck

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Doktorarbeit: 3/2006 - 7/2008 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,
Institut für Zoologie, Zoophysiologie,
bei Prof. Dr. Thomas Roeder

Diplomarbeit: 1/2005 - 11/2005 Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Lehrstuhl für Soziobiologie und
Verhaltensphysiologie,
bei Prof. Dr. Wolfgang Rössler

Hochschulausbildung: 10/2000 - 12/2002 Studium der Biologie an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1/2003- 7/2003 Studium der Biologie an der Universität
Umeå, Schweden
8/2003 - 11/2005 Studium der Biologie mit Abschluss
Diplom an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg

Zivildienst: 8/1999 - 6/2000 Blindeninstitutsstiftung Würzburg

Schulbildung: 1999 Allgemeine Hochschulreife
1990 – 1999 Alexander-von-Humboldt Gymnasium,
Schweinfurt
1986-1990 Hugo-von-Trimberg Grundschule,
Niederwerrn