

Professur für Molekulare Ernährungsforschung



**Die Bedeutung Östrogen-responsiver Vitellogenine für die angeborene
Immunität des Nematoden *Caenorhabditis elegans* und ihre Beeinflussung
durch Phytoöstrogene**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich Biologie und Chemie

vorgelegt von

M. Sc. Malaika Fischer

Gießen September 2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Uwe Wenzel

Professur für Molekulare Ernährungsforschung
Institut für Ernährungswissenschaften der Justus-Liebig-Universität Giessen
Interdisziplinäres Forschungszentrum
Heinrich-Buff-Ring 26-32
35392 Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Wilke

Professur für Spezielle Zoologie und Biodiversitätsforschung
Institut für Tierökologie und spezielle Zoologie der Justus-Liebig-Universität
Giessen
Interdisziplinäres Forschungszentrum
Heinrich-Buff-Ring 26-32
35392 Gießen

Disputation am 22. November 2011

Für meine Eltern und Peter!



INHALT

Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	xii
Abkürzungsverzeichnis.....	xvi
1 Einleitung	1
1.1 Der Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>	1
1.1.1 Klassifizierung und Anatomie von <i>C. elegans</i>	1
1.1.2 Lebenszyklus von <i>C. elegans</i>	4
1.1.3 <i>C. elegans</i> als Modellorganismus.....	5
1.2 Das Immunsystem von <i>C. elegans</i>	7
1.2.1 Immunologische Stressantwort in <i>C. elegans</i>	8
1.2.2 <i>P. luminescens</i> als Modellpathogen für <i>C. elegans</i>	15
1.3 Matrixmetalloproteasen.....	16
1.3.1 Struktur der Matrixmetalloproteasen	17
1.3.2 Wirkmechanismen und Regulierung der Matrixmetalloproteasen.....	18
1.3.3 Matrixmetalloproteasen (ZMPs) in <i>C. elegans</i>	19
1.4 Vitellogenine.....	20
1.4.1 Vitellogenine verschiedener Modellorganismen.....	20
1.4.2 Funktionelle Bedeutung der Vitellogenine	22
1.4.3 Vitellogenine in <i>C. elegans</i>	24
1.4.4 Funktionelle Bedeutung der Vitellogenine im Intestinum von <i>C. elegans</i> ..	28
1.4.5 Hormonelle Regulation der Vitellogenin-Expression in <i>C. elegans</i>	33
2 Zielsetzung.....	37
3 Material und Methoden.....	38
3.1 Kultivierung von <i>C. elegans</i>	38
3.1.1 Herstellung von NGM-Agar-Platten.....	38
3.1.2 Herstellen der <i>E. coli</i> OP50 Kultur.....	39

3.1.3	Bakterienglycerolkulturen	39
3.1.4	„Egg-Präparation“ zur Synchronisierung von <i>C. elegans</i>	39
3.1.5	Aufzucht synchronisierter Larven in NGM-Flüssigmedium	40
3.1.6	Einfrieren von <i>C. elegans</i>	40
3.1.7	Inkubation mit <i>P. luminescens</i> und Effektoren	41
3.2	RNA-Interferenz (RNAi) in <i>C. elegans</i>	41
3.3	Ermittlung der Lebensspanne unter Hitzestress	43
3.4	Fluorometrische Detektion der H ₂ O ₂ -Produktion mittels Amplex UltraRed	45
3.5	Fluoreszenzmikroskopische Analysen von <i>C. elegans</i>	45
3.5.1	Semiquantitative Analyse der subzellulären DAF-16:: <i>GFP</i> -Lokalisation	46
3.5.2	Quantifizierung der Cholesterolaufnahme mittels Fluoreszenzmikroskopie	46
3.5.3	Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie	47
3.5.4	Epifluoreszenzmikroskopie zur Quantifizierung mitochondrialer ROS- Bildung	47
3.5.5	Graphische Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie	47
3.6	Molekularbiologische Methoden	48
3.6.1	Herstellung der <i>vit</i> -RNAi-Klone	48
3.6.2	Nachweise der Funktionalität der <i>vit</i> -RNAi-Konstrukte	57
3.6.3	Quantifizierung der <i>vit-2</i> - und <i>vit-6</i> -Expression mittels quantitativer <i>Real-Time</i> PCR (qRT-PCR)	60
3.6.4	Herstellung des transgenen Stammes <i>zmp-2(2.1)p::<i>gfp</i></i>	62
3.7	Biochemische Methoden	67
3.7.1	Western Blot	67
3.7.2	Messung der oxidativen Protein-Modifikationen mittels OxyBlot	72
4	Ergebnisse	74
4.1	Einflüsse des Gram-negativen Bakteriums <i>P. luminescens</i> auf Resistenzmechanismen in <i>C. elegans</i>	75
4.1.1	Die Applikation von <i>P. luminescens</i> verkürzt die Lebensspanne in <i>C. elegans</i> unter Hitzestress-Bedingungen	75
4.1.2	<i>P. luminescens</i> akkumuliert intestinal in <i>C. elegans</i>	76

4.1.3	Einfluss der Vitellogenine auf die Resistenz gegenüber <i>P. luminescens</i>	77
4.1.4	Potentiell beteiligte Signalwege von <i>C. elegans</i> in der Immunabwehr gegenüber <i>P. luminescens</i>	78
4.1.5	Einfluss des Steroid-Signalwegs auf die durch <i>P. luminescens</i> induzierte Lebenszeitverkürzung	79
4.1.6	Der immunologische Einfluss der Vitellogenine wird über den Steroid-Signalweg (DAF-9, -12) unter Beteiligung von DAF-16 vermittelt	80
4.1.7	Cytosolische DAF-16-Lokalisation als potentieller Mechanismus der Vitellogenin-vermittelten immunologischen Resistenz gegenüber <i>P. luminescens</i>	81
4.1.8	Oxidativer Stress als Ursache für die Lebensspanne-Verkürzung nach <i>P. luminescens</i> -Exposition	84
4.1.9	<i>P. luminescens</i> erhöht die <i>vit-6</i> -mRNA-Spiegel	87
4.1.10	Beeinflussung des Steroid-Signalwegs durch Applikation unterschiedlicher Cholesterol-Konzentrationen	88
4.1.11	Der Vitellogenin-Rezeptor RME-2 ist notwendig für optimalen Transport von Cholesterol, die Resistenz gegenüber <i>P. luminescens</i> und die Expression von VIT-6	97
4.1.12	Einfluss des Östrogens 17 β -Östradiol auf die durch <i>P. luminescens</i> verkürzte Lebensspanne in <i>C. elegans</i>	101
4.1.13	Bedeutung des nukleären Hormonrezeptors NHR-14 für die durch 17 β -Östradiol induzierte Lebensspanne-Verlängerung in <i>P. luminescens</i> infizierten Tieren	104
4.1.14	Der Einfluss des Phytoöstrogens Genistein auf die Lebensspanne in <i>P. luminescens</i> exponierten <i>C. elegans</i>	106
4.2	Bedeutung der Zinkmetalloprotease ZMP-2 für die Lebensspanne unter Hitzestress in <i>C. elegans</i>	109
4.2.1	<i>Zmp-2</i> -RNAi verkürzt die Lebensspanne in <i>C. elegans</i> unter Hitzestress ..	110
4.2.2	Stadien- und gewebespezifische Lokalisation der <i>zmp-2</i> -Expression	110
4.2.3	Vitellogenine werden für die Lebensspanne-Verkürzung durch <i>zmp-2</i> -RNAi benötigt	114
4.2.4	In <i>daf-9</i> - und <i>daf-12</i> -Mutanten ist der Effekt von <i>zmp-2</i> -RNAi verstärkt .	115

4.2.5	14-3-3-Proteine und SIR-2.1 sind an der <i>zmp-2</i> -RNAi induzierten Lebenszeitverkürzung beteiligt.....	116
4.2.6	Die durch den funktionellen Verlust von DAF-16 verhinderte Lebensspannen-Reduktion in <i>zmp-2</i> defizienten Nematoden benötigt die Aktivität des Steroid-Signalwegs.....	117
4.2.7	Der Einfluss von Vitellogeninen auf die Lebensspanne in <i>zmp-2</i> defizienten Tieren wird über den Steroid-Signalweg vermittelt.....	118
4.2.8	<i>Zmp-2</i> -RNAi induziert eine nukleäre DAF-16-Lokalisation in <i>C. elegans</i> ...	119
4.2.9	Quantifizierung der Vitellogenin-Expression nach <i>zmp-2</i> -RNAi mittels qRT-PCR und Western Blot	120
4.2.10	Bedeutung von ROS für die Lebensspanne-Verkürzung nach <i>zmp-2</i> -RNAi	122
4.2.11	Einfluss unterschiedlicher Cholesterol-Versorgung für die Lebensspanne-Verkürzung durch <i>zmp-2</i> -RNAi	126
4.2.12	Die <i>zmp-2</i> -RNAi induzierte Lebenszeitverkürzung ist vom Vitellogenin-Rezeptor RME-2 abhängig	129
4.2.13	Einfluss von 17 β -Östradiol auf die <i>vit</i> -RNAi-vermittelte Kompensation der <i>zmp-2</i> -RNAi induzierten Lebenszeitverkürzung	130
4.2.14	Einfluss des Phytoöstrogens Genistein auf die Lebensspanne in <i>zmp-2</i> -RNAi behandelten <i>C. elegans</i>	131
5	Diskussion.....	133
5.1	Einfluss der Vitellogenine auf die Immunantwort gegenüber <i>P. luminescens</i>	134
5.2	Einfluss der Vitellogenine auf einen durch <i>Knock-down</i> der Matrixmetalloprotease ZMP-2 induzierten Stress	158
	Zusammenfassung	167
	Summary	169
6	Literatur.....	171

7	Appendix	191
7.1	Appendix A - Materialien	191
7.2	Appendix B Ergebnisse – <i>P. luminescens</i>	212
7.3	Appendix C Ergebnisse - <i>zmp-2</i> -RNAi	221
	Danksagung	227
	Erklärung	228

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1 Körperaufbau adulter <i>C. elegans</i> (modifiziert nach Sulston und Horvitz 1977).	3
Abbildung 1.2 Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> Hermaphroditen bei 22°C (modifiziert nach Corsi 2006).	5
Abbildung 1.3 Immunantwort in <i>C. elegans</i> (modifiziert nach Schulenburg <i>et al.</i> 2008).	10
Abbildung 1.4 Grundstruktur der MMPs (modifiziert nach Page-McCaw <i>et al.</i> 2007).	17
Abbildung 1.5 DAF-12 und DAF-16 vermittelte Signalwege der Stressresistenz, Langlebigkeit und Diapause.	32
Abbildung 1.6 Ausschnitt der Steroidsynthese (Zwerev 1997).	34
Abbildung 1.7 Strukturformel des endogen wirksamen Östrogens 17 β -Östradiol (Estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol).	34
Abbildung 1.8 Strukturformel des Phytoöstrogens Genisteins (5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-chromen-4-one).	35
Abbildung 3.1 Das Prinzip der RNAi.	42
Abbildung 3.2 Typischer Verlauf einer Fluoreszenzkurve des Fluoroskan-Assay.	44
Abbildung 3.3 DNA-Gelelektrophorese zur Überprüfung des <i>vit-2</i> - und <i>vit-6</i> -Inserts.	52
Abbildung 3.4 Restriktionsverdau unterschiedlicher Plasmid-DNA.	55
Abbildung 3.5 Schematische Darstellung der erstellten <i>vit</i> -RNAi-Plasmide im pL4440-Vektor.	56
Abbildung 3.6 Funktioneller Nachweis des <i>vit-2</i> -RNAi-Klons in <i>vit-2::gfp</i> Nematoden durch Fluoreszenzmikroskopie.	58
Abbildung 3.7 Western Blot Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in <i>C. elegans</i> nach <i>vit-6</i> -RNAi.	59
Abbildung 3.8 Western Blot Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in <i>C. elegans</i> nach <i>vit-2</i> -RNAi.	59
Abbildung 3.9 Elektrophoretische Auftrennung des PCR-Amplifikats.	64
Abbildung 3.10 Genkarte des erstellen <i>zmp-2(2.1)::gfp</i> -Konstrukts.	67
Abbildung 4.1 Effekt einer 24 h Inkubation mit <i>P. luminescens</i> auf die Lebensspanne im <i>C. elegans</i> Wildtyp unter Hitzestress.	75
Abbildung 4.2 Intestinale Akkumulation von <i>P. luminescens</i> im <i>C. elegans</i> Wildtyp N2.	76

Abbildung 4.3 Effekt der <i>vit-6</i> -RNAi auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress nach <i>P. luminescens</i> -Inkubation. _____	77
Abbildung 4.4 Effekt der <i>P. luminescens</i> -Applikation auf die Lebensspanne der <i>daf-16</i> -Mutante unter Hitzestress im Vergleich zum Wildtyp. _____	79
Abbildung 4.5 Effekt der <i>P. luminescens</i> -Applikation auf die Lebensspanne unter Hitzestress in der <i>daf-9</i> - (A) und <i>daf-12</i> -Mutante (B) im jeweiligen Vergleich zum Wildtyp. _____	80
Abbildung 4.6 Effekt der <i>vit-3</i> -RNAi auf die Lebensspanne in der <i>daf-9</i> - (A) und <i>daf-12</i> -Mutante (B) unter Hitzestress nach <i>P. luminescens</i> -Infektion. _____	81
Abbildung 4.7 Subzelluläre DAF-16-Translokation in der <i>daf-16::gfp</i> -Mutante TJ356. _____	82
Abbildung 4.8 Subzelluläre DAF-16-Lokalisation in <i>daf-16::gfp</i> transgenen <i>C. elegans</i> nach <i>P. luminescens</i> -Infektion. _____	83
Abbildung 4.9 Subzelluläre DAF-16-Lokalisation in <i>daf-16::gfp</i> transgenen <i>C. elegans</i> nach <i>P. luminescens</i> -Infektion und <i>vit</i> -RNAi. _____	83
Abbildung 4.10 Mit MitoTracker Red CM-H ₂ XRos detektierte mitochondriale ROS in <i>P. luminescens</i> infizierten Nematoden. _____	85
Abbildung 4.11 H ₂ O ₂ -Detektion nach <i>P. luminescens</i> -Infektion mittels Amplex Ultra Red. _____	86
Abbildung 4.12 H ₂ O ₂ -Detektion in <i>E. coli</i> HT115- und pathogenen <i>P. luminescens</i> -Bakterien mittels Amplex Ultra Red. _____	86
Abbildung 4.13 Effekt einer Ascorbinsäure (AA)-Applikation [100 µM] nach <i>vit-6</i> -RNAi und <i>P. luminescens</i> -Inkubation auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress. _____	87
Abbildung 4.14 Relative <i>vit-6</i> -mRNA-Expression nach 24 h <i>P. luminescens</i> -Inkubation in <i>C. elegans</i> . _____	88
Abbildung 4.15 Effekt der <i>P. luminescens</i> -Inkubation auf die Lebensspanne Cholesterol defizienter <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress. _____	89
Abbildung 4.16 Effekt der <i>vit-6</i> -RNAi auf die Lebensspanne von Cholesterol defizienten <i>C. elegans</i> unter Hitzestress nach <i>P. luminescens</i> -Inkubation. _____	90
Abbildung 4.17 Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in <i>C. elegans</i> unter Cholesterolmangel. _____	91
Abbildung 4.18 Effekte unterschiedlicher Cholesterolgaben auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress. _____	92

Abbildung 4.19 Effekt der <i>vit-6</i> -RNAi auf die Lebensspanne in <i>C. elegans</i> N2 bei zeitgleich verminderter Cholesterol-Applikation nach <i>P. luminescens</i> -Inkubation unter Hitzestress. _____	92
Abbildung 4.20 Effekte von erhöhter Cholesterol-Exposition auf die Lebensspanne in <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress. _____	93
Abbildung 4.21 Effekt einer erhöhten Cholesterol-Exposition [500 µg/ml] nach Infektion mit <i>P. luminescens</i> auf die Lebensspanne in <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress. _____	94
Abbildung 4.22 Effekt einer erhöhten Cholesterol Exposition [500 µg/ml] bei zeitgleicher <i>vit-6</i> -RNAi und <i>P. luminescens</i> -Infektion auf die Lebensspanne in <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress. _____	94
Abbildung 4.23 Effekt der Cholesterol Exposition [50 µg/ml] und zeitgleicher <i>vit-6</i> -RNAi und <i>P. luminescens</i> -Infektion auf die Lebensspanne in <i>C. elegans</i> unter Hitzestress. _____	95
Abbildung 4.24 Effekt einer erhöhten Cholesterol Exposition [50 µg/ml] und <i>P. luminescens</i> Infektion auf die Lebensspanne in <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress. _____	96
Abbildung 4.25 Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in <i>C. elegans</i> N2 bei Exposition gegenüber unterschiedlicher Cholesterol-Konzentrationen. _____	97
Abbildung 4.26 Relative Fluoreszenz von Dehydroergosterol (DHE) nach 4-tägiger Inkubation mit Kontroll-, <i>rme-2</i> - bzw. <i>vit-6</i> -RNAi Klonen in <i>C. elegans</i> . _____	98
Abbildung 4.27 Effekt einer <i>P. luminescens</i> -Infektion auf die Lebensspanne in der <i>rme-2</i> -Mutante und im Wildtyp unter Hitzestress. _____	99
Abbildung 4.28 Effekt einer <i>P. luminescens</i> -Infektion und/oder <i>vit-6</i> -RNAi auf die Lebensspanne in der <i>rme-2</i> -Mutante unter Hitzestress. _____	100
Abbildung 4.29 Western Blot Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in <i>C. elegans</i> nach <i>rme-2</i> -RNAi. _____	100
Abbildung 4.30 Effekte der 24 h Inkubation mit 0,1 µM, 1 µM und 10 µM 17β-Östradiol sowie 4 Tage Inkubation mit 10 µM 17β-Östradiol. _____	101
Abbildung 4.31 Effekt einer Inkubation mit 17β-Östradiol [10 µM] auf den lebensverkürzenden Effekt von <i>P. luminescens</i> in <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress. _____	102
Abbildung 4.32 Effekt der <i>vit-2</i> -RNAi bei gleichzeitiger 4-tägiger Inkubation mit 17β-Östradiol [10 µM] und 24 h Inkubation mit <i>P. luminescens</i> auf die Überlebenskurven von <i>C. elegans</i> unter Hitzestress. _____	103

Abbildung 4.33 Relative <i>vit-2</i> -Expression nach 4 Tagen 17 β -Östradiol [10 μ M] Inkubation in <i>C. elegans</i> .	104
Abbildung 4.34 Effekt der <i>nhr-14</i> -RNAi auf die Lebensverkürzung von 24 h <i>P. luminescens</i> -Inkubation in <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress.	105
Abbildung 4.35 Effekt der <i>nhr-14</i> -RNAi auf die Lebensverkürzung einer <i>P. luminescens</i> -Inkubation und 17 β -Östradiol [10 μ M] Applikation in <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress.	105
Abbildung 4.36 Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in <i>nhr-14</i> -RNAi behandelten <i>C. elegans</i> .	106
Abbildung 4.37 Effekt einer <i>P. luminescens</i> -Behandlung und Inkubation mit Genistein [100 μ M] auf die Lebensspanne im <i>C. elegans</i> Wildtyp unter Hitzestress.	107
Abbildung 4.38 Effekt einer Genistein-Behandlung [100 μ M] unter <i>P. luminescens</i> -Exposition und <i>vit-6</i> -RNAi auf die Lebensspanne im <i>C. elegans</i> Wildtyp unter Hitzestress.	108
Abbildung 4.39 Relative <i>vit-2</i> - und <i>vit-6</i> -Expression nach Genistein Behandlung [100 μ M] in <i>C. elegans</i> .	108
Abbildung 4.40 Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in <i>C. elegans</i> N2 nach Inkubation mit Genistein [100 μ M].	109
Abbildung 4.41 Effekt der <i>zmp-2</i> -RNAi auf die Lebensspanne im <i>C. elegans</i> Wildtyp unter Hitzestress.	110
Abbildung 4.42 Embryonale Expression von <i>zmp-2</i> in <i>C. elegans</i> .	112
Abbildung 4.43 <i>zmp-2</i> -Expression in <i>C. elegans</i> -Larven.	113
Abbildung 4.44 <i>zmp-2</i> -Expression in adulten Tieren.	114
Abbildung 4.45 Effekt der <i>zmp-2</i> -RNAi bei zeitgleicher <i>vit-6</i> -RNAi auf die Überlebenskurve in <i>C. elegans</i> unter Hitzestress.	114
Abbildung 4.46 Effekt der <i>zmp-2</i> -RNAi auf die Lebensspanne in der <i>daf-9</i> - (A) und <i>daf-12</i> -Mutante (B) unter Hitzestress.	115
Abbildung 4.47 Effekt der <i>zmp-2</i> -RNAi auf die Lebensspanne in der <i>daf-16</i> -Mutante unter Hitzestress.	116
Abbildung 4.48 Effekt der <i>zmp-2</i> -RNAi und zeitgleicher <i>ftt-2</i> -RNAi auf die Lebensspanne in <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress.	116
Abbildung 4.49 Effekt der <i>zmp-2</i> -RNAi bei zeitgleicher <i>daf-16</i> -RNAi auf die Lebensspanne in der <i>daf-9</i> - (A) und <i>daf-12</i> -Mutante (B) unter Hitzestress.	118

Abbildung 4.50 Effekt der <i>zmp-2</i> -RNAi bei zeitgleicher <i>vit-3</i> -RNAi auf die Lebensspanne der <i>daf-9</i> - (A) und <i>daf-12</i> -Mutante (B) unter Hitzestress. _____	119
Abbildung 4.51 DAF-16-Translokation der <i>daf-16::gfp</i> -Mutante nach kombinierter <i>zmp-2</i> - und <i>vit</i> -RNAi. _____	120
Abbildung 4.52 Relative <i>vit-2</i> - und <i>vit-6</i> -Expression nach 4-tägiger <i>zmp-2</i> -RNAi in <i>C. elegans</i> . _____	121
Abbildung 4.53 Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in <i>zmp-2</i> -RNAi behandelten <i>C. elegans</i> . _____	121
Abbildung 4.54 Mit Mito Tracker Red CM-H ₂ XRos markierte Nematoden zum Nachweis mitochondrialer ROS und deren densitometrische Auswertung. _____	123
Abbildung 4.55 H ₂ O ₂ -Sekretion durch <i>zmp-2</i> -RNAi mit und ohne zeitgleicher <i>vit-6</i> -RNAi mittels Amplex UltraRed. _____	124
Abbildung 4.56 OxyBlot-Analyse zur Quantifizierung der oxidativen Modifikationen. _____	125
Abbildung 4.57 Effekt der <i>zmp-2</i> -RNAi und zeitgleicher Ascorbinsäure (AA) Exposition auf die Lebensspanne in <i>C. elegans</i> unter Hitzestress. _____	126
Abbildung 4.58 Effekt der <i>vit-6</i> -RNAi und zeitgleicher <i>zmp-2</i> -RNAi auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress bei geringer Cholesterolgabe [2,5 µg/ml]. _____	127
Abbildung 4.59 Effekt einer erhöhten Cholesterol Exposition [500 µg/ml] bei zeitgleicher <i>vit-6</i> - und <i>zmp-2</i> -RNAi auf die Lebensspanne in <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress. _____	128
Abbildung 4.60 Effekt der Cholesterol Exposition [50 µg/ml] und zeitgleicher <i>vit-6</i> - und <i>zmp-2</i> -RNAi auf die Überlebenskurven in <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress. _____	129
Abbildung 4.61 Effekt der <i>zmp-2</i> -RNAi und zeitgleicher <i>vit-6</i> -RNAi auf die Überlebenskurve in <i>rme-2</i> -Mutanten unter Hitzestress. _____	130
Abbildung 4.62 Effekte einer 4 Tage Inkubation mit 17β-Östradiol [10 µM] auf den lebensverkürzenden Effekt von <i>zmp-2</i> -RNAi (A) und mit Kontroll-RNAi verdünnter <i>zmp-2</i> -RNAi (B) in <i>C. elegans</i> unter Hitzestress. _____	131
Abbildung 4.63 Effekte einer 4-tägiger Inkubation mit Genistein [100 µM] mit und ohne <i>zmp-2</i> -RNAi auf die Lebensspanne im <i>C. elegans</i> Wildtyp unter Hitzestress. _____	132
Abbildung 5.1 Lipid-Transport in <i>C. elegans</i> und die Rolle der transportierten Lipide im Intestinum, in den Neuronen und in der Keimbahn. _____	142

Abbildung 5.2 Transkriptionaler Einfluss des Östrogens 17β -Östradiol und des Phytoöstrogens Genistein auf die Vitellogenin-Expression und die hiermit vermittelten Effekte. _____ 152

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1 Reaktionsansatz für die PCR. _____	50
Tabelle 3.2 Zusammensetzung zweier Trenngele (8,5 %). _____	69
Tabelle 3.3 Zusammensetzung zweier Sammelgele. _____	69

Tabellen im Appendix A

Tabelle A 7.1 Nematodenstämme mit Angabe der Referenz. _____	191
Tabelle A 7.2 Bakterienstämme mit Angabe der Referenz. _____	192
Tabelle A 7.3 Chemikalien mit Angabe der Bezugsquelle. _____	194
Tabelle A 7.4 Molekularbiologische Kits mit Angabe der Bezugsquelle. _____	197
Tabelle A 7.5 verwendete Enzyme mit Angabe der Bezugsquelle. _____	197
Tabelle A 7.6 Oligonukleotide mit Angabe der Sequenz _____	198
Tabelle A 7.7 Antikörper und deren Bezugsquelle. _____	199
Tabelle A 7.8 Vektoren mit Angabe der Funktionen und Bezugsquelle. _____	199
Tabelle A 7.9 Konzentrationen der Stammlösungen. _____	200
Tabelle A 7.10 NGM-Flüssigmedium. _____	202
Tabelle A 7.11 NaCl-Pepton-Lösung. _____	202
Tabelle A 7.12 NGM-Agar. _____	202
Tabelle A 7.13 2xYT-Medium. _____	203
Tabelle A 7.14 M9-Puffer _____	204
Tabelle A 7.15 Wurmlyse-Puffer. _____	204
Tabelle A 7.16 Einfrier-Puffer. _____	204
Tabelle A 7.17 M9-Puffer/Tween20 bzw. Tween80. _____	205
Tabelle A 7.18 Bleichlösung. _____	205
Tabelle A 7.19 Levamisol. _____	205
Tabelle A 7.20 MgCl ₂ /CaCl ₂ -Lösung. _____	206
Tabelle A 7.21 Amplex UltraRed-Reagenz. _____	206
Tabelle A 7.22 Blotpuffer nach Towbin. _____	206
Tabelle A 7.23 Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Lösung. _____	206
Tabelle A 7.24 Lämmli-Puffer (3x) _____	207

Tabelle A 7.25 Laufpuffer. _____	207
Tabelle A 7.26 Strippuffer. _____	207
Tabelle A 7.27 TBS-Puffer (Tris buffered saline). _____	208
Tabelle A 7.28 TBS-T-Puffer (Tris buffered saline with Tween). _____	208
Tabelle A 7.29 Milchpulverlösung. _____	208
Tabelle A 7.30 Verwendete Geräte und Laborhilfsmittel. _____	208
Tabelle A 7.31 verwendete Verbrauchsmaterialien. _____	210
Tabelle A 7.32 verwendete Software. _____	211

Tabellen im Appendix B

Tabelle B 7.1 Mittlere Lebensspannen von <i>C. elegans</i> unter Hitzestress nach Inkubation mit <i>P. luminescens</i> . _____	212
Tabelle B 7.2 Mittlere Lebensspannen von <i>C. elegans</i> unter Hitzestress nach <i>P. luminescens</i> -Inkubation und <i>vit</i> -RNAi. _____	212
Tabelle B 7.3 Mittlere Lebensspannen <i>P. luminescens</i> infizierter Wildtyp-Tiere und Deletionsmutanten unter Hitzestress und deren Beeinflussung durch genspezifische RNAi. _____	213
Tabelle B 7.4 Mittlere Lebensspannen <i>P. luminescens</i> infizierter Wildtyp-Tiere und Deletionsmutanten unter Hitzestress. _____	214
Tabelle B 7.5 Mittlere Lebensspannen unterschiedlicher <i>daf</i> -Deletionsmutanten unter Hitzestress nach <i>P. luminescens</i> -Exposition und <i>vit</i> -RNAi. _____	214
Tabelle B 7.6 Mittlere Lebensspannen der <i>vit-2</i> -Deletionsmutante unter Hitzestress nach <i>P. luminescens</i> -Exposition und <i>daf</i> -RNAi. _____	215
Tabelle B 7.7 Mittlere Lebensspannen des Wildtyps unter Hitzestress bei <i>P. luminescens</i> Exposition, <i>vit-6</i> -RNAi und Applikation von Ascorbinsäure (AA). _____	215
Tabelle B 7.8 Mittlere Lebensspannen der Wildtyp-Tiere nach Cholesterol-Depletion unter Hitzestress. _____	215
Tabelle B 7.9 Mittlere Lebensspannen der Wildtyp-Tiere ohne Cholesterolgabe unter Hitzestress bei zeitgleicher <i>vit-6</i> -RNAi und <i>P. luminescens</i> -Inkubation. _____	216

Tabelle B 7.10 Mittlere Lebensspannen der Wildtyp-Tiere bei Applikation unterschiedlicher Cholesterol-Konzentrationen unter Hitzestress. _____	216
Tabelle B 7.11 Mittlere Lebensspannen <i>vit-6</i> defizienter Wildtyp-Tiere nach <i>P. luminescens</i> -Inkubation und verminderter Cholesterol-Applikation unter Hitzestress. ____	216
Tabelle B 7.12 Mittlere Lebensspannen bei erhöhter Cholesterol-Exposition in Wildtyp-Tieren unter Hitzestress. _____	217
Tabelle B 7.13 Mittlere Lebensspannen bei Inkubation mit erhöhter Cholesterolkonzentration und zeitgleicher <i>vit-6</i> -RNAi und <i>P. luminescens</i> -Infektion in <i>C. elegans</i> unter Hitzestress. _____	217
Tabelle B 7.14 Mittlere Lebensspannen von <i>C. elegans</i> N2 nach <i>vit-6</i> -RNAi, zeitgleicher Cholesterol-Applikation [50 µg/ml] und <i>P. luminescens</i> -Infektion unter Hitzestress. _____	217
Tabelle B 7.15 Mittlere Lebensspannen der <i>rme-2</i> -Deletionsmutante und des Wildtyps unter Hitzestress bei <i>P. luminescens</i> -Exposition. _____	218
Tabelle B 7.16 Mittlere Lebensspannen der <i>rme-2</i> -Deletionsmutante unter Hitzestress nach <i>P. luminescens</i> -Exposition und <i>vit-6</i> -RNAi. _____	218
Tabelle B 7.17 Mittlere Lebensspannen von N2 unter Hitzestress nach 24 h bzw. 4 Tagen Inkubation mit 17β-Östradiol. _____	218
Tabelle B 7.18 Mittlere Lebensspannen von <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress nach Inkubation mit 17β-Östradiol [10 µM] und <i>P. luminescens</i> . _____	219
Tabelle B 7.19 Mittlere Lebensspannen von N2 Nematoden unter Hitzestress nach <i>vit-2</i> -RNAi sowie 17β-Östradiol- [10 µM] und 24 h <i>P. luminescens</i> -Inkubation. _____	219
Tabelle B 7.20 Mittlere Lebensspannen von <i>C. elegans</i> unter Hitzestress nach <i>nhr-14</i> -RNAi und <i>P. luminescens</i> -Inkubation sowie nach Kombination. _____	219
Tabelle B 7.21 Mittlere Lebensspannen von <i>C. elegans</i> N2 nach <i>nhr-14</i> -RNAi und 17β-Östradiol-Applikation nach <i>P. luminescens</i> -Infektion unter Hitzestress. _____	220
Tabelle B 7.22 Mittlere Lebensspannen von <i>C. elegans</i> unter Hitzestress nach <i>P. luminescens</i> -Behandlung und Applikation von Genistein [100 µM]. _____	220
Tabelle B 7.23 Mittlere Lebensspannen von <i>C. elegans</i> unter Hitzestress nach Genistein [100 µM] Behandlung, Applikation von <i>P. luminescens</i> und <i>vit-6</i> -RNAi. _____	220

Tabellen im Appendix C

Tabelle C 7.1 Mittlere Lebensspannen nach <i>zmp-2</i> -RNAi in <i>C. elegans</i> unter Hitzestress. _	221
Tabelle C 7.2 Mittlere Lebensspannen von <i>C. elegans</i> unter Hitzestress bei <i>zmp-2</i> -RNAi und zusätzlicher <i>vit</i> -RNAi. _____	221
Tabelle C 7.3 Mittlere Lebensspannen nach <i>zmp-2</i> -RNAi in Wildtyp-Tieren und Deletionsmutanten unter Hitzestress. _____	222
Tabelle C 7.4 Mittlere Lebensspannen nach RNAi von <i>zmp-2</i> und 14-3-3-Proteinen im Wildtyp unter Hitzestress. _____	222
Tabelle C 7.5 Mittlere Lebensspannen nach <i>zmp-2</i> - und zeitgleicher <i>daf-16</i> -RNAi in Deletionsmutanten unter Hitzestress. _____	223
Tabelle C 7.6 Mittlere Lebensspannen unterschiedlicher <i>daf</i> -Deletionsmutanten unter Hitzestress bei <i>zmp-2</i> -RNAi und gleichzeitiger <i>vit</i> -RNAi. _____	223
Tabelle C 7.7 Mittlere Lebensspannen von <i>C. elegans</i> unter Hitzestress bei <i>zmp-2</i> -RNAi und gleichzeitiger Ascorbinsäure-Applikation. _____	224
Tabelle C 7.8 Mittlere Lebensspannen der Wildtyp-Tiere unter Hitzestress nach <i>vit-6</i> - und <i>zmp-2</i> -RNAi bei geringer Cholesterolgabe. _____	224
Tabelle C 7.9 Mittlere Lebensspannen von <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress bei <i>zmp-2</i> -RNAi, gleichzeitiger <i>vit-6</i> -RNAi und erhöhter Cholesterolgabe [250, 500µg/ml]. ____	225
Tabelle C 7.10 Mittlere Lebensspannen von <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress nach erhöhter Cholesterolgabe [50 µg/ml] und <i>zmp-2</i> -RNAi und/oder <i>vit-6</i> -RNAi. _____	225
Tabelle C 7.11 Mittlere Lebensspannen der <i>rme-2</i> -Deletionsmutante unter Hitzestress bei <i>zmp-2</i> -RNAi und zeitgleicher <i>vit-6</i> -RNAi. _____	225
Tabelle C 7.12 Mittlere Lebensspannen von <i>C. elegans</i> N2 unter Hitzestress nach <i>zmp-2</i> -RNAi und 4-tägiger 17β-Östradiol-Inkubation. _____	226
Tabelle C 7.13 Mittlere Lebensspannen von <i>C. elegans</i> unter Hitzestress nach Genistein-Applikation [100 µM] bei zeitgleicher <i>zmp-2</i> -RNAi. _____	226

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMP	Ampicillin
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ApoB-100	Apolipoprotein-B-100
AUC	<i>area under the curve</i>
BSA	bovines Serumalbumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
CTL	<i>catalase</i>
CTLD	C-type lectin domain
CT-Wert	cycle threshold-Wert
DA	dafachronische Säure
DAF	dauer formation
DHE	Dehydroergosterol
DRH	<i>Dicer related helicase</i>
Dscams	<i>Down syndrome cell adhesion molecules</i>
DSC-4	Homolog zum mikrosomalen Triglycerid-Transferprotein (MTP)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
dsRNA	doppelsträngige RNA
ECM	<i>extra cellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EggPrep	egg preparation
ER	Östrogen-Rezeptor
ERE	<i>estrogen response element</i>
ERK	<i>extracellular signal-reduced kinase</i>
FoxO	forkhead box O
GFP	green fluorescent protein
HRP	horseradish peroxidase
HSF	Hitzeschockfaktor
IDL	<i>intermediate-density-lipoprotein</i>

IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IJ	<i>infectious juvenile</i>
ILR	<i>insulin-like receptor</i>
ILS	IGF-Signalweg
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JH	<i>juvenile hormone</i>
JNK	c-Jun N-terminal kinase
L1-L4	Larvenstadium 1-4
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low-density-lipoprotein-receptor</i>
LPL	Lipoproteinlipase
LXR	<i>Liver x receptor</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MMP	Matrixmetalloprotease
MTP	mikrosomalen Triglycerid-Transferprotein
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NGM	<i>nematode growth medium</i>
NHR	nukleärer Hormon-Rezeptor
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCD	<i>programmed cell death</i>
PL	<i>P. luminescens</i> -behandelte Gruppe
<i>P. luminescens</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i>
RAB	<i>Ras-related in brain</i>
RdRPs	<i>RNA-dependent RNA-polymerases</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RME-2	Rezeptormediierte Endozytose-2 (Vitellogenin-Rezeptor in <i>C. elegans</i>)
RNAi	<i>ribonucleic acid interferenz</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>short interfering RNA</i>

SOD	S uper o xid d ismutase
tc	<i>toxin complex</i>
TEMED	T etramethylethylendi a min
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMPs	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
VDR	V itamin D R e zeptor
VIT	V itellogenin
VLDL	<i>very-low-density-lipoprotein</i>
VPE	V itellogenin P romotor E lement
ZMP	Z ink m etallo p rotease

1 EINLEITUNG

1.1 Der Nematode *Caenorhabditis elegans*

1.1.1 Klassifizierung und Anatomie von *C. elegans*

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) gehört den Nematoda, der arten- und individuenreichsten Metazoengruppe, an (Poinar 1983). Der für Nematoden typische zylindrisch bis fadenförmig, nicht segmentierte Körperbau führte zu der deutschen Bezeichnung Fadenwurm (Abbildung 1.1). Nematoden kommen sowohl in terrestrischen als auch aquatischen (Salz- und Süßwasser) Gebieten vor, wobei einige Arten zu parasitären Lebensweisen übergegangen sind: 10 % der Nematoden sind Pflanzenparasiten; 15 % sind Parasiten, die Menschen und Tiere befallen; die restlichen Nematoden sind freilebend (Lucius und Loos-Frank 1997). Mitte der 60er Jahre entdeckte Sydney Brenner in Cambridge/England die im Erdboden frei lebenden Nematoden, die sich von Bakterien (hauptsächlich der Gattung *Escherichia coli*) ernähren (Brenner 1973, Schierenberg und Cassada 1986). *C. elegans* ist ein Vertreter der Klasse der *Secernentea* und der Familie der *Rhabditidae* (Nicholas 1984).

C. elegans besteht aus einer inneren und äußeren Röhre, die durch das Pseudocoelom getrennt sind. Das Pseudocoelom, die Flüssigkeit der inneren Leibeshöhle, baut einen Turgordruck gegen die starre Außenhülle auf (Hydroskelett). Die vier längs verlaufenden Körpermuskelstränge und die Deformation der elastischen Kutikula ermöglichen die schlängelnde Fortbewegung, wobei der Turgordruck als Antagonist wirkt. Die äußere Röhre besitzt eine mehrschichtige Kutikula, welche von der darunter liegenden Hypodermis sezerniert wird. Neben Kutikula und Hypodermis zählen Exkretionssysteme, Muskeln und Neurone zu der äußeren Röhre. Die innere Röhre setzt sich aus Pharynx und Intestinum zusammen. Die Nahrung wird über einen in zwei Bulbi geteilten Pharynx aufgenommen. Der Pharynx ist physiologisch autonom und verfügt dementsprechend über eine eigene Muskulatur und Epithelschicht, sowie ein eigenes neuronales System. Im hinteren Bereich des Pharynx wird die aufgenommene Nahrung konzentriert, durch ein Mahlwerkzeug, den *Grinder*, zerrieben und über das pharyngeale Ventil in das unmittelbar angeschlossene Intestinum weitergeleitet. Das Intestinum von *C. elegans* besitzt 20 nicht regenerierbare Epithelzellen, die in neun Ringen organisiert und um das zentrale Lumen angeordnet sind.

Intestinale Zellen besitzen eine große Anzahl an Mitochondrien, Ribosomen, membrangebundenen Vesikeln und Vakuolen, sowie ein ausgeprägtes rauhes Endoplasmatisches Retikulum (McGhee 2007). Diese Zellen sind metabolisch hoch aktiv und besitzen strukturelle Ähnlichkeiten zu den menschlichen intestinalen Epithelzellen (Irazoqui und Ausubel 2010). Die apikale Membran der Zellen bildet eine Bürstensaummembran aus. Mit Hilfe der Sekretion von Verdauungsenzymen, wie Cysteinproteasen und Endonukleasen, in das Lumen sind die Intestinalzellen für die Digestion der Nahrung als Voraussetzung für die Absorption von Nährstoffen zuständig. Die Anwesenheit von Granula weist darüber hinaus auf ihre Speicherfunktion hin, wie z. B. die von Glykogen (Altun und Hall 2010). Epithelzellen, die Vakuolen mit Lipoproteinen und Lipiden enthalten, sind hauptsächlich im hinteren Abschnitt des Intestinums nachweisbar. Diese Zellen spielen eine entscheidende Rolle für die Speicherung von Nährstoffen und Energie (Borgonie *et al.* 1995). Darüber hinaus sind die Darmzellen für die Versorgung der Keimzellen mit Nährstoffen durch die Synthese von Lipiden und Proteinen, wie den Vitellogeninen, verantwortlich (Altun und Hall 2008, Grant und Hirsh 1999). Die Initiation der angeborenen Immunantwort wird ebenfalls durch die intestinalen Epithelzellen vermittelt. Die Verteilung einer Vielzahl an Aufgaben auf wenige Zellen unterscheidet *C. elegans* von höherentwickelten Organismen, in denen die beschriebenen Funktionen von mehreren Organen übernommen werden (Altun und Hall 2010).

Bei *C. elegans* gibt es zwei Geschlechtsformen (Abbildung 1.1): Hermaphrodite und Männchen. Der etwa 1 mm große adulte Hermaphrodit besitzt neben den fünf autosomalen Chromosomenpaaren zwei Geschlechtschromosomen (XX). Im L4 Larvenstadium der Hermaphroditen werden Spermien gebildet und in den Spermathecae gespeichert. Anschließend produzieren die adulten Würmer ausschließlich Oocyten, wodurch eine Selbst-Fertilisation ermöglicht wird. Das spontane Auftreten der 0,6 mm großen Männchen beträgt max. 1 % der Population und ist auf eine *non-disjunction* während der Meiose zurückzuführen. Männchen besitzen nur ein X Chromosom (XO) (Corsi 2006).

Seit Dezember 1998 ist das $9,7 \times 10^7$ Basenpaare große Genom von *C. elegans* vollständig sequenziert. Es enthält ca. 20.000 proteinkodierende Gene verteilt auf die 6 Chromosomen (*The C. elegans Sequencing Consortium* 1998). Die komplette Zellabstammungslinie ist im Wesentlichen von Individuum zu Individuum unveränderlich (Hedgecock 1983, Böse 2004).

Dieser invariante Zellstammbaum ist von der befruchteten Eizelle bis zum adulten Tier bekannt. Hierbei liegt Eutelie vor, d. h. jedes adulte Männchen besitzt genau 1031 somatische Zellen, die adulten Hermaphroditen bestehen aus konstanten 959 somatischen Zellen. Etwa 10 % der 558 Zellen eines Jungtieres teilen sich postembryonal für die Bildung von Gonaden und anderer somatischer Zellstrukturen. Nicht nur das Zellteilungsmuster ist von Individuum zu Individuum so gut wie identisch, sondern auch die Anatomie der adulten Nematoden. Das Juvenilstadium (L1) ist dem adulten Tier in Anatomie und Verhalten sehr ähnlich, abgesehen von den noch nicht entwickelten Gonaden. Während des Ablaufs der vier Larvenstadien erhöht sich die Masse des Tieres um das Hundertfache (Corsi 2006).

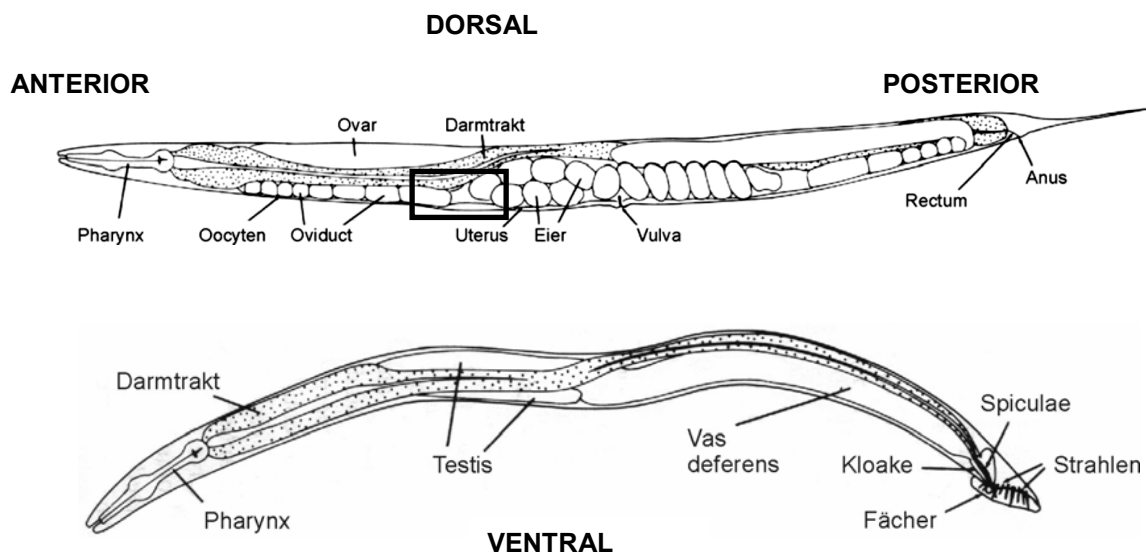


Abbildung 1.1 Körperaufbau adulter *C. elegans* (modifiziert nach Sulston und Horvitz 1977).

Die Abbildung zeigt den Aufbau eines adulten Hermaphroditen (oben) und eines Männchens (unten). *C. elegans* ist ein diploider, selbstbefruchtender Hermaphrodit, d.h. er ist ein Weibchen, das im späten Juvenilstadium Spermien produzieren kann. Der adulte Hermaphrodit besitzt zwei gebogene Gonadenschläuche, in denen sich Ovar, Ovidukt, Uterus und Spermatheca befinden. Durch die ventral gelegene Vulva werden die entwickelten Eier abgelegt. Neben den Unterschieden in der neuronalen Ausstattung und der Ausbildung anderer Gewebe (posterior gelegener Fächer) besitzen Männchen im Gegensatz zu Hermaphroditen keine zweiarmigen somatischen Gonaden, sondern einarmige. Sie bestehen aus den Hoden, den Samenblasen und einem Ventil, welches durch den Samenleiter mit der Kloake verbunden ist. Die Keimbahn sitzt an der distalen Spitze der Gonaden.

1.1.2 Lebenszyklus von *C. elegans*

Die postembryonale Entwicklung von *C. elegans* umfasst wie bei allen Nematoden vier Larvenstadien, wobei der Wechsel zum jeweils folgenden Larvenstadium durch eine Häutung eingeleitet wird und somit eine Größenzunahme ermöglicht.

Die Embryonen befinden sich bis zu einem Stadium von 28 – 30 Zellen im Körper der adulten Tiere, bevor sie abgelegt werden. Anschließend setzt sich die in Proliferation und Morphogenese unterteilte Embryogenese außerhalb des adulten Tieres für ca. 13 h fort. Die postembryonale Entwicklung vom Ei bis zum adulten Nematoden dauert unter optimalen Bedingungen 3 – 4 Tage, wobei die komplette Lebenserwartung bei 25 °C zwischen 14 und 20 Tage beträgt. Der vollständige Lebenszyklus ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Adulte Hermaphroditen sind bis zu vier Tage fertil und leben noch weitere 10 – 15 Tage lang, wobei sie ca. 300 – 350 Nachkommen produzieren, begrenzt durch die Anzahl der Spermien (Gumienny 2001). Da sich Männchen sechs Tage lang nach der letzten Häutung paaren und ca. 3 000 Spermien produzieren, kann durch eine Paarung mit einem Männchen die Anzahl an Nachkommen auf 1 200 – 1 400 gesteigert werden (Altun und Hall 2010).

Bei Nahrungsknappheit kann die Entwicklung im L1-Stadium für 6 - 10 Tage eingestellt werden, bis ausreichend Nahrung verfügbar ist. Nach Abschluss des L2-Stadiums können die Larven bei ungünstigen Umweltbedingungen einen alternativen Entwicklungsweg einschlagen, der zur Bildung von Dauerlarven führt. Stressoren wie Nahrungsknappheit, hohe Temperaturen und hohe Pheromonkonzentrationen bei Überpopulation können Signalwirkung für die Auslösung des fakultativen Dauerstadiums haben. In diesem Dauerstadium können sie durch einen stark reduzierten Stoffwechsel, abhängig von den Lipidspeichern, bis zu sechs Monate ausharren. Bei Eintreten günstigerer Bedingungen beginnt nach 2 - 3 h die Nahrungsaufnahme, nach weiteren 10 h eine Häutung zur L4-Larve und anschließend setzen sie den normalen Lebenszyklus fort. Während des fakultativen Dauerlarvenstadiums ist die Stressresistenz erhöht, die Kutikula ist verdickt und die Bewegungen sind minimiert (Riddle *et al.* 1981, Klass und Hirsh 1976). Der Pharynx ist währenddessen mit einer kutikulären Kapsel verschlossen und zeigt daher keine Pumpaktivität (Propham und Webster 1979, Albert und Riddle 1983). Um eine Austrocknung zu vermeiden, schließen sich die Dauerlarven in Gruppen zusammen (Riddle *et al.* 1981). Die Gene, welche die Entwicklung zur Dauerlarve beeinflussen, sind unter anderem homolog zu

Genen, die in den Insulin- und *transforming growth factor* β (TGF β)-Signalwegen in Vertebraten eine Rolle spielen (Corsi 2006).

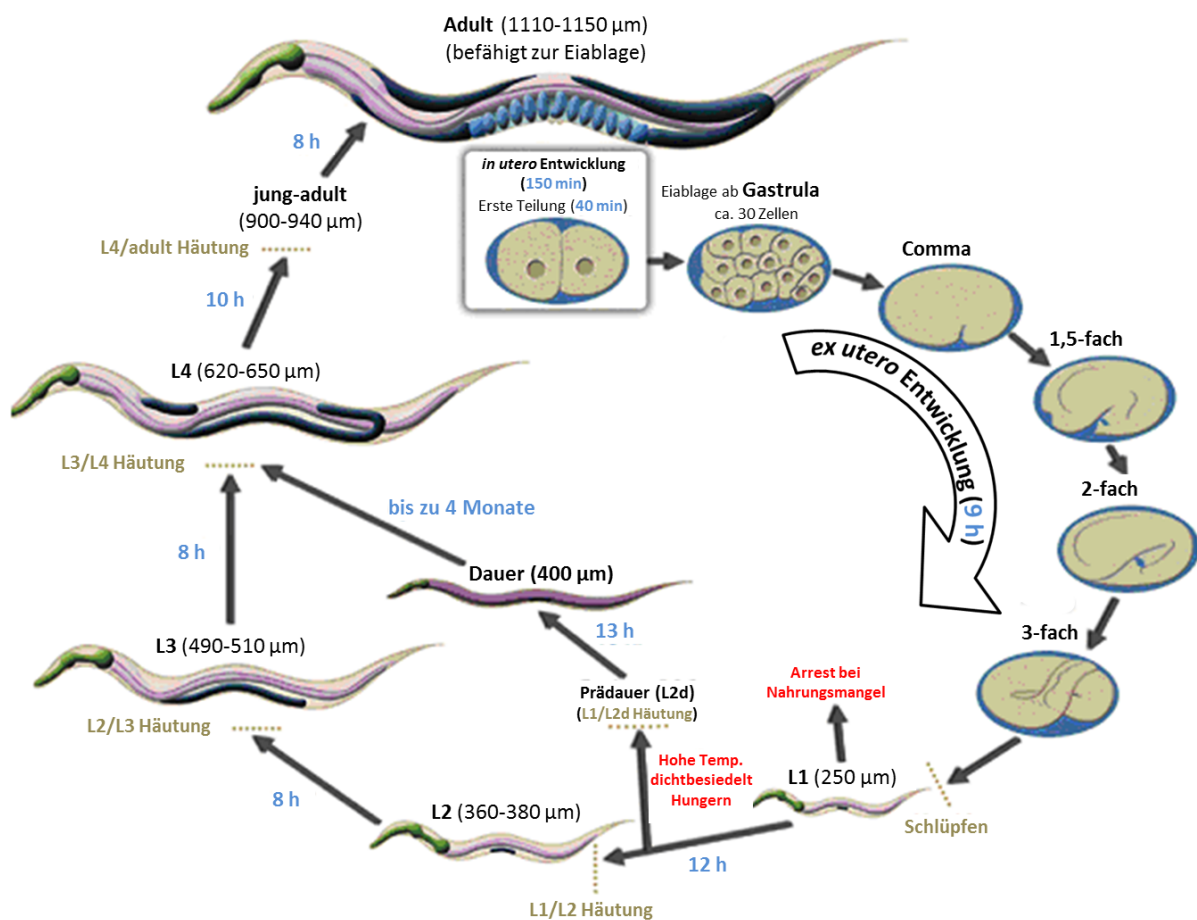


Abbildung 1.2 Lebenszyklus von *C. elegans* Hermaphroditen bei 22°C (modifiziert nach Corsi 2006).

Der adulte Hermaphrodit (oben) legt die Eier in einem Stadium von 28 – 30 Zellen ab. Die geschlüpften L1-Larven entwickeln sich postembryonal unter adäquaten Bedingungen über vier Larvenstadien zum adulten Tier. Die Entwicklung der Gonaden ist dunkelblau gekennzeichnet. Bei ungünstigen Umweltbedingungen vor der L1/L2-Häutung, schlagen die Larven einen alternativen Weg ein und entwickeln sich zur Dauerlarve. Die Größe der Tiere ist in Klammern angegeben und die zeitliche Abfolge ist neben den Pfeilen aufgelistet.

1.1.3 *C. elegans* als Modellorganismus

Für ein besseres Verständnis der Prozesse höher entwickelter Lebewesen wie beispielsweise den Säugetieren kann die Entschlüsselung molekularbiologischer, morphologischer und physiologischer Zusammenhänge in Modellorganismen wie *C. elegans* beitragen. Die evolutionsgeschichtliche Konservierung wichtiger Signaltransduktionswege zwischen *C. elegans* und Säugetieren, inklusive des Menschen, erlaubt die Untersuchung z. B. von

Alterungsprozessen und Mechanismen der Stressresistenz. Hierbei ist die hohe Homologie krankheitsrelevanter Gene der Menschen zu Gensequenzen des Nematoden (ca. 65 %) von großer Bedeutung für die Forschung (Corsi 2006).

Die kurze Generationszeit, die geringe Größe (adulte Hermaphrodite sind nur ca. 1 mm groß) und die leichte Vermehrung und Kultivierung im Labor sind bedeutende Vorteile für den Modellorganismus in Hinsicht auf biologische Fragestellungen. Durch den kurzen Lebenszyklus (3 – 4 Tage bei 20 °C) ist das Tier sehr gut geeignet, genetische Grundlagen der Immunologie und der Lebensspanne zu untersuchen. Hierbei ist von Vorteil, dass *C. elegans* unterschiedliche Zelltypen wie Muskelzellen, Neuronen, Intestinalzellen und Gonaden aufweist. Ein weiterer Vorteil von *C. elegans* ist, dass die Tiere eingefroren und wieder aufgetaut werden können, wodurch eine Langzeit-Lagerung möglich ist (Corsi 2006). Hinzu kommt, dass die Kultivierung des Wurmes kostengünstig ist, er leicht physisch zu manipulieren ist und eine breite Palette an genetischen und molekularbiologischen Methoden verfügbar ist. Durch die Transparenz und den einfach strukturierten Körperbau von *C. elegans* ist es möglich jede individuelle Zelle mittels Nomarski-Optik zu beobachten und die Entwicklung zu verfolgen (Schnabel *et al.* 1997, Sulston *et al.* 1983). Die Möglichkeit in den Organismus hineinzuschauen bietet die Chance fluoreszierende Reporterproteine, wie das grün fluoreszierende Protein (GFP) zur Markierung von Zellen, im lebenden Organismus zu nutzen (Chalfie *et al.* 1994). Gleichzeitig können Zellbestandteile wie DNA oder Mitochondrien mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und analysiert werden. Neben der gut zu analysierenden Morphologie und Entwicklung besitzt *C. elegans* ein relativ kompaktes Genom, das seit 1998 komplett sequenziert ist (*C. elegans Sequencing Consortium* 1998).

Für *C. elegans* steht eine Vielzahl experimenteller Methoden zur Verfügung, wie Klonierung und Charakterisierung von Genen (*Genomics*) und Proteinen (*Proteomics*) (Bargmann 2001). Das diözische Befruchtungssystem der Nematoden bietet einen weiteren Vorteil für genetische Analysen. Durch die Selbstbefruchtung der Hermaphroditen entstehen genetisch identische Nachkommen, wodurch homozygote Mutationen ohne Paarung erzeugt werden können. Männliche Tiere können für genetische Kreuzungen verwendet werden (Brenner 1974, Corsi 2006). Ebenso erlaubt der Modellorganismus Analysen nach dem klassischen Weg. Hierbei wird die normale Entwicklung eines Organismus erst durch die Analyse des Phänotyps wie die Veränderung der Lebensspanne oder Anomalitäten in der Häutung bzw.

Bewegung einer Mutante studiert und anschließend das mutierte Gen identifiziert (*forward genetics*). Bei reversen genetischen Methoden (*reverse genetics*) wird ein beliebiges Gen durch gezielte Mutation inaktiviert und anschließend der Phänotyp analysiert. Beispiele dieser reversen Methoden sind *Knockout*, RNA vermittelte Interferenz (RNAi) oder mutagen-induzierte Produktion von Deletionsallelen (Fadok *et al.* 2000, Su *et al.* 2002).

1.2 Das Immunsystem von *C. elegans*

Organismen haben unterschiedliche Abwehrmechanismen entwickelt, um sich gegen ubiquitär vorkommende Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten zu schützen und so zu überleben. Mikroorganismen und Nematoden interagieren co-evolutionär seit mehr als 600 Millionen Jahren, wodurch sich eine Abwehr in Nematoden evolutionär konservierte hat. Dieses bildet das so genannte angeborene Immunsystem, während ein spezifisches Immunsystem, wie z. B. die Bildung von Antikörpern in Vertebraten, in *C. elegans* nicht existent ist. Umgekehrt haben Vertebraten wie der Mensch, ebenso wie seine Invertebraten-Vorgänger, auch ein angeborenes Immunsystem (Salzet 2001, Medzhitov und Janeway 1997, Hoffmann *et al.* 1999).

Sobald ein Krankheitserreger in den Wirtsorganismus eindringt, wird dieser unmittelbar durch die angeborene Immunreaktion bekämpft, die aufgrund der Bindung des Erregers an spezifische Rezeptoren ausgelöst wird. Da die Krankheitserreger in sehr heterogenen und zahlenmäßig äußerst umfangreichen Gruppen vorkommen und zudem eine hohe Mutationsrate aufweisen, ist es wichtig, dass das angeborene Immunsystem bzw. dessen Rezeptoren nicht jedes mögliche Antigen sondern nur wenige hoch konservierte Antigenstrukturen erkennen. Diese hochkonservierten Strukturen finden sich in den meisten Pathogenen wieder (Medzhitov und Janeway 2000) und werden als so genannte *Pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet. Sie sind chemisch sehr unterschiedlich, weisen aber gemeinsame Funktionen auf: Sie werden beispielsweise nicht von dem Wirt sondern nur durch die Mikroorganismen gebildet; für letztere sind sie essentiell sowohl für die Pathogenität als auch für deren Überleben (Hoffmann *et al.* 1999, Medzhitov und Janeway 2000). Wahrgenommen werden sie durch sogenannte *Pattern recognition receptors*

(PRRs; mustererkennende Rezeptoren), die auf verschiedenen Zelltypen zu finden sind, so dass eine zellspezifische Immunantwort möglich ist. Die wenigen evolutionär konservierten PRRs werden gemeinsam auf einer Zelle exprimiert (Janeway und Medzhitov 2002), weshalb eine im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem schnelle Immunantwort, ohne vorhergehende Proliferation, möglich ist (Medzhitov und Janeway 2000).

1.2.1 Immunologische Stressantwort in *C. elegans*

Aufgrund der evolutionär konservierten angeborenen Immunantwort und hieraus resultierenden Homologien zu höheren Organismen, bietet *C. elegans* als Modellorganismus eine sehr gute Möglichkeit diese Abwehrmechanismen zu untersuchen.

Der Invertebrate *C. elegans* ist in seiner Umwelt natürlichen Mikroorganismen ausgesetzt. Die im Erdboden vorkommenden Bakterien dienen zum einen als Nahrung, zum anderen können diese jedoch Pathogene darstellen. Demnach ist es für den Nematoden wichtig, ein robustes Abwehrsystem entwickelt zu haben (Irazoqui und Ausubel 2010, Sifri *et al.* 2005).

Es existieren fünf charakteristische Mechanismen, die von Mikroorganismen genutzt werden, um Nematoden zu infizieren (Sifri *et al.* 2005):

1. Infektion durch intestinale Kolonisierung

Bei einer intestinalen Kolonisierung infektiöser pathogener Keime, zu welchen die meisten humanen Pathogene zählen, akkumulieren diese im Intestinum adulter *C. elegans*. Die Akkumulation verursacht eine Erweiterung des Intestinaltrakts und führt so innerhalb von 2 - 5 Tagen zum Tod. Dieser langsam verlaufende Tötungsprozess wird als *Slow-Killing* bezeichnet. Im Gegensatz zu adulten Tieren werden in Larven keine intakten Bakterien im Lumen detektiert, da diese durch eine effektivere Pumpaktivität des Grinders zerstört werden.

2. Persistente Infektion

Während einer intestinalen persistenten Infektion akkumulieren die Bakterien im Intestinaltrakt und darüber hinaus bedingen sie durch Adhäsion an spezifische Rezeptoren

einen schnellen Tod. Beispiele für diese Art der Infektion stellen *S. enterica*, *E. faecalis* und *S. marcescens* dar.

3. Invasion

Eine intestinale Invasion wurde bislang nur für wenige Pilze beschrieben. Vermutlich besitzt *C. elegans* eine sehr gute Abwehr gegenüber mikrobieller Invasion, welche z. B. durch *Drechmeria coniospora*, *Streptomyces albireticuli* induziert wird.

4. Biofilm-Bildung

Mittels Biofilm-Bildung formen Bakterien eine Matrix über den Pharynx und die Kutikula wird kolonisiert. Hierdurch wird eine normale Nahrungsaufnahme verhindert (Beispiele: *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia pestis*).

5. Toxin-medierte Tötung

In diesem Mechanismus ist die Produktion von diffusionsfähigen Toxinen involviert. Hierfür ist eine Akkumulation intakter Bakterien nicht zwingend. Wenn kleine, diffusionsfähige Metabolite produziert werden, wird dies als *Fast-Killing* bezeichnet, da der Wurm innerhalb des ersten Tages stirbt. Die toxischen Metabolite können u. a. auch durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wirken. Eine Toxin-medierte Tötung wird z. B. durch *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* und *E. faecum* verursacht.

Physiologische Barrieren in *C. elegans*

Wie in Vertebraten funktioniert die angeborene Immunantwort auch in *C. elegans* über eine transkriptionelle Regulation von Abwehr-Genen (Irazoqui und Ausubel 2010, Sifri *et al.* 2005, Pujol *et al.* 2001). So induziert DAF-16, ein Transkriptionsfaktor der *Forkhead*-Familie (FOXO), z. B. die Transkription verschiedener Immun-Effektor-Proteine des angeborenen Immunsystems, wie Lysozyme und antimikrobielle Peptide (Schulenburg *et al.* 2007). *C. elegans* besitzt 15 Lysozyme sowie 21 antimikrobielle Caenacine und Neuropeptid-ähnliche Proteine. Diese sind an der direkten Pathogen-Abwehr beteiligt, indem sie mikrobielle Zellwände zerstören (Leippe 1999). Andere Effektor-Proteine sind an Reparaturmechanismen beteiligt. So kann ein übermäßiger Stress im endoplasmatischen Retikulum, ausgelöst durch Pathogene, durch Akkumulation missgefalteter Proteine eine terminale *Unfolded protein response* (UPR) induzieren, die zur Apoptose führt. Eine weitere

Funktion bestimmter antimikrobieller Peptide besteht in der Protektion gegenüber ROS. So werden durch eine Translokation von DAF-16 in den Zellkern Gene transkribiert, die für antioxidativ wirksame Enzyme wie die Superoxid-Dismutase (SOD) oder Katalase kodieren (Partridge *et al.* 2010).

Die Signalwege, die zur Induktion der Effektor-Proteine des angeborenen Immunsystems führen, werden in Abbildung 1.3 schematisch zusammengefasst. Hierbei scheinen sieben Signalwege und zwei Faktoren für die Immunantwort in *C. elegans* hauptverantwortlich, die durch spezifische Proteine bzw. Rezeptoren aktiviert werden. Diese sind der *Transforming growth factor* (TGF- β), der *Insulin-like receptor* (ILR), der *Toll-like receptor* (TLR), die p38 *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK), eine *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), die Transkriptionsfaktoren GATA (*globin transcription factor*) und HSF (*heat shock factor*), sowie Rezeptoren des programmierten Zelltodes (*programmed cell death*, PCD) (Schulenburg *et al.* 2008).

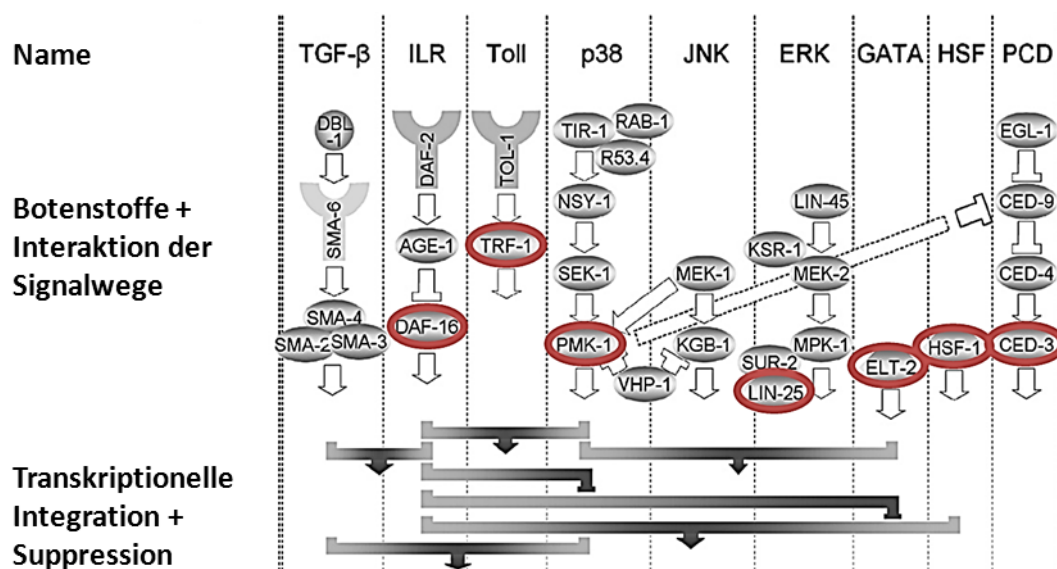


Abbildung 1.3 Immunantwort in *C. elegans* (modifiziert nach Schulenburg *et al.* 2008).

Die Signalkaskaden interagieren auf transkriptionaler Ebene miteinander. Mit dieser Interaktion geht eine gegenseitige Aktivierung (Pfeile) oder Hemmung (Balken) der Immunantwort einher. Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine des angeborenen Immunsystems von *C. elegans* sind durch die farbliche Markierung gekennzeichnet.

Ein Vorteil von *C. elegans* ist, dass er verschiedene Gewebetypen besitzt, die durch verschiedene Pathogene infiziert werden können. Die gewebespezifischen Immunantworten

werden im Folgenden beschrieben, da sie die Grundlage einer komplexen Kommunikation zwischen den Organen und damit der systemischen Immunantwort bilden.

Pharynx

Der Pharynx spielt in *C. elegans* nicht nur in der physikalischen Abwehr eine wichtige Rolle, er ist auch ein reaktives Gewebe, das mit der Umwelt interagiert. Letzteres spiegelt sich in der pharyngealen Expression antimikrobieller Lysozyme wider, die eine mikrobielle Kolonisierung unterdrücken (Partridge *et al.* 2010). Pharyngeale Infektionen mit *S. enterica* sind in *ced-1*- und *tol-1*-Mutanten signifikant lebensverkürzend. In *ced-1*-Mutanten ist der UPR-Stoffwechselweg (*unfolded proteins*), ein hochkonservierter zellulärer Prozess, der die Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum reguliert, eingeschränkt. Hierdurch wird die Immunabwehr offenbar gehemmt. CED-1 funktioniert möglicherweise als Pathogen-Erkennungs-Rezeptor. Alternativ kann er auch Zellschäden erkennen und hiermit einhergehend UPR induzieren, um die Renaturierung von Proteinen zu initiieren. *Tol-1*-Mutanten besitzen eine leicht reduzierte Induktion antimikrobieller ABF-2 Peptide und des Hitzeschockproteins HSP-16.41 und weisen eine verminderte Infektionstoleranz auf (Irazoqui und Ausubel 2010, Tenor und Aballay 2008, Haskins *et al.* 2008).

Coelomocyten

In *C. elegans* ist zwar kein zirkulierendes System mit ausgebildeten Phagocyten vorhanden, aber er besitzt Phagocyten, die sich im Pseudocoelom befinden. Die drei Coelomocyten-Paare sind sogenannte *Scavenger*-Zellen, die pseudocoelomische Flüssigkeit konstitutiv endocytieren. Ob sie auch Mikroorganismen phagocytieren ist unklar, ebenso wie der genaue Zusammenhang zu immunologischen Funktionen (Irazoqui und Ausubel 2010, Fares und Greenwald 2001).

Intestinales Epithelgewebe

Viele Mikroorganismen werden durch den *Grinder* im Pharynx zerstört, einige Pathogene gelangen jedoch intakt in den Intestinaltrakt adulter Tiere, wo sie akkumulieren, sich exponentiell vermehren und Schäden durch freigesetzte Toxine verursachen. Bakterielle und fungale Pathogene infizieren so den Darm von *C. elegans* und führen durch Kollabieren der

intestinalen Epithelzellen zum Tod. Daher stellt das Intestinum das wichtigste immunologische Organ dar. Um einer Infektion entgegen zu wirken hat *C. elegans* verschiedene Erkennungsmechanismen entwickelt, durch die er intestinale Infektionen lokalisieren und anhand unterschiedlicher Signalwege auf verschiedene Pathogene reagieren kann (Abbildung 1.3). Diese intestinale Immunantwort wird hauptsächlich über den Insulin/Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor(IGF)-Signalweg (ILS), die p38 MAP-Kinase-Kaskade und den TGF- β -Weg reguliert (Partridge *et al.* 2010, Irazoqui und Ausubel 2010).

Der DAF-2/DAF-16-ILS kann neben seiner wichtigen Rolle in der Entwicklung zur Dauerlarve (Ogg *et al.* 1997) und der Regulierung der Lebensspanne (Tissenbaum und Ruvkun 1998) als Schlüsselsignalweg des intestinalen Immunsystems betrachtet werden. Der Transkriptionsfaktor DAF-16 befindet sich in *C. elegans* stromabwärts des Insulin/IGF-1-Rezeptors DAF-2. Bei Fehlen der Insulin/IGF-Signale transloziert DAF-16 in den Nukleus, was zu einer erhöhten Transkription Stress-responsiver Gene führt. Diese Gene kodieren z. B. die SOD, Katalase oder kleine Hitzeschockproteine wie HSP-16.2. Weiterhin wird die Expression vieler immunaktiver Komponenten, wie der Lysozyme oder antimikrobieller Peptide, durch den DAF-2-Signalweg reguliert (Murphy *et al.* 2003). *Daf-2*-Mutanten zeigen eine erhöhte Resistenz sowohl gegen Gram-negative als auch gegen Gram-positive Bakterien (Garsin *et al.* 2003). Pathogene bemühen sich, solche Mechanismen zu beeinflussen, um das eigene Überleben zu sichern. Das pathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* besitzt beispielsweise die Fähigkeit die Signale über DAF-2 zu aktivieren und somit DAF-16 zu inhibieren. Dies resultiert in einer verminderten Transkription immunologischer Gene (Partridge *et al.* 2010).

Der zweite wichtige intestinale Abwehrmechanismus ist die p38 MAP-Kinase-Kaskade NSY-1/SEK-1/PMK-1 (Aballay *et al.* 2003). Sie wird beispielsweise bei Zellschäden, die durch das Poren-bildende Toxin von *Bacillus thuringiensis* entstehen, aktiviert (Partridge *et al.* 2010). Ein weiterer wichtiger Mediator in der angeborenen intestinalen Immunabwehr gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien stellt der G-Protein gekoppelte FSHR-1 (*follicle-stimulating hormone receptor*) dar (Powell *et al.* 2009). Dieser Rezeptor interagiert mit dem p38 MAPK-Weg. Diese Interaktion liegt darin begründet, dass Gene, die durch FSHR-1 reguliert werden, auch im p38 MAPK-Signalweg integriert sind (Partridge *et al.*

2010). Die spezifische Involvierung von FSHR-1 in der Immunabwehr ist noch unklar, er könnte beispielsweise PAMPs binden (Irazoqui und Ausubel 2010).

Der dritte essentielle Signalweg in der intestinalen Immunabwehr ist TGF- β vermittelt und reguliert beispielsweise die Antwort auf eine *Serratia marcescens*-Infektion (Mallo *et al.* 2002). Möglicherweise interagiert der TGF- β -Ligand DBL-1 mit dem Nervensystem, um intestinal die Transkription antimikrobieller Gene zu induzieren (Partridge *et al.* 2010).

Neben den drei Hauptsignalwegen erfüllt der GATA-Transkriptionsfaktor ELT-2 ebenfalls eine wichtige immunologische Aufgabe in intestinalen Zellen. ELT-2 wird für die Induktion verschiedener Immuneffektor-Gene, deren Promotoren viele GATA-Motive besitzen, in den intestinalen Zellen benötigt (Shapira *et al.* 2006). Ein *elt-2-Knock-down* führt unter Exposition gegenüber *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *Enterococcus faecalis* oder *C. neoformans* zu einer verminderten Lebensspanne (Kerry *et al.* 2006).

Epidermis

Die Epidermis von *C. elegans* ist ein aktives Immunorgan. Eine Verletzung der Epidermis, induziert mittels Nadel, Laser oder einer Infektion mit dem Pilz *Drechmeria coniospora*, bedingt eine gestörte epidermale Integrität und die Aktivierung einer Immunantwort. Zu letzterer gehören Gene, die für Neuropeptid-ähnliche Peptide (NLPs) und eine Familie der nah verwandten Caenacine (CNCs) kodieren. Der NLP- und CNC-Expression ist die PMK-1/p38 MAPK-Kaskade vorausgeschaltet (Pujol *et al.* 2008a, Pujol *et al.* 2008b). Darüber hinaus werden dem heterodimeren TGF- β -Rezeptor, den DAF-4/SMA-6-Proteinen und den stromabwärts gelegenen Signalkomponenten SMA-3/SMAD wesentliche Funktionen für die CNC-Expression zugesprochen. Während die CNC-Transkription über DBL-1/TGF- β Signale des Nervensystems eingeleitet wird (Zugasti und Ewbank 2009), erfolgt eine NLP-Induktion während eines Infektionsprozesses unabhängig vom Nervensystem (Ziegler *et al.* 2009).

Nervensystem

Das Nervensystem ist Voraussetzung für das Abwehrverhalten in *C. elegans*, welches sich in der Meidung von Bakterien, die er als Pathogen registriert hat, und Lernverhalten manifestiert. Für die Pathogen-Meidung ist das TIR-1-SEK-1-NSY-1-Modul in

chemosensorischen Neuronen verantwortlich (Shivers *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2005). Die Serotonin-Biogenese ist z. B. ein wichtiger Bestandteil des pathogen-induzierten Lernverhaltens von *C. elegans*. Während der Exposition mit *P. aeruginosa* übernehmen die Proteine NSY-1 und SEK-1 eine wichtige Funktion, indem sie im Nervensystem für die Regulation der Serotonin-Synthese benötigt werden. NSY-1 und SEK-1 sind stromaufwärts gelegene Komponenten des PMK-1/p38 MAPK Signalwegs (Irazoqui und Ausubel 2010, Shivers *et al.* 2009).

Das Nervensystem kann darüber hinaus auch direkt auf die immunologische Stressantwort Einfluss nehmen. Beispielsweise besitzen *C. elegans* Mutanten, die nicht in der Lage sind neuronal Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren zu sekretieren, eine höhere Resistenz versus einer *P. aeruginosa*-Infektion im Intestinum. Dieser Prozess wird vermutlich über den FOXO-Transkriptionsfaktor DAF-16 reguliert, da dieser aufgrund des IGF-Mangels intestinal vermehrt in den Kern transloziert und dadurch antimikrobielle Gene transkribiert werden (Kawli und Tan 2008).

Enddarm (Rektale Epithelzellen und Drüsen)

Pathogene wie *Microbakterium nematophilum* (Nicholas und Hodgkin 2004), *S. aureus* (Irazoqui *et al.* 2008) oder *Saccharomyces cerevisiae* (Jain *et al.* 2009) verursachen eine phänotypische Schwellung im Anusbereich, welche als deformierte Anal-Region (Dar) bezeichnet wird (Hodgkin *et al.* 2000). Für die mikrobielle Bindung und hieraus resultierende Schwellungen sind Zuckertransporter und Acyltransferasen verantwortlich (Gravato-Nobre und Hodgkin 2008). An dem phänotypischen Prozess sind Signalwege beteiligt, die durch Extrazellulär-regulierte Kinasen (ERK) vermittelt werden. *Forward genetic*-Untersuchungen in *dar*-Mutanten weisen nach Inkubation mit *M. nematophilum* auf die wichtige Rolle von *egl-5* beim Schwellungsprozess hin. EGL-5 wird in den rektalen Epithelzellen für die Transkription des ERK-homologen Gens *mpk-1* benötigt (Nicholas und Hodgkin 2009), darüber hinaus ist *egl-5* auch für die Induktion des Lysozyms *ilys-3* verantwortlich (Partridge *et al.* 2010). Eine *S. aureus*- und *S. cerevisiae*-Infektion in *egl-5*-Mutanten führt dementsprechend zu keinen rektalen Schwellungen, es wird jedoch eine invasive bakterielle Akkumulation im Intestinum und eine damit einhergehende Lebenszeitverkürzung induziert (Irazoqui *et al.* 2008, Nicholas und Hodgkin 2004, Jain *et al.* 2009). Rektale Drüsen

exprimieren nach *S. aureus*- und *P. aeruginosa*-Infektion immunaktive Proteine, die in das rektale Lumen abgegeben werden (Irazoqui *et al.* 2008, Alper *et al.* 2007). Weiterhin führt eine rektale Infektion mit *M. nematophilum* zu einer vermehrten Transkription antimikrobieller Gene wie *clec-60* in den *posterior* gelegenen intestinalen Zellen (O'Rourke *et al.* 2006). Diese Befunde lassen eine Kommunikation zwischen intestinalem und rektalem Gewebe vermuten.

1.2.2 *P. luminescens* als Modellpathogen für *C. elegans*

Photorhabdus luminescens (*P. luminescens*) ist ein Gram-negatives Bakterium der Familie der *Enterobacteriaceae* (Fischer-Le Saux *et al.* 1999). Das Bakterium kann einerseits in einer intestinalen Symbiose entomopathogener Nematoden leben. Es zeigt andererseits aber auch den gegenteiligen Effekt, indem es eine hohe Pathogenität gegenüber Insekten und Nematoden aufweist. *P. luminescens* befällt Nematoden natürlicherweise während des *infective-juvenile*-Stadiums. In diesem durchläuft das Bakterium einen speziellen Entwicklungszyklus (Clarke 2008). Nach der intestinalen Infektion mit *P. luminescens* dienen die Nematoden als Vektor für die Übertragung der entomopathogenen Bakterien auf Insekten, ihren eigentlichen Wirt (Goodrich-Blair und Clarke 2007). Nachdem die Insekten die infizierten Nematoden aufgenommen haben, gelangt *P. luminescens* durch Regurgitation in deren Hämolymphe und somit in den Darmtrakt, wo sie sich exponentiell vermehren (Ciche und Ensing 2003). Hierbei werden Toxine und andere, das Gewebe schädigende Moleküle, freigesetzt, die die Lebensspanne von Insekten signifikant verkürzen (Goodrich-Blair und Clarke 2007).

In *C. elegans* wirkt *P. luminescens* stark pathogen, indem es dessen Entwicklung, Reproduktivität und Lebensspanne beeinträchtigt. Ist *C. elegans* während der Entwicklung *P. luminescens* ausgesetzt, sterben die Larven meist vor Erreichen des L4-Stadiums. Diese pathogenen Effekte sind bei Hitze-inaktivierten Bakterien nicht mehr zu beobachten, weshalb das Vorkommen hitze-instabiler Toxine in *P. luminescens* anzunehmen ist. Es wird angenommen, dass es sich dabei um nematizide Komponenten handelt, welche durch *toxin complex (tc)*-Gene kodiert werden. Zwei pathogene Komplexe sind bekannt: *tca* und *tcd*.

Der für *C. elegans* pathogene *P. luminescens* Stamm TT01 enthält die gesamte Gensequenz für *tcd* (nicht aber für *tca*), welches auf die Verantwortlichkeit von *tcd* für die Toxizität in den Nematoden hinweist (Sicard *et al.* 2007). Aufgrund der beschriebenen immun-pathogenen Effekte von *P. luminescens*, kann dieses Bakterium als Modellpathogen intestinaler Infektion und zur Untersuchung der Stressantwort sowie der zugrunde liegenden immunologischen Signalwegen in *C. elegans* herangezogen werden.

1.3 Matrixmetalloproteasen

Gross und Lapiere entdeckten 1962 die ersten Matrixmetalloproteasen (MMPs). Sie zeigten, dass an der Involution des Kaulquappenschwanzes ein kollagenolytisches Enzym beteiligt ist, das fibrilläre Kollagene degradiert (Gross und Lapiere 1962). MMPs sind eine Familie zinkabhängiger Endopeptidasen, welche entsprechend ihrer Substratspezifität in folgende Untergruppen eingeteilt sind: Matrixine, Kollagenasen, Gelatinasen und Stromelysine. Bislang sind in Vertebraten 25 MMPs bekannt, wobei 23 beim Menschen mit analogen Funktionen nachgewiesen wurden (Woessner 2002). Die MMP-Familie erstreckt sich über das gesamte Pflanzen- und Tierreich, so sind sie auch in Invertebraten wie Süßwasserpolyphen (*Hydra spec.*, Leontovich *et al.* 2000), Taufliegen (*Drosophila melanogaster*; Llano *et al.* 2000), *C. elegans* (Page-McCaw *et al.* 2003) oder der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*; Maidment *et al.* 1999) nachzuweisen. Ihr ubiquitäres Auftreten ist ein Beleg für die evolutionäre Konservierung der Gensequenz (Page-McCaw *et al.* 2003).

MMPs spielen eine wichtige Rolle beim Abbau der extrazellulären Matrix (ECM, *extra cellular matrix*), deren zeitnahe Abbau essentiell für Morphogenese, Reproduktion, sowie Erneuerung und Resorptionsfähigkeit von Geweben (*Remodeling*) ist (Woessner 2002, Nagase und Woessner 1999). MMPs sind somit maßgeblich an Prozessen der Embryonalentwicklung, des Wachstums und der Wundheilung beteiligt. Die Mechanismen des Immunsystems werden ebenfalls durch MMPs beeinflusst, indem Wachstumsfaktoren, Zytokine und Zelloberflächenrezeptoren durch Proteolyse aktiviert werden (Altincicek und Vilcinskas 2008).

Jedoch kann die exzessive Proteolyse durch MMPs auch an einer Vielzahl pathologischer Vorgänge beteiligt sein, wie z. B. bei der rheumatischen Arthritis, Parodontose oder Karzinogenese (Shapiro 1998). Insbesondere bei der Tumorinvasion, Metastasierung und Angiogenese ist eine Abhängigkeit zu einer MMP vermittelten Degradation der ECM gegeben (Basset *et al.* 1997, Johnsen *et al.* 1998). Die Verbindung von MMPs und Krankheiten ist allerdings komplex. Eine erhöhte MMP-Aktivität kann die Tumorprogression induzieren oder aber auch inhibieren, indem sie nicht nur die Matrix degradieren, sondern auch membrangebundene Faktoren freisetzen, die autokrin oder parakrin auf das Wachstum, den Tod und die Migration der Zellen wirken können (Coussens 2002).

1.3.1 Struktur der Matrixmetalloproteasen

Aufgrund des phylogenetisch jungen evolutionären Ursprungs weisen alle MMPs eine gemeinsame Basisstruktur auf (Abbildung 1.4). Diese besteht aus einer N-terminalen Sequenz, einer Propeptiddomäne und einer katalytischen Domäne mit einer hochkonservierten zinkbindenden Region (Sternlicht und Werb 2001, Nagase und Woessner 1999).

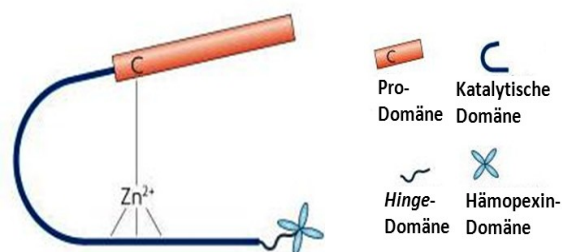


Abbildung 1.4 Grundstruktur der MMPs (modifiziert nach Page-McCaw *et al.* 2007).

Schematische Darstellung der konservierten Domänenstruktur von MMPs. Abgebildet sind: Prodomäne, katalytische Domäne, Hinge-Domäne und Hämopexin-Domäne.

MMPs werden als Präproenzyme synthetisiert und als inaktive Proenzyme (Zymogene) sekretiert, deren Aktivierung extrazellulär erfolgt. Die Propeptiddomäne besitzt eine konservierte Sequenz, den *Cystein-Switch*, dessen Cysteinrest das katalytische Zinkion bindet. Die katalytische Domäne besteht aus einem fünffach verdrillten β -Faltblatt, drei α -Helices und mehreren Schleifen. Neben dem Zinkmotiv enthält sie ein konserviertes Methionin, ein zusätzliches strukturelles Zinkion sowie 2 - 3 Calciumionen, die für Stabilität

und Expression der enzymatischen Aktivität benötigt werden. Zur Aktivierung der MMPs wird die Propeptidomäne durch Proteolyse abgespalten (Vu und Werb 2000, Nagase und Woessner 1999).

1.3.2 Wirkmechanismen und Regulierung der Matrixmetalloproteasen

Die Hauptaufgabe der MMPs besteht in der Degradation der ECM-Komponenten. Neuere Studien implizieren jedoch eine Vielzahl weiterer Funktionen auf zellulärer Ebene. Durch die proteolytische Aktivität wird Platz für die Migrationen von Zellen und Geweben geschaffen sowie Spaltprodukte mit biologischer Aktivität generiert, die in parakrinen oder autokrinen Signalen resultieren. Durch Spaltung interzellulärer Verbindungen wird die epitheliale Gewebestruktur direkt durch MMPs reguliert. Über die Aktivierung, Inaktivierung und Modifizierung von Signalmolekülen vermitteln MMPs eine Vielzahl zelluläre Prozesse, darunter die Proliferation von Zellen, den programmierten Zelltod, sowie die Zelldifferenzierung und Zellmortalität (Page-McCaw 2003, Sternlicht und Werb 2001).

Neben den beschriebenen Funktionen ist die proteolytische Aktivität der MMPs sowohl für die Aktivierung als auch die Hemmung der Immunantwort von Bedeutung. Durch Degradation immunologisch aktiver Faktoren wie Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktor-Vorstufen, sowie durch die Abspaltung gebundener immunaktiver Faktoren beeinflussen MMPs die Signalkaskaden der Stressantwort (Altincicek und Vilcinskas 2008). Die Hemmung der antigenvermittelten Aktivierung des Komplementsystems bei humanen Tumorerkrankungen wurde 2002 von Gearing *et al.* beschrieben. MMPs sind in der Lage, die antigenbindende Domäne der Immunglobulin-G-Familie zu spalten und auf diese Weise die Funktion der Immunglobuline zu inhibieren. Alincicek und Vilcinskas (2008) konnten eine Beeinflussung des angeborenen Immunsystems durch MMPs in Insekten belegen. Eine bakterielle Infektion führte in der Motte *Galleria mellonella* zu einem vermehrten Kollagenabbau durch immunologisch aktive Hämocyten.

Die Regulierung der MMPs erfolgt auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene. Die MMPs werden transkriptionell durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Toxine, physischen Stress und zelluläre Veränderungen aktiviert. Das Ausschalten der Gene erfolgt über

suppressive Faktoren wie TGF- β , Retinsäuren und Glukokortikoiden. Die proteolytische Aktivität der MMPs ist durch ihre Vorläuferenzyme streng kontrolliert. Inhibiert werden MMPs durch endogene Moleküle wie α -Makroglobuline und *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs), die das höchste Suppressionspotential besitzen. Bisher sind vier homologe Vertreter der TIMPs beschrieben, deren inhibierende Wirkung durch Bindung an das katalytische Zentrum der MMPs vermittelt wird (Sternlicht und Werb 2001, Nagase und Woessner 1999). Eine Imbalanz zwischen MMPs und TIMPs führt zu einem beschleunigten Abbau der ECM und trägt so zu Entzündungsprozessen, chronisch-degenerativen Erkrankungen und der Tumordinvasion bei (Gomez *et al.* 1997).

1.3.3 Matrixmetalloproteasen (ZMPs) in *C. elegans*

C. elegans besitzt sechs MMP-kodierende Gene, deren Bezeichnung sich von den Zinkmetalloproteasen (ZMP) ableitet: *zmp-1* (EGAP1.3), *zmp-2* (H19M22.3), *zmp-3* (C31B8.8), *zmp-4* (T21D11.1), *zmp-5* (H36L18.1) und *zmp-6* (W09D12.1), wobei die Namen in Klammern den systematischen Bezeichnungen des *C. elegans*-Genomprojektes entsprechen (Ahringer Library). Jedes dieser Gene weist Ähnlichkeiten zu humanen MMP-Genomsequenzen auf (Nagase und Woessner 1999). Zwei der sechs für ZMPs kodierenden Gene in *C. elegans* - *zmp-1* und *zmp-2* - sind funktionell charakterisiert. ZMP-1 ist bei der postembryonalen Vulvaentwicklung beteiligt. Nematoden besitzen so genannte Ankerzellen, die spezialisierte uterine Zellen darstellen und für die Vulvaentwicklung entscheidend sind. Um die Eiablage zu ermöglichen müssen die zunächst unabhängig entwickelten uterinen Zellen und Vulva-Zellen durch diese Ankerzellen verbunden werden (Sherwood und Sternberg 2003). Letztere exprimieren den AP-1 Transkriptionsfaktor *fos-1*, der für folgende Gene die Expression reguliert: *zmp-1* (GPI-verankerte MMP), *cdh-3* (Protocadherin) und *him-4* (Protein der Fibulin Familie der ECM-Proteine). Bei einer zeitgleichen Deletion der drei Gene kommt es zu einer defekten Invasion der Ankerzellen und somit zu Defekten in der Eiablage bei 25 % der Tiere (Sherwood *et al.* 2005).

ZMP-2 wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Kooperation der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Wenzel und Prof. Dr. Vilcinskas funktionell charakterisiert. Die beschriebenen

phänotypischen Änderungen sind nur in *zmp-2* defizienten Nematoden zu beobachten, im Vergleich zu anderen in *C. elegans* vorkommenden ZMPs (ZMP-1/3-6) (Altincicek *et al.* 2010). ZMP-2 spielt in *C. elegans* eine essentielle Rolle beim Wachstum und bei der Entwicklung. Wird beispielsweise eine *zmp-2*-RNAi durchgeführt, führt dies zu einer verzögerten Entwicklung der Larve zum adulten Tier und zu Häutungsdefekten, welche die direkte oder regulative Rolle von ZMP-2 bei der Degradation der ECM während der Ecdysis aufzeigen. Viele Tiere verharren im L2-Larvenstadium und setzen ihre Entwicklung nicht fort, vermutlich verursacht durch Defekte in der Häutung. Diese durch *zmp-2*-RNAi verursachten Dauerlarven haben eine geringere *Grinder*-Pumpaktivität und stoppen die Nahrungsaufnahme, die Kutikula ist härter und bildet eine feste Schale um die Larven. Die Larven brauchen deutlich länger für die Entwicklung und um sich zu häuten. Des Weiteren ist ZMP-2 wichtig bei der Fortbewegung und der Reproduktion, da Würmer mit *zmp-2*-*Knock-down* sowohl eine verminderte Bewegung als auch eine geringe Nachkommenschaft aufweisen. Neben der geringeren Reproduktivität *zmp-2* defizienter Hermaphroditen, weisen die adulten Tiere eine zur Kontrolle signifikant verkürzte Lebensspanne auf. Diese *zmp-2*-RNAi induzierte Verkürzung der Lebensspanne könnte durch oxidative Modifikationen verursacht sein, da ZMP-2 Zink bindet und somit eine Metallionen-katalysierte ROS-Bildung unterbindet. Weiterhin könnte eine *zmp-2*-Defizienz eine Veränderung proteolytischer Prozesse der extrazellulären Matrix bedingen, welche die Lebensspanne beeinträchtigt (Altincicek *et al.* 2010).

1.4 Vitellogenine

1.4.1 Vitellogenine verschiedener Modellorganismen

In der Hämolymphe der Seidenspinner *Hyalophora cecreopia* wurde erstmals ein Weibchenspezifisches Protein entdeckt und 1954 durch Tefler als Bestandteil der Eidotterbildung identifiziert. In den Oozyten aller eierlegenden Spezies akkumulieren erhöhte Mengen an Eidotter, um die Nachkommen mit essentiellen Nährstoffen wie Nukleinsäuren, Proteinen, Lipiden, Phosphaten, Kohlenhydraten, Ionen und Vitaminen zu versorgen, damit eine unabhängige Entwicklung der Nachkommen gewährleistet ist (Tufail und Takeda 2009). Die

Hauptquelle dieses Weibchen-spezifischen Proteins wurde in den Fettkörperchen der *H. cecreopia* detektiert und durch Pan *et al.* (1969) als Vitellogenin bezeichnet. Die Vitellogenine sind Vorstufen der Hauptspeicherproteine in den Oozyten, den Vitellinen, und Transporter apolarer Moleküle (Tufail und Takeda 2009). In eierlegenden Vertebraten werden die Vitellogenine extraovarial in der Leber synthetisiert, im Blut transportiert und selektiv aus der Zirkulation in die heranwachsenden Oozyten aufgenommen. In Invertebraten werden die Vitellogenine im Intestinaltrakt von Hermaphroditen (Nematoden) (Kimble und Sharrock 1983) bzw. vorwiegend im Fettgewebe der Weibchen (Insekten) synthetisiert (Tufail *et al.* 2005, Tufail und Takeda 2008). In *Drosophila melanogaster* produzieren zusätzlich die Follikelzellen der Ovarien (Brenan *et al.* 1982) und hypopharyngeale Drüsen Vitellogenine (Amdam *et al.* 2003). In allen untersuchten Organismen werden die Vitellogenine proteolytisch gespalten und strukturell modifiziert (z. B. Glycosylierung, Lipidierung, Phosphorylierung), bevor die selektive Aufnahme in die Ovarien über rezeptormedierte Endozytose erfolgt (Arukwe und Goksoyr 2003, Finn und Kristoffersen 2007, Matozzo *et al.* 2008, Baker 1988). Letzterer ist ein von hormonellen Signalen der Oozyten initiiertes Vorgang (Willow 1999). Nach der endocytotischen Aufnahme membrangebundener Rezeptoren in die Oozyten werden die Vitellogenine mittels Cathepsin D gespalten. Die Teilproteine dienen als Reservestoffe für Lipide und Phosphate. Letztgenannte sind in der Lage Calcium und Eisen als Reserve für den Embryo zu komplexieren (Grant und Hirsh 1999, Tufail und Takeda 2009).

Vitellogenine werden gewebe-, geschlechts- und stadienspezifisch gebildet. Neben einer Östrogen-vermittelten Vitellogenin-Expression, z. B. induziert durch exogenes 17β -Östradiol, können weitere hormonelle Signale diese beeinflussen. Sequenzanalysen innerhalb verschiedener Spezies zeigen hochkonservierte Domänen (Chen *et al.* 1997, Sappington und Raikhel 1998, Lee *et al.* 2000b). Vitellogenine der Insekten besitzen beispielsweise Homologien zu Vitellogeninen von Nematoden und Vertebraten (Blumenthal und Zucker-Aprison 1987, Trewitt *et al.* 1992, Chen *et al.* 1994). Die evolutionäre Konservierung ist nicht nur in der Primärstruktur der Vitellogenin-Moleküle zu erkennen, sondern auch in einer charakteristischen superhelikalen Domäne am N-terminalen Ende und mehreren großen offenen *beta*-Faltblättern (Grant und Hirsh 1999). Das Vitellogeninmolekül besteht aus einer Phospholipiddomäne mit hohem Molekulargewicht und einem kleineren Lipoproteinanteil. Neben Aminosäuren enthalten die Vitellogenine etwa 12 % Lipide (Phospholipide und

Triglyceride), 1,5 % Phosphate, 1,6 % Calcium sowie geringe Mengen an Kohlenhydraten und Biliverdinen. Diese Bestandteile sind innerhalb des Moleküls heterogen verteilt (Grant und Hirsh 1999, Redshaw und Follett 1971). Der Ca^{2+} -Anteil dient neben dem Nährstoffaspekt der Neutralisierung des, aufgrund des hohen Phosphoranteils, negativ geladenen Moleküls. Im Cytoplasma der Eizellen liegen die Vitellogenine in granulären Speicherorganellen vor (Tata 1976, Redshaw und Follett 1971).

Studien implizieren, dass das Phosphoglycolipoprotein Vitellogenin nicht nur ein für Weibchen spezifisches Eidotterprotein eierlegender Tiere ist, sondern in geringen Mengen auch in männlichen Organismen exprimiert wird (Engelmann 1979, Trenczek und Engels 1986, Valle 1993, Piulachs *et al.* 2003). In der Honigbiene *Apis mellifera* kommen z. B. Vitellogenine auch in Arbeiterbienen, die keine Eier legen, vor (Münch und Amdam 2010). Weiterhin werden die für Vitellogenine kodierenden Gene sowohl in Weibchen als auch in Männchen von adulten Fischen und Seeigeln im Intestinum und in den Gonaden exprimiert (Glinski und Jarosz 2000). Diese Befunde lassen vermuten, dass die Vitellogenine neben der klassischen Funktion als Nährstoff- und Energielieferanten für die Entwicklung der Embryonen weitere biologische Funktionen in adulten Tieren beider Geschlechter besitzen.

1.4.2 Funktionelle Bedeutung der Vitellogenine

Vitellogenine sind neben der Funktion als Nährstoffquelle als cholesterolbindende Proteine identifiziert worden (Matyash *et al.* 2001). Homologien der Nematoden-Vitellogenine finden sich zum humanen Apolipoprotein-B-100 (ApoB-100), einem Transportprotein für Cholesterol und Triglyceride im Blut (Baker 1988). Hieraus wird zusätzlich zur Cholesterol-Transportfunktion ein Einfluss auf die Lebensspanne erkennbar, da ein gestörter Fettstoffwechsel mit einem Atherosklerose-Risiko und hiermit einhergehend mit der Lebenserwartung assoziiert wird. Einen Einfluss auf die Lebensspanne kann ebenfalls in der Honigbiene *A. mellifera* beobachtet werden, in welcher die Vitellogenine u. a. in der gustatorischen Responsivität und der hormonellen Regulation involviert sind (Tong *et al.* 2009). Auch wenn die Vitellogenine keine klassischen endokrinen Faktoren der Honigbiene darstellen, können sie möglicherweise als Signalmoleküle die Langlebigkeit modulieren, da

sie negativ mit dem juvenilen Hormon (JH) korreliert sind (Zhang *et al.* 1993). Letzteres ist ein lebensverkürzendes und alterungsförderndes Hormon in Insekten (Flatt *et al.* 2005). Möglicherweise ist das reziproke Verhältnis von JH und den Vitellogeninen auf den ILS zurückzuführen (Münch und Amdam 2010, Amdam *et al.* 2004). Weiterhin werden Vitellogenine vermehrt in langlebigen adulten Honigbienen-Königinnen, auch in den Perioden, in denen sie keine Eier legen, synthetisiert (Engels und Fahrenhorst 1974, Fluri *et al.* 1981, Engels *et al.* 1990). Außerdem werden Vitellogenine in langlebigen Arbeiterbienen, im Gegensatz zu kurzlebigen Futtersammlern, akkumuliert (Fluri *et al.* 1982, Nelson *et al.* 2007). Für die kausale Beziehung zwischen der Vitellogenin-Aktivität und der Lebensspanne in Honigbienen (Amdam und Omholt 2002, Goto *et al.* 1999, Quinlan *et al.* 2005) bietet die Zink-bindende, antioxidative Kapazität der Proteine (Amdam *et al.* 2004) eine weitere Erklärung. Die pleiotropen Funktionen der Vitellogenine zeigen sich auch darin, dass sie in Honigbienen nicht nur das Altern von Arbeiterbienen durch antioxidative Kapazität verzögern, sondern auch das Verhalten der Bienen beeinflussen. Dies wird durch das Sammeln proteinreicher Pollen im Anschluss an die Vitellogenin-Expression erkennbar (Nelson *et al.* 2007). Weiterhin lassen sich Einflüsse von Vitellogeninen auf das Immunsystem in Honigbienen beschreiben. In diesem Zusammenhang wird eine geringe Vitellogenin-Expression mit immunsuppressiven Effekten assoziiert (Amdam *et al.* 2003). Der funktionelle Einfluss der Vitellogenine auf das Immunsystem zeigt sich auch in den *Echinodermata*, in denen Vitellogenine in der Hämolymphe präsent und Teil des humoral-basierten Abwehrsystems gegen mikrobielle Invasion sind (Glinski und Jarosz 2000). In verschiedenen Fischarten sind Vitellogenine als Erkennungsmoleküle beim Zerstören bakterieller Pathogene involviert (Zhang *et al.* 2011). Neuere Studien belegen, dass Fisch-Vitellogenine als multivariante, mustererkennende Moleküle fungieren, die Komponenten wie Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycan (PGN), Lipoteichonsäure (LTA) und Glucane erkennen. Weiterhin agieren sie als Oponine, die die Makrophagen-Phagozytose erhöhen (Li *et al.* 2008, Liu *et al.* 2009). Serum-Vitellogenine männlicher Prachtbarben können durch *E. coli*-Injektion erhöht werden (Shi *et al.* 2006). Ein Anstieg der Vitellogenine zeigt sich ebenfalls sowohl auf transkriptionaler als auch auf translationaler Ebene, nach Injektion von LPS und LTA in männlichen Zebrafischen (*Danio rerio*). Die immunologische Bedeutung der Vitellogenine bekräftigend, können Serum-Vitellogenine der Zebrafische *E. coli* und *S. aureus* binden und so deren Wachstum Dosis-abhängig inhibieren. Diese Befunde lassen vermuten,

dass das Serum-Vitellogenin ein Akute-Phase-Protein mit bakterieller Bindungs- und Inhibierungsaktivität ist (Tong *et al.* 2009).

Der stärkste Induktor der Vitellogenine scheint das endogene Östrogen 17 β -Östradiol zu sein (Zlábek *et al.* 2008). In Leberzellen des südafrikanischen Krallenfrosches waren pharmakologische Dosen an 17 β -Östradiol in der Lage die Vitellogenin-Transkription um mehr als das Tausendfache zu steigern (Brock und Shapiro 1983, Wolffe *et al.* 1985) und die mRNA gegenüber zytoplasmatischer Degradation zu stabilisieren (Brock und Shapiro 1983).

Zusammenfassend lassen sich für Proteine, die der Vitellogenin-Familie angehören, Funktionen als Antioxidans, als Cholesteroltransporter, in der Regulation der Lebensspanne, in der Immunität sowie im Energiereserve-Status unterschiedlichster Organismen beschreiben. Speziell in *C. elegans* sind die Funktionen der Vitellogenine jedoch weitgehend unerforscht.

1.4.3 Vitellogenine in *C. elegans*

Da die Oozyten der Nematoden geschlossene Systeme sind, müssen sie Makromoleküle und Zellstrukturen enthalten, die für die Entwicklung der Nachkommen essentiell sind. Die Hauptproteine in den Oozyten von *C. elegans* sind ebenfalls die Vitelline, welche aus dem Glycolipoproteinkomplex Vitellogenin gebildet werden (Winter *et al.* 1996). In *C. elegans* sind sechs für Vitellogenine kodierende Gene bekannt, die als *vit-1* bis *vit-6* bezeichnet werden (Blumenthal *et al.* 1984). Hierbei werden drei Subfamilien klassifiziert: VIT-1 (K09F5.2) bildet zusammen mit VIT-2 (C42.D8.2) die erste Subfamilie; VIT-3 (F59D8.1), VIT-4 (F59D8.2) und VIT-5 (C04F6.1) gehören aufgrund der Sequenzhomologie einer weiteren Subfamilie an; VIT-6 (K07H8.6) bildet die dritte Subfamilie. Jedoch sind nicht nur die Aminosäuresequenzen innerhalb der Subfamilien sehr ähnlich, auch die Aminosäuresequenzen von VIT-2, VIT-5 und VIT-6 zeigen deutliche Homologien. So besitzt die Sequenz von VIT-2 eine 22 %ige bzw. 50 %ige Identität zu den Sequenzen der VIT-6 bzw. VIT-5 Proteine. *Vit-1* ist ein Pseudogen, dessen Genprodukt zu 95 % identisch zu *vit-2* ist (Spieth *et al.* 1985a, Spieth *et al.* 1985b). Sequenzvergleiche dieser Genfamilie zeigen, dass die Vitellogenine der Nematoden näher mit den Vitellogeninen der Vertebraten verwandt

sind als mit denen der Insekten (Winter *et al.* 1996). Die Vitellogenine der Nematoden werden durch sehr kompakte Gene kodiert, die sehr wenige Introns beinhalten und werden kaum co- und posttranskriptional verändert (Spieth *et al.* 1985, Wahli *et al.* 1980, Arnberg *et al.* 1981). Die Expression der Vitellogenine von *C. elegans* beginnt in dem Stadium der Häutung der L4-Larve zum adulten Hermaphroditen im Intestinum. Die mRNA ist gleichmäßig verteilt im Intestinum adulter Hermaphroditen zu finden (MacMorris und Blumenthal 1993).

Vitellogenine von *C. elegans* sind Lipophosphoglycoproteine mit einem Lipidgehalt von 15 - 20 %, deren Proteinprozessierung unterschiedlich zu der in Vertebraten ist: Die Proteine VIT-2 bis VIT-5 in *C. elegans* besitzen eine relative Molekülmasse von 170 kDa, sie werden nicht gespalten und stattdessen intakt im Eidotter endosomal verpackt (Sharrock 1983). Für die Polypeptidketten von VIT-3 bis VIT-5 wird aufgrund ihrer Größe der Begriff yp170A definiert, die Polypeptidketten von VIT-2 werden als yp170B bezeichnet. VIT-6 wird im Pseudocoelom zu yp115 und yp88 gespalten (Sharrock 1984). Die Spaltprodukte komplexieren über Disulfidbrücken mit yp170A zu einem Heterodimer. Yp170B wird direkt als Dimer in die granulären Speicherorganellen der Oozyten aufgenommen (Sharrock *et al.* 1990). Die Vertebraten-Vitellogenine dagegen werden nach der Aufnahme in die Oozyten in Lipovitellin I, II und Phosvitin gespalten (Wahli *et al.* 1981, Wang *et al.* 1983). Die Vitellogenine der Nematoden beinhalten Sequenzen die homolog zu Vitellin I und II sind, sie besitzen jedoch keine Phosvitin-Sequenz (Spieth *et al.* 1985, Nardelli *et al.* 1987).

Rezeptor vermittelte Endocytose der Vitellogenine

Da die Nachkommen eierlegender Tiere sich ohne direkten Austausch mit dem maternalen Metabolismus entwickeln, werden große Protein- und Lipidmengen als essentielle Nahrung für die Nachkommen in den Eiern gespeichert. Synthetisiert werden die Vitellogenine im Intestinum adulter Hermaphroditen. Dort komplexieren Cholesterol und Fettsäuren an die lipidbindenden Transportproteine und werden daraufhin basolateral in das Pseudocoelom sezerniert. Anschließend muss das Lipophosphoglycoprotein spezifische Poren der gonadalen Basallamina passieren, um dann letztendlich durch die Oozyten aufgenommen zu werden (Hall *et al.* 1999, Grant und Hirsh 1999). Vitellogenine durchqueren das Pseudocoelom als freie Partikel. In die Oozyten dringen sie jedoch als membrangebundene

Granulae ein (Hall *et al.* 1999). Dieser als Endocytose bezeichnete Vorgang wurde zwischen Invertebraten wie *C. elegans* und den Vertebraten evolutionär konserviert. Der Vitellogenin-Rezeptor in *C. elegans* ist RME-2 (*receptor mediated endocytosis*), ein dem LDL-Rezeptor (*low-density* Lipoprotein Rezeptor) der Säugetiere verwandtes Protein, welches spezifisch in den Oozyten adulter Tiere und in Larven auch in Intestinalzellen exprimiert wird (Grant und Hirsh 1999, Goldstein *et al.* 1985, Schneider 1996). RME-2 wird vermehrt in der proximalen Keimbahnlinie von adulten Hermaphroditen detektiert. Der Rezeptor beinhaltet ein typisches NPXY-Internalisierungssignal in der intrazellulären Domäne, welches z. B. bei dem LDL-Rezeptor dafür bekannt ist, die Aufnahme in *Clathrin-coated pits* (CCPs) zu regulieren. Komponenten dieser CCPs und deren endosomalen Transportsystems wurden ebenfalls in *C. elegans* identifiziert (Grant und Hirsh 1999). Vitellogenin-Rezeptoren werden daher mittels CCPs auf der Oberfläche der heranwachsenden Oocyten gerichtet exprimiert, wodurch sie in hohen Konzentrationen Vitellogenine akkumulieren können. Die Umverteilung von RME-2 von der Zelloberfläche in intrazelluläre Vesikel scheint kurz nach der Ovulation zu erfolgen. Nach der Internalisierung durchlaufen die Proteine ein endocytotisches Sortierungssystem. Verschiedene Rab-Proteine (kleine GTPasen) vermitteln jeden einzelnen Fusionschritt im vesikulären Transport (Mellman 1996), weshalb eine Abhängigkeit des Vitellogenintransports und -rezeptors zur Aktivität der endocytotischen Rab-Proteine RAB-5, RAB-7 und RAB-11 besteht. Die RAB-Proteine existieren in allen Eukaryoten als Modulatoren der Endocytose (Grant und Hirsh 1999). RME-2 vermittelt hierdurch zwar den größten Teil der Aufnahme exogener Lipide und Fettsäuren, es existieren jedoch noch alternative Transportsysteme, die der LDL-Rezeptor-Familie angehören, die unabhängig von RME-2 fungieren, wie z. B. das *receptor-related protein-1* (LRP-1) und LRP-2 (Kubagawa *et al.* 2006, Branicky *et al.* 2010).

Nach der Synthese werden die Vitellogenin-Moleküle co- und post-transkriptional modifiziert, um den Transport von Kohlenhydraten, Lipiden, Sulfaten und anderen Nährstoffen in das Pseudocoelom und zu den Ovarien zu ermöglichen (Raikhel und Dhadialla 1992, Hagedorn *et al.* 1998, Giorgi *et al.* 1999, Tufail *et al.* 2005). Diese Konjugationen dienen jedoch nicht nur der Nährstoffversorgung, sondern auch der Internalisierung durch die Rezeptoren in die Oozyte. Die Vitellogenine sind sowohl glycosyliert (Giorgi *et al.* 1998) als auch phosphoryliert (Takahashi 1987). Miller *et al.* (1982) und Dhadialla *et al.* (1992) wiesen nach, dass die Dephosphorylierung von Vitellogeninen die Aufnahme in die Oozyten

reduziert. Dies lässt vermuten, dass die phosphorylierten Bereiche für die Interaktion von Vitellogenin mit dem Rezeptor an der Oozytenoberfläche entscheidend sind. Bei Fehlen der RME-2-Rezeptoren kommt es zu einer signifikanten Reduktion von endosomalem Vitellogenin in den Oozyten und zur Sterilität (Willnow 1999). Letzteres lässt sich u. a. durch einen generellen Nährstoffmangel und durch den fehlenden Transport von Fettsäuren in die Oozyten erklären, da die Sperma-Motilität von PUFA-generierten Signalmolekülen aus den Oozyten abhängig ist (Kubagawa *et al.* 2006).

Fertilisierte Oozyten internalisieren RME-2, produzieren sehr schnell eine Eischale und haben so nicht länger Zugang zu exogenen Vitellogeninen. Vitellogenine und RME-2 werden nach der Internalisierung voneinander getrennt, die Lipide vom Vitellogenin-Komplex abgespalten und die Proteine in Endosomen gespeichert (Grant und Hirsh 1999). Der Rezeptor kann anschließend degradiert oder recycelt werden. Durch den letztgenannten Vorgang können große Mengen an Vitellogeninen innerhalb kurzer Zeit in die Oozyten aufgenommen werden. Die Vitellogenine werden nach und nach während der Embryogenese metabolisiert, nur einige Granula verbleiben in den frisch geschlüpften Larven. Embryonales Gewebe bildet zwar keine Vitellogenine, aber intestinal gespeicherte maternale Vitellogenine werden innerhalb des sich entwickelnden Embryos genutzt (Sharrock 1983, Bossinger und Schierenberg 1992). Für diese intestinale Aufnahme ist vermutlich neben RME-2 ein weiterer Rezeptor verantwortlich (Grant und Hirsh 1999), welcher sich möglicherweise in einem der 10 weiteren RMEs von *C. elegans* wiederfindet.

Zusammengefasst kann für Invertebraten wie *C. elegans* beschrieben werden, dass die Vitellogenine extraovarial im Intestinum synthetisiert und nach Sekretion in das Pseudocoelom zu den heranwachsenden Oozyten transportiert werden. Dort werden sie Rezeptor vermittelt aufgenommen und in Granulae gespeichert. Dieser als Vitellogenese bezeichnete Prozess wird durch einen von den Oozyten ausgehenden hormonellen Stimulus initiiert (Willnow 1999). Der evolutionäre Ursprung der Produktion ApoB-100 beladener Lipoproteinen in Säugetieren liegt vermutlich in dieser Vitellogenese der Invertebraten (Sellers *et al.* 2005).

1.4.4 Funktionelle Bedeutung der Vitellogenine im Intestinum von *C. elegans*

Die Funktionen der Vitellogenine in *C. elegans* sind zum großen Teil noch ungeklärt. Genetische Homologien der Vertebraten-Vitellogenin-Gene zu den Vitellogenin-Genen in *C. elegans* lassen allerdings auf ähnliche Funktionen schließen. Weiterhin kommen in alt-adulten Tieren, die keine Eier mehr legen, auch Vitellogenine vor. Außerdem kodieren sechs verschiedene Gene die Vitellogenine in *C. elegans*, weshalb neben der Funktion als Nährstoffquelle für Nachkommen weitere Funktionen der Vitellogenine auch in *C. elegans* postuliert werden können.

1.4.4.1 Antioxidative Funktionen von Vitellogeninen

Vitellogenine weisen eine Bindungskapazität zu Metallen wie Eisen und Cadmium auf (Richards und Steel 1987, Heusden *et al.* 1991), mittels welcher zelluläre Strukturen vor oxidativen Schäden geschützt werden (Nakamura *et al.* 1999). Als Hauptquelle reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) in biologischen Systemen, bedingt die sogenannten Fenton Reaktion oxidativen Stress in der Zelle. Hierbei wird die Oxidation organischer Substrate mit Wasserstoffperoxid durch Eisensalze katalysiert (Fenton 1894). Ursachen für die aufgrund oxidiertes Vorgänge entstandenen Carbonyl-Gruppen in Proteinen sind beispielsweise aus Lipid-Peroxiden generierte, reaktive Aldehyd-Komponenten (Nakamura und Goto 1996). Vitellogenine sind Lipoproteine und können durch Oxidation der Acyl-Bestandteile der Lipide die Carbonyle der Apoproteine erhöhen. VIT-6 scheint in *C. elegans* ein hoch carbonyliertes Polypeptid zu sein, dessen Carbonylierung im Alter stark ansteigt (Nakamura *et al.* 1999, Goto *et al.* 1999). Die Carbonylierung findet bevorzugt am ungespaltenen Protein (180 kDa) statt und nicht in den Spaltprodukten von VIT-6 (88 kDa). Dies zeigt, dass die Proteincarbonylierung nicht ausschließlich unspezifisch, sondern auch gezielt an spezifischen Proteinen stattfindet (Nakamura und Goto 1996).

Ishii *et al.* (1998) belegen einen signifikanten Anstieg des Gehalts an carbonylierten Proteinen, welcher invers mit der Lebensspanne korreliert (Yasuda *et al.* 1999, Adachi *et al.* 1998). In jungen Organismen werden oxidativ geschädigte Proteine zeitnah durch zelluläre Proteasen abgebaut. Diese Enzymaktivität lässt jedoch altersbedingt nach, weshalb es im Alter zu Akkumulationen oxidativ veränderter Proteine kommt. Fluorogenes Lipofuscin

akkumuliert beispielsweise mit zunehmendem Alter im Intestinum und in der Körperflüssigkeit von *C. elegans* (Hosokawa *et al.* 1994). Dieses Lipofuscin besteht aus einem komplexen Gemisch oxidierter Lipide und quervernetzter Proteine. Da die Vitellogenine im Intestinum synthetisiert werden, kann vermutet werden, dass oxidativ modifizierte Vitellogenine Hauptkomponenten der fluorogenen Lipofuscin-Granulae sind (Goto *et al.* 1998, Nakamura *et al.* 1999).

Die biologische Signifikanz der Vitellogenin-Präsenz in alt-adulten Nematoden, die keine Eier mehr legen, kann so möglicherweise durch die Funktion als Antioxidans und einem hiermit assoziierten Einfluss auf die Lebensspanne erklärt werden.

1.4.4.2 Vitellogenine als Cholesterol-Transporter

Nematoden sind im Gegensatz zu Vertebraten auxotroph für Sterole, da sie keine Enzyme für eine *de novo* Biosynthese der Sterole besitzen. So muss *C. elegans* exogenes Cholesterol aufnehmen, aus dem Steroide synthetisiert werden, um damit zelluläre Funktionen aufrechtzuerhalten (Chitwood 1999, Kurzchalia und Ward 2003). Der Transport und die Distribution von Cholesterol in multizellulären Organismen wie *C. elegans* ist essentiell, da Cholesterol nicht nur bei der strukturellen und funktionellen Organisation der Plasmamembran beteiligt ist, sondern dessen Metabolite auch Signalfunktionen vermitteln. Nematoden ohne Cholesterolzufuhr zeigen neben Wachstumsverzögerungen und Häutungsprobleme auch eine verkürzte Lebensspanne und verminderte Nachkommenschaft (Yochem *et al.* 1999, Kubagawa *et al.* 2006). In diesem Zusammenhang sind Vitellogenine in ihrer Funktion als Cholesteroltransporter als essentiell anzusehen.

Die evolutionäre Verwandtschaft der Vitellogenine von *C. elegans* mit dem ApoB-100 des Menschen zeigt sich nicht nur in Sequenzanalysen, sondern auch in funktionellen Übereinstimmungen (Baker 1988). Das ApoB-100 ist Teil des *very-low-density*-Lipoproteins (VLDL), *intermediate-density* Lipoproteins (IDL) und LDL in Säugetieren (Brown und Goldstein 1987, Law *et al.* 1986, Knott *et al.* 1986, Yang *et al.* 1986, Cladaras *et al.* 1986, Brown und Goldstein 1986, Yamamoto *et al.* 1984). Die Vitellogenine in *C. elegans* binden ebenfalls hydrophobe Moleküle wie Phospholipide, Triacylglyceride, Fettsäuren und Cholesterol, um diese Moleküle zu den Zielzellen zu transportieren. Darüber hinaus binden die Vitellogenine

in *C. elegans*, wie auch ApoB-100, an die Membran-gebundene Rezeptoren RME-2 und werden, wie vorangegangen beschrieben, endocytiiert (Opresko und Wiley 1987). Hinzu kommt, dass der N-terminale Rest von ApoB-100, der Ähnlichkeiten zu den Vitellogeninen zeigt, 40 % von ApoB-48, das in Chylomikronen lokalisiert ist, beinhaltet. Wie die Vitellogenine in *C. elegans* wird ApoB-48 im Intestinum gebildet (Cladaras *et al.* 1986, Chen *et al.* 1987). Aufgrund dieser starken Ähnlichkeit sowohl auf der Sequenz- als auch Funktionsebene ist davon auszugehen, dass der Transfer von Cholesteroll und anderen lipophilen Komponenten evolutionär von den Funktionen der Vitellogenine abstammen. Weiterhin kann aufgrund dieser Homologien zu ApoB-100 eine Rolle der Vitellogeninen in der Regulation der Lebensspanne unterstellt werden. Dieser mögliche Einfluss auf die Lebensspanne wird nachfolgend hinsichtlich der Cholesteroll-Transportfunktion der Vitellogenine beschrieben.

Steroidale Verbindungen als Signalmetabolite

Steroidale Verbindungen wie Cholesteroll werden in den Zellen zu weiteren Signalmetaboliten als Liganden nukleärer Hormonrezeptoren (NHR) modifiziert. NHRs sind Transkriptionsfaktoren, die eine Responsivität auf lipophile Hormone wie Steroide und langkettige Fettsäuren besitzen und so die Genexpression regulieren. DAF-12 (Hsin und Kenyon 1999) ist einer von über 280 NHRs (Antebi *et al.* 2000, Gissendanner *et al.* 2004) in *C. elegans*, der z. B. homolog zu dem Vitamin D- und dem LXR-Rezeptor von Vetebraten ist (Antebi *et al.* 2000). DAF-12 ist ein zentraler Mediator des endokrinen Insulin/Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Signalwegs (ILS) und des erst kürzlich beschriebenen Steroid-Signalwegs.

Eine moderate Inhibierung des ILS führt neben einer Verlängerung der Lebensspanne auch zu einer höheren Stressresistenz (Kimura *et al.* 1997, Lin *et al.* 2001). Der Transkriptionsfaktor DAF-16 induziert die Expression einer ganzen Reihe von Genen, die an Mechanismen der Stressresistenz beteiligt sind. Hierzu gehören zum Beispiel eine Superoxid Dismutase (*sod-3*) (Honda und Honda 1999), eine transmembranäre Tyrosin-Kinase (*old-1*) (Murakami und Johnson 2001) sowie ein Metallothionein (*mtl-1*) (Barsyte *et al.* 2001). Damit diese Gene exprimiert werden können, transloziert DAF-16 bei Stress in den Nukleus (Lin *et al.* 2001). Dies ist allerdings nur im unphosphorylierten Zustand möglich, welcher durch die

Hemmung des ILS induziert wird (Abbildung 1.5). Durch Phosphorylierung von DAF-16 inhibiert der ILS also dessen Aktivität und führt so zu einer geringeren Stressresistenz (Lin *et al.* 2001, Mukhopadhyay *et al.* 2006).

Experimentelle Studien belegen, dass eine Entfernung der Keimbahn-Stammzellen in *C. elegans* zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt (Hsin und Kenyon 1999). Dieser Effekt ist abhängig von DAF-16 und geht mit dessen Translokation in die Nuklei intestinaler Zellen einher (Lin *et al.* 2001). Wie sich zeigte, beruht die so induzierte Lebensverlängerung auf einem Signalweg, der parallel zum ILS verlaufen muss (Yamawaki *et al.* 2008). DAF-12 fungiert als Schnittstelle zwischen den beiden Signalwegen, die Dauerstadium, Stress-Resistenz und Langlebigkeit in somatischen Zellen in *C. elegans* regulieren können (Antebi *et al.* 2000). Als endogene Liganden für DAF-12 dienen, in dem zum ILS parallelen Signalweg, zwei Gallensäure-ähnliche 3-Keto-Steroide, die auch als Δ^4 - und Δ^7 -dafachronischer Säuren (*dafachronic acid*, DAs) bezeichnet werden (Motola *et al.* 2006). DAs sind u. a. C27-Steroide, die eine Carboxyl-Gruppe an C26 und eine Ketogruppe (z. T. auch Hydroxylgruppe) an der C3-Position besitzen (Gerisch *et al.* 2006). Da es sich hierbei um hormonell wirksame Steroidale Verbindungen handelt, wird diese Signalkaskade als Steroid-Signalweg bezeichnet. Die Synthese der DAs erfolgt auf Basis von Cholesterol (Abbildung 1.5). Dieses wird extrazellulär von Vitellogeninen gebunden und über den Vitellogenin-Rezeptor RME-2 in die Zellen transportiert (Baker 1988, Matyash *et al.* 2001). In einem ersten Schritt wird das Cholesterol durch eine Rieske-like Oxygenase (DAF-36) zu 7-Dehydrocholesterol umgewandelt, indem das Enzym an Position 7 eine Doppelbindung einfügt (Rottiers *et al.* 2006, Wollam *et al.* 2011). Im Anschluss werden durch das Cytochrom P450-abhängige Enzym DAF-9 die DAs gebildet. DAF-9 wird in den sogenannten XXX-Zellen, in der Hypodermis und in den Spermathecae von Hermaphroditen gebildet (Gerisch *et al.* 2001, Jia *et al.* 2002). Es ist das funktionelle Ortholog des in der Gallensäure-Synthese involvierten Enzyms CYP27 von Säugetieren. DAF-9 oxidiert die Substrate am C26 und katalysiert somit den finalen Schritt der Biosynthese von Δ^4 - und Δ^7 -DAs (Abbildung 1.5, Motola *et al.* 2006). In den XXX-Zellen ist DAF-9 an der Δ^4 -DA-Biosynthese beteiligt, während hypodermales DAF-9 an der Synthese von Δ^7 -DA teilnimmt. Die Δ^4 - und Δ^7 -DA können redundant arbeiten und sich so *in vivo* gegenseitig kompensieren, um die reproduktive Entwicklung zu begünstigen (Dumas *et al.* 2010). In der *daf-9*-Null-Mutante ist die DA-Hormonproduktion beeinträchtigt, dies vermindert die Konzentration an DAF-12-Liganden, weshalb vermehrt unbeladenes

DAF-12 vorliegt und somit die Entwicklung zur Dauerlarve DAF-16-abhängig begünstigt wird. So gehen Motola *et al.* (2006) davon aus, dass DA-Liganden besetztes DAF-12 die reproduktive Entwicklung fördert, wohingegen der unbeladene Rezeptor die Dauer-Differenzierung induziert. Gerisch *et al.* (2006) zeigen, dass die Δ^4 - und Δ^7 -DA neben der reproduktiven Entwicklung und Stressresistenz auch die Lebensspanne modulieren: In der Abwesenheit von Signalen der Keimbahn induzieren der Liganden besetzte NHR DAF-12 und der Transkriptionsfaktor DAF-16 intestinaler Zellen die Langlebigkeit.

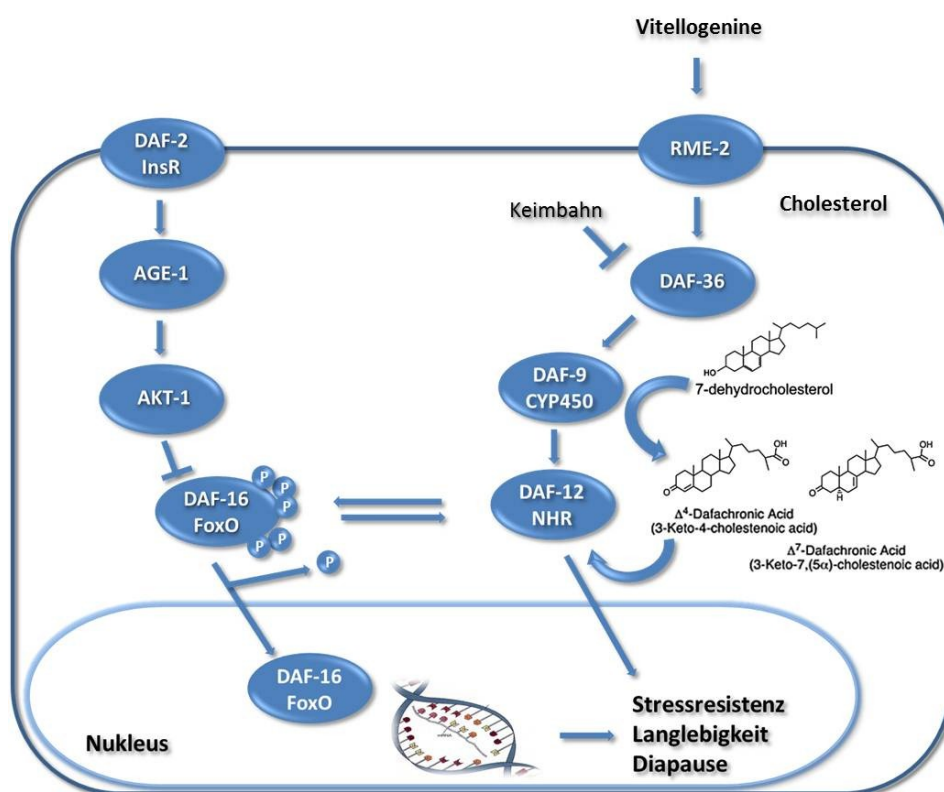


Abbildung 1.5 DAF-12 und DAF-16 vermittelte Signalwege der Stressresistenz, Langlebigkeit und Diapause.

Links ist der Insulin/Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor (IGF)-Signalweg (ILS) vereinfacht dargestellt. Wenn der Insulin/IGF-1-Rezeptor DAF-2 stimuliert wird, führt dies zu einer Phosphorylierung von DAF-2 innerhalb seiner membranären Domäne. Die Autophosphorylierung von DAF-2 aktiviert PI3K, welche aus Phosphoinosit-3,4 bisphosphat (PIP2) die Phosphoinosit-3,4,5-trisphosphat (PIP3) bildet. AAP-1 und AGE-1 stellen hierbei katalytische Untereinheiten des Heterodimers PI3K dar. Hierdurch werden *second messenger* freigesetzt, die für die Aktivierung von AKT-1 benötigt werden. AKT-1 formt mit weiteren Proteinen der Kinase-Familie einen multimeren Komplex, welcher an der Regulierung des Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors DAF-16/FOXO beteiligt ist. Ist der Insulin/IGF-1 Signalweg aktiv, blockiert dies die nukleäre Lokalisation des Transkriptionsfaktors DAF-16/FOXO und beeinflusst somit die Lebensspanne, die Dauerlarven-Induktion und die Stressresistenz (Hertweck *et al.* 2004). Rechts ist die durch lipophile Hormone vermittelte Signalkaskade des Steroid-Signalwegs dargestellt. Die Rieske-Oxygenase DAF-36 und das Cytochrom P450 DAF-9 sind an der Synthese dafachronischer Säuren (DA) beteiligt. DAF-9 oxidiert in einem letzten Schritt die Sterole zu Δ^4 - und Δ^7 -DA, die Liganden von DAF-12 sind. Liganden-besetztes DAF-12 fördert die reproduktive Entwicklung und die Stressresistenz, wohingegen unbedadenes DAF-12 die Dauer-Differenzierung DAF-16-abhängig induziert (Gerisch *et al.* 2001, Motola *et al.* 2006). Die mittels RME-2 endocytierten Vitellogenine könnten in der Funktion als Cholesteroltransporter somit Einfluß auf die Regulation der Lebensspanne und Stressresistenz nehmen.

In Anbetracht dieser Zusammenhänge könnten Vitellogenine in der Funktion als Cholesteroltransporter das Substratangebot für DAF-9 beeinflussen und somit Stressresistenz, Lebensspanne und reproduktive Entwicklung beeinflussen.

1.4.5 Hormonelle Regulation der Vitellogenin-Expression in *C. elegans*

Die Transkription der Vitellogenin-Gene ist abhängig von der Bindung eines Hormon-Rezeptor-Komplexes an ein Hormon-responsives Element (HREs), das in der Promotorregion dieser Gene lokalisiert ist (Segraves 1994). Hormone, die zur Transkription der Vitellogenin-Gene führen, sind in erster Linie Steroid-Hormone (Rhaikel *et al.* 2004). Es existieren zwei sich wiederholende heptamere Sequenzen, die sich mehrfach innerhalb der 300 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartes eines jeden der sechs *vit*-Gene in *C. elegans* befinden (Spieth *et al.* 1985a). Eines dieser Elemente, das *vit*-Promotor-Element 1 (VPE1) besitzt die Sequenz TGCAAT, welches der CCAAT Box der Säugetiere ähnlich ist. Das zweite heptamere Element VPE2 hat die Sequenz CTGATAA, welche dem Erythrozyten-spezifischen Aktivator GATA-1 der Säugetiere entspricht (Orkin 1990). VPE1 und VPE2 werden beide für die Vitellogenin-Gentranskription benötigt (Winter *et al.* 1996). Diese Elemente sind in der Regulation der geschlechts-, stadien- und gewebespezifischen Expression der Vitellogenine als Bindungsstellen für Aktivatoren involviert, die möglicherweise nur in den intestinalen Zellen adulter Hermaphroditen funktional sind (MacMorris *et al.* 1992).

Östrogene gehören zu der Gruppe der Steroid-Hormone, die aus Cholesterol gebildet werden und bei der reproduktiven Entwicklung von *C. elegans* entscheidend sind (Motola *et al.* 2006). Zwischenstufen in der Biosynthese der Östrogene sind z. B. die Pregnenolone (Abbildung 1.6). Im Menschen werden die Östrogene hauptsächlich im Ovar und in der Plazenta synthetisiert, in geringen Mengen auch in der Nebennierenrinde und in den Leydigischen Zwischenzellen des Hodens. Die Wirkungen von Östrogenen sind vielfältig: Sie regulieren Genexpressionen und darüber hinaus Wachstum und zelluläre Differenzierung unterschiedlicher Zielgewebe (Kojetin *et al.* 2008, Couse und Korach 1999). Des Weiteren beeinflussen Östrogene pathologische Prozesse bei hormonabhängigen Erkrankungen wie Brust-, Gebärmutter- und Eierstockkrebs, sowie post-menopausaler Osteoporose (Couse und Korach 1999).

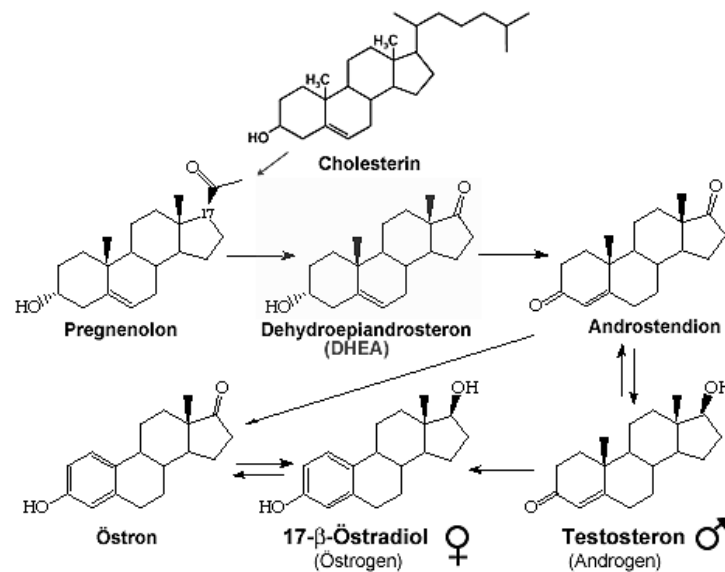


Abbildung 1.6 Ausschnitt der Steroidsynthese (Zwervev 1997).

Pregnenolone werden mittels Oxygenasen aus Cholesterol gebildet und können weiter über Androstendione und Östrone bzw. Testosteron zu 17β-Östradiol metabolisiert werden.

Das wichtigste und physiologisch am stärksten wirksame Östrogen ist das 17β-Östradiol (Abbildung 1.7, Berg *et al.* 2007). Auch in *C. elegans* scheint es der stärkste Induktor der Vitellogenin-Expression zu sein (Custadia *et al.* 2001).

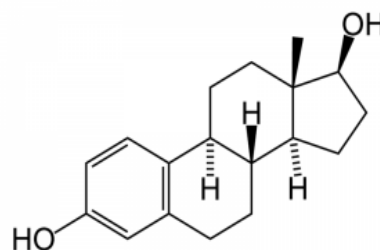


Abbildung 1.7 Strukturformel des endogen wirksamen Östrogens 17β-Östradiol (Estra-1,3,5(10)-trien-3,17β-diol).

Die amphipilen Eigenschaften des Hormons ermöglichen die Diffusion durch die Plasmamembran der Zelle, wo es dann an intrazelluläre Steroidhormon-Rezeptoren der NHR-Familie bindet (Kleinig und Maier 1999). Danach findet eine Translokation des Liganden-gebundenen Transkriptionsfaktors in den Nukleus mit nachfolgender Aktivierung Östrogen-responsiver Elemente (*estrogen-responsive elements*, ERE) statt. Diese ERE-Motive befinden sich in den Promotorregionen Östrogen-responsiver Gene (Burendahl *et al.* 2009).

Die Östrogenrezeptoren ER α (Green *et al.* 1986) und ER β (Kuiper *et al.* 1996) der Vertebraten gehören zu der Superfamilie der NHRs und agieren als Liganden-induzierte Transkriptionsfaktoren, die östrogene Reaktionen in der Zielzelle vermitteln (Heldring *et al.* 2007). Das Homolog in *C. elegans* zum humanen ER scheint NHR-14 zu sein, welcher die Genexpression durch 17 β -Östradiol reguliert, wodurch die Transkription der Vitellogenine aktiviert werden könnte (Mimoto *et al.* 2007).

1.4.5.1 Transkriptionale Regulation der Vitellogenin-Expression durch Genistein

Das Isoflavon Genistein (4',5',7-trihydroxyisoflavon) ist neben Daidzein (4',7-dihydroxyisoflavon) und Glycitein (6-methoxydaidzein) ein Hauptinhaltsstoff der Sojabohne (Murphy *et al.* 1982), dessen Aufnahme beim Menschen mit einer geringeren Inzidenz von Brustkrebs (Messina *et al.* 2006), Hypercholesterolemie (Sirtori *et al.* 1977, Descovich *et al.* 1980, Gaddi *et al.* 1987, Sirtori *et al.* 1998, Bakhit *et al.* 1994) und dem Metabolischen Syndrom (Azadbakht *et al.* 2007) assoziiert wird. Der phenolische Ring und der Abstand zwischen den 4'- und 7'-Hydroxyl-Gruppen zeigen strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Genistein und 17 β -Östradiol (Abbildung 1.8). Neben diesen strukturellen Ähnlichkeiten (Song *et al.* 1999) zeigen sich auch Analogien im Verhalten zu den Östrogenen. Phytoöstrogene können sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten der Östrogene wirken (Zhao *et al.* 2002).

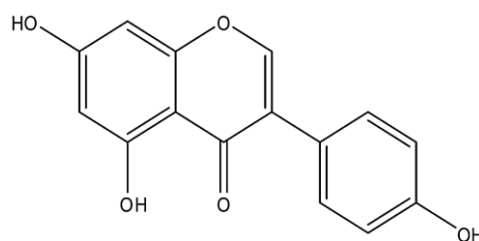


Abbildung 1.8 Strukturformel des Phytoöstrogens Genisteins (5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-chromen-4-one).

Genistein kann die Östrogensignale *in vivo* beeinflussen, indem es die Transkription der entsprechenden Gene nach Bindung an den ER und Translokation in den Zellkern über die Bindung an ERE der Promotorregionen aktiviert (Zlábek *et al.* 2008, Burendahl *et al.* 2009). Diese Aktivierung des ER induziert bzw. inhibiert die Expression Östrogen-responsiver Gene

wie der Vitellogenine. Hierbei zeigt Genistein eine stärkere östrogene Aktivität als Daidzein und Glycitein (Song *et al.* 1999).

Mögliche Wirkmechanismen von Phytoöstrogenen in *C. elegans* sind kaum beschrieben. Gutierrez-Zepeda *et al.* (2005) zeigen neuroprotektive Effekte von Glycitein aufgrund dessen antioxidativen Kapazität. Über eine transkriptionale Wirkung von Genistein in *C. elegans*, insbesondere auf die Vitellogenin-Expression, finden sich bislang keine Hinweise in der Literatur.

2 ZIELSETZUNG

Experimentelle Studien über die Einflussfaktoren der Langlebigkeit verschiedener Säugetierspezies weisen auf eine starke Korrelation zwischen Stressresistenz und einem hohen Lebensalter hin. Aufgrund seiner kurzen Lebensspanne einerseits und der bedeutenden genetischen Homologie in Krankheits-relevanten Genen zu denjenigen des Menschen andererseits, wurde im Rahmen dieser Arbeit der frei lebende Nematode *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus zur Untersuchung der Bedeutung von Stressresistenz-Genen für die Lebensspanne verwendet. Im Fokus des Interesses standen die zum humanen Apolipoprotein B-100 homologen Vitellogenin-Gene, von denen fünf funktionell in *C. elegans* exprimiert werden. Untersucht wurde der Einfluss der Vitellogenine auf die Lebensspanne unter bakteriell induziertem Stress durch das Nematoden-pathogene Bakterium *Photorhabdus luminescens*, sowie Stress der durch *Knock-down* der Zink-abhängigen Matrixmetalloprotease ZMP-2 verursacht wurde. Die Lebensspanne der Würmer wurde bei 37°C unter Verwendung eines Farbstoffes erfasst, der nur nach Eindringen in tote Organismen durch Bindung an DNA fluoresziert. Um die Bedeutung einzelner Gene für die oben genannten Prozesse zu bestimmen, wurde die Methode der RNA-Interferenz zwecks *Knock-down* der betreffenden Gene benutzt. Neben Vitellogeninen wurden zentrale Faktoren bereits für die angeborene Immunität des Wurmes beschriebener Signalwege in ihrer Expression reduziert, um deren Bedeutung für die Stressresistenz und die Lebensspanne unter Exposition gegenüber *P. luminescens* bzw. unter *zmp-2*-RNAi-induziertem Stress zu erforschen.

Da Vitellogenine am Cholesteroltransport beteiligt sind und Cholesterolmetabolite den Steroid-Signalweg in *C. elegans* aktivieren, wurde auch der Steroid-Signalweg hinsichtlich seiner Beteiligung an einer veränderten Stressresistenz sowie etwaiger Interaktionen seiner Mitglieder mit Vitellogeninen beleuchtet. Die Tatsache, dass Vitellogenin-Gene östrogen-responsiv sind, ließ es schließlich als interessant erscheinen, die Wirkung von 17 β -Östradiol und des Nahrungs-relevanten Phytoöstrogens Genistein auf die beschriebenen Prozesse zu bestimmen.

3 MATERIAL UND METHODEN

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nematoden- und Bakterienstämme, sowie Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien sind im Appendix A mit Angabe des Herstellers und der Artikelnummer aufgelistet. Ebenso sind dort die eingesetzten Oligonukleotide mit deren Sequenzen und die Zusammensetzung der selbst hergestellten Lösungen und Puffer tabellarisch aufgeführt.

3.1 Kultivierung von *C. elegans*

Die *C. elegans* Stämme (Tabelle A 7.1) wurden nach Brenner (1974) und Wood (1988) kultiviert. Die Tiere wuchsen auf NGM-Platten (Tabelle A 7.12), die mit *E. coli* OP50 (Tabelle A 7.2) als Nahrungsquelle beimpft waren. Sie wurden bei 20 °C bzw. 15 °C kultiviert und die Versuche bei 20 °C durchgeführt. Unter sterilen Bedingungen wurden die *C. elegans*-Stämme mit einem ausgeglühten Platindraht von Platte zu Platte transferiert. Um eine größere Anzahl von Würmern zu transferieren, wurde mit einem ausgeglühten Skalpell ein kleines Rechteck aus einer besiedelten Platte ausgeschnitten und kopfüber auf eine neue mit *E. coli* bewachsenen NGM-Platte gelegt.

3.1.1 Herstellung von NGM-Agar-Platten

Die autoklavierten und sterilfiltrierten NGM-Agar-Komponenten (Tabelle A 7.12) wurden im Wasserbad (Lauda) bei 55 °C flüssig gehalten und anschließend ca. 20 ml auf jede Petrischalen (9,2 cm) (Sarstedt) gegossen. Die Agarplatten wurden unter sterilen Bedingungen mit 600 µl der *E. coli*-Kultur definierter optischer Dichte ($OD_{600} = 2$) versetzt und danach für die *C. elegans* Kultivierung eingesetzt. Auf 6 cm NGM-Platten wurden 300 µl und auf 3,5 cm Platten 150 µl Bakteriensuspension aufgetragen und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. Die fertigen NGM-Agar Petrischalen mit Bakterienrasen konnten bei 20 °C für mehrere Tage gelagert werden.

3.1.2 Herstellen der *E. coli* OP50 Kultur

Alle Schritte zur Herstellung von *E. coli* OP50-Kulturen und das Aufbringen dieser auf NGM-Agar-Platten, erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Die aus den Glycerolkulturen der Stammsammlung gewonnenen *E. coli* wurden auf 2xYT-Agar-Platten nach dem „Drei-Ausstrich-Prinzip“ ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit einer Einzelkolonie 3 ml 2xYT-Medium (Tabelle A 7.13) angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (Heidolph) bei 300 rpm inkubiert. Für die Tagkultur wurde am nächsten Morgen 200 ml 2xYT Medium mit 500 µl Bakteriensuspension angeimpft (Verdünnung 1:500) und auf einem Schüttelinkubator bei 300 rpm bei 37 °C für 6 – 8 h inkubiert. 4 x 45 ml der Tagkultur wurden bei 5.000 x g 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet mit 4,5 ml 2xYT -Medium resuspendiert.

3.1.3 Bakterienglycerolkulturen

800 µl Bakterien einer Über-Nacht-Kultur wurden zu 200 µl Glycerol gegeben, gut vermischt und bei -80°C eingefroren.

3.1.4 „Egg-Präparation“ zur Synchronisierung von *C. elegans*

Um eine homogene gleichaltrige Verteilung jung-adulter Nematoden zu erlangen, wurde eine Synchronisierung mittels Egg-Präparation, der sogenannten *Bleaching*-Methode, durchgeführt. Eine mit Nematoden vollbewachsene Agarplatte wurde hierzu unter sterilen Bedingungen mit M9-Puffer (Tabelle A 7.14) überschichtet und mittels Glas-Pasteurpipette (Brand) der M9-Puffer zusammen mit den Würmern in ein 15 ml Falcon-Tube (Sarstedt) überführt. Die adulten Würmer wurden zunächst 3 – 4-mal mit M9-Puffer gewaschen, um Bakterien und Larven zu entfernen. Nach dem letzten Waschen wurden die Würmer zentrifugiert (1.200 x g, 2 min), der Überstand bis auf 4 ml abgenommen und 4 ml Bleichlösung (Tabelle A 7.18) hinzu pipettiert. Diese Mischung wurde bis zum Aufbrechen der Würmer (unter dem Stereomikroskop (Breukhoven) beobachtend) kräftig geschüttelt, um

so die Eier der adulten Tiere frei zu setzen. Anschließend wurden die Würmer erneut mindestens 6-mal mit M9-Puffer gewaschen, bis kein Chlorgeruch mehr wahrnehmbar und die Bleichlösung vollständig entfernt war. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Falcon-Tube auf 10 ml mit M9-Puffer aufgefüllt und über Nacht, jedoch maximal für 16 h, bei 20 °C in einem Überkopf-Schüttler (neoLab) bei 25 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen konnten die synchronisierten L1-Larven nach dem Abzentrifugieren (1.200 x g, 2 min) und Absaugen des Überstandes zur weiteren Untersuchung in die entsprechenden Wells einer 96-Well-Platte pipettiert werden.

3.1.5 Aufzucht synchronisierter Larven in NGM-Flüssigmedium

Alle Versuche mit *C. elegans* wurden in einem Flüssigmedium (Tabelle A 7.10) nach Lehner *et al.* (2006) durchgeführt. Die Aufzucht synchronisierter Larven in NGM-Flüssigmedium fand je nach Versuchsansatz in 96- oder 48-Well Mikrotiterplatten (Greiner) oder in 500 ml Erlenmeyerkolben (Duran) statt. Von einer aufkonzentrierten *E. coli* OP50-Tagkultur wurden 120 µl in ein Eppendorfgefäß pipettiert und dies anschließend bei 14.000 rpm 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Bakterienpellet mit 2 ml NGM-Medium durch Vortexen resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde mit einer optischen Dichte (OD_{600}) von 1,5 - 1,6 verwendet.

In 96-Well-Platten wurden 10 µl L1-Larven, in 48-Well-Platten 40 µl L1-Larven pipettiert, wobei 10 µl ca. 10 L1-Larven enthielten. Zu den L1-Larven wurden in jedes Well je nach Versuchsansatz und Well-Platte 40 – 200 µl Bakteriensuspension in NGM-Flüssigmedium gegeben. In dem 500 ml Erlenmeyerkolben wurden 20 ml Wurmlösung mit 50 – 60 L1-Larven pro 10 µl und 50 ml Bakteriensuspension zusammen pipettiert. Nach einer etwa dreitägigen Inkubation bei 20 °C waren die L1-Larven jung-adult.

3.1.6 Einfrieren von *C. elegans*

Eine Langzeit-Lagerung der Nematoden ist bei -80 °C möglich. Hierfür wurden die Nematoden mit dem Einfrierpuffer A und B (Tabelle A 7.16) im gleichen Verhältnis von der NGM-Platte abgespült und in Eppendorfgefäße aliquotiert. Diese wurden in einen

Isopropanol-*Freezing*-Behälter (Sigma Aldrich) gegeben, um ein langsames Herunterkühlen (1 °C/min) zu ermöglichen. Bei Bedarf konnten die Nematoden bei RT wieder aufgetaut werden.

3.1.7 Inkubation mit *P. luminescens* und Effektoren

Die Effektoren werden zu verschiedenen Zeitpunkten zu den Nematoden in das NGM-Flüssigmedium hinzugegeben. Das für *C. elegans* pathogene Bakterium *P. luminescens* (Tabelle A 7.2) wird am vierten Tag der Kultivierung hinzugegeben, die Effektoren 17 β -Östradiol, Genistein und Dehydroergosterol (DHE) (Tabelle A 7.9) schon ab dem L1-Stadium.

Die Inkubationszeit mit *P. luminescens* betrug 20 - 24 h ab dem Erreichen des jung-adulten Stadiums der Nematoden. Dazu wurden 20 μ l einer Übernachtskultur (5×10^6 Bakterien/Well) in die entsprechenden Wells einer 96-Well-Platte, welche bereits jung-adulte Nematoden in NGM-Flüssigmedium enthielten, pipettiert. Die *P. luminescens* -Übernachtskultur sollte hierzu eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht haben.

Die Stammlösungen der Effektoren wurden auf Raumtemperatur gebracht oder wie in Tabelle A 7.9 beschrieben frisch angesetzt. Von den Stammlösungen wurden zunächst Verdünnungen erstellt, welche die 10-fache Konzentration der gewünschten Endkonzentration und max. 10 % Ethanol aufwiesen, damit die Ethanol-Endkonzentration pro Ansatz nicht höher als 1 % betrug. Die Inkubation der Kontrolle fand mit der gleichen Ethanolkonzentration statt, die zur Lösungsvermittlung applizierter Effektoren verwendet wurde.

3.2 RNA-Interferenz (RNAi) in *C. elegans*

Um die Expression von definierten Genen in *C. elegans* zu vermindern, wurde die etablierte Methode der RNA Interferenz (RNAi) angewandt. Durch das gleichzeitige Einbringen von *sense*- und *antisense*-RNA kommt es zu einem starken, lang andauernden und sehr spezifischen Abschalten eines entsprechenden Zielgenes. Dieser komplexe Mechanismus basiert auf doppelsträngiger RNA (dsRNA) und führt zum Abbau einzelsträngiger mRNA,

welche dieselbe Sequenz besitzt wie ein Strang der dsRNA. Die dsRNA-Moleküle werden durch eine dsRNA-spezifische Endonuklease des RNaseIII-Typs (Dicer) in Doppelstränge mit einer Länge von 21 bis 25 Basenpaaren (bp) gespalten, die als *short interfering RNA* (siRNA) bezeichnet werden. Der *antisense*-Strang eines siRNA-Moleküls lagert sich mit verschiedenen Proteinen zu einer spezifischen RNA-Endonuklease zusammen, dem *RNA-induced silencing complex* (RISC). Die zur siRNA komplementäre mRNA wird gebunden und durch RISC gespalten und abgebaut (Abbildung 3.1). Bereits wenige Moleküle der dsRNA sind ausreichend um einen *Knock-down*-Effekt im Zielgen zu erreichen. Mit dieser Methode können 80-90 % der komplementären mRNA inaktiviert werden. Das *silencing*-Signal kann auch in Zellen, in denen die dsRNA nicht vorliegt, zum *Knock-down* des Zielgens führen, wodurch eine starke Hemmung der Genexpression erreicht werden kann. Die in *C. elegans* durchgeführte RNAi kann an die nächste Generation vererbt werden.

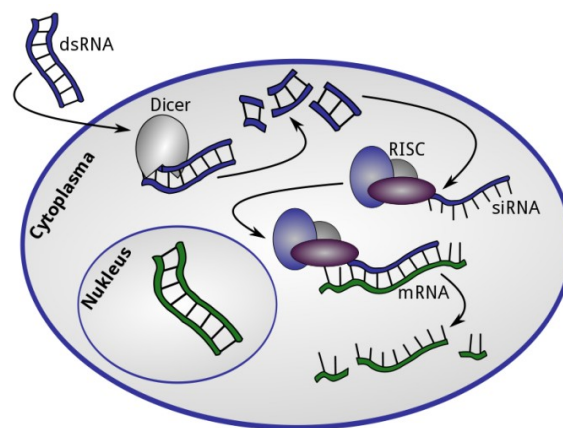


Abbildung 3.1 Das Prinzip der RNAi.

Doppelsträngige RNA (dsRNA) wird durch einen Enzymkomplex in *short interfering RNA* (siRNA)-Abschnitte gespalten. Diese lagern sich mit weiteren Proteinen zum *RNA-induced silencing complex* (RISC) zusammen, welcher die zur siRNA komplementäre *messenger RNA* (mRNA) bindet und abbaut.

Die Fütterungsmethode stellt eine einfache und effiziente RNAi-Methode in *C. elegans* dar. Hierzu werden *E. coli* HT115-Klone (Tabelle A 7.2) an Stelle der OP50 Bakterien an die Nematoden verfüttert, die eine spezifische dsRNA exprimieren. Diese HT115-Klone sind RNaseIII defizient und können somit keine dsRNA spalten. Sie enthalten ein Plasmid, den L4440-Vektor (Tabelle A 7.8), das die genspezifischen Regionen beidseitig von T7-Promotoren flankiert enthält. Dies ermöglicht die Transkription beider Stränge. Die Sequenz des Inserts eines Stranges ist komplementär zu einem Sequenzabschnitt des Zielgens, dessen Expression unterdrückt werden soll. Für die Transkription wird eine T7-RNA-

Polymerase benötigt, welche natürlicherweise in *E. coli* nicht vorkommt, jedoch in das Genom des verwendeten HT115-Stammes integriert ist. Die Expression der Polymerase wird durch IPTG induziert, das den Repressor vom Promotor abspaltet und so die Bildung der dsRNA induziert. Somit entstehen zunächst komplementäre RNA-Einzelstränge in den RNAi-Klonen, die zu dsRNA hybridisieren. Die dsRNA gelangt über den Intestinaltrakt ins Gewebe der Nematoden (Timmons *et al.* 2001).

Die Kultivierung von RNAi-Klonen erfolgte analog zur Aufzucht und Inkubation in NGM-Flüssigmedium. Die RNAi-Klone wurden aus den Glycerolkulturen der Stammsammlung (Tabelle A 7.2) auf 2xYT-Ampicillin-Tetracyclin-Agar-Platten (Tabelle A 7.13) nach dem „Drei-Ausstrich-Prinzip“ ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die kolonisierten Platten wurden bei 4 °C aufbewahrt. Ausgehend von einer Einzelkolonie wurden am nächsten Tag 3 ml Ampicillin-haltiges 2xYT-Medium angeimpft, so dass sich die Bakterien über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (Heidolph) bei 300 rpm vermehrten. 40 µl dieser Suspension wurden zum Animpfen von 2 ml Ampicillin-haltigem 2xYT-Medium verwendet und ca. 5 h unter Schütteln inkubiert, bis diese Tagkultur eine OD_{600nm} von ca. 0,4 erreichte. Um die Produktion der dsRNA zu induzieren, wurden anschließend dieser Tagkultur 2 µl 1 M IPTG zugegeben und 1 h inkubiert, bevor die Bakterien dann durch Zentrifugation (Hettich) (14.000 x g, 1 min) sedimentiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 1 ml NGM-Medium, 1 mM IPTG enthaltend, resuspendiert. Um verschiedene RNAi-Klone zu kombinieren, wurden die Bakterien der Tagkultur im entsprechenden Verhältnis gemischt.

3.3 Ermittlung der Lebensspanne unter Hitzestress

Die Bestimmung der Lebensspanne unter Hitzestress nach Gill *et al.* (2003) ist ein automatisiertes Verfahren, das die Viabilität von *C. elegans* misst. Diese wird mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYTOX Green (Molecular Probes, Tabelle A 7.3) bestimmt, der nur in tote Zellen eindringen kann. Dort interkaliert er in die doppelsträngige DNA und fluoresziert nach einer Anregung von 485 nm im Bereich von 535 nm (Roth *et al.* 1997).

Für die Bestimmung der Fluoreszenz wurden die mit M9-Puffer gewaschenen Würmer auf ein Uhrglas übertragen und unter dem Stereomikroskop ein Wurm in 1 µl Volumen pro Well

einer 384-Well-Platte (Greiner) vereinzelt. Zuvor wurden in jedes Well 6,5 µl M9-Puffer/Tween80 vorgelegt. Schließlich wurden 7,5 µl SYTOX Green (2 µM), gelöst in M9/Tween20, zu einem Gesamtvolumen von 15 µl pro Well hinzugegeben. Die 384-Well-Platten wurden mit einer Folie versiegelt, um Verdunstung zu vermeiden. Die Bestimmung der Fluoreszenz fand im Abstand von 30 min in einem Fluoroskan Ascent FL Fluoroluminometer (Thermo Labsystems, Tabelle A 7.30) statt, bei einer Temperatur von 37 °C (Abbildung 3.2). Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism (Version 5.0, GraphPad Software, Los Angeles, CA).

Für die Bestimmung der Lebensspanne unter Hitzestress-Bedingungen wurde für jedes Well die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt (Abbildung 3.2). Jede so erstellte Fluoreszenzkurve wurde analysiert, um den Todeszeitpunkt zu bestimmen und die Überlebenskurve zu generieren. Der Todeszeitpunkt konnte für jeden Wurm bestimmt werden, sobald die Basisfluoreszenz um 1 Stunde deutlich überschritten wurde. Die ausgewerteten Todeszeitpunkte wurden für jede Behandlungsgruppe als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Der Verlauf der Überlebenskurven unterschiedlicher Behandlungsgruppen wurde mit dem Mantel-Haenszel LogRank-Test verglichen. Die mittleren Lebensspannen wurden mit einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni *post hoc*-Test verglichen. Die maximale Lebensspanne wurde als Mittelwert (MW) der Lebensspanne der 10 % langlebigsten Würmer definiert, die mittlere Lebensspanne als der MW der Lebenszeiten aller Würmer. Das Signifikanzniveau der untersuchten Gruppen wurde wie folgt angenommen: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

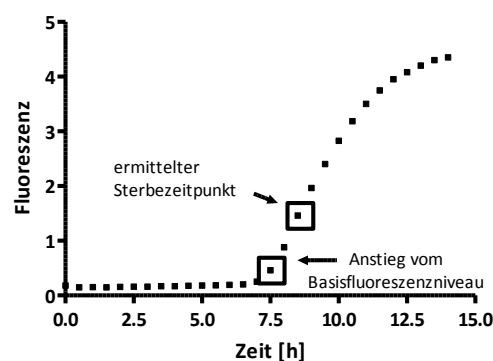


Abbildung 3.2 Typischer Verlauf einer Fluoreszenzkurve des Fluoroskan-Assay.

Jede Fluoreszenzkurve wurde analysiert, um den Todeszeitpunkt zu bestimmen und die Überlebenskurve zu generieren. Der Todeszeitpunkt konnte für jeden Wurm bestimmt werden, sobald die Basisfluoreszenz um 1 Stunde deutlich überschritten wurde. Die ausgewerteten Todeszeitpunkte wurden als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

3.4 Fluorometrische Detektion der H₂O₂-Produktion mittels Amplex UltraRed

Die H₂O₂-Sekretion in *C. elegans* lässt sich durch die Reaktion von Amplex UltraRed (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) zu intensiv fluoreszierendem Resorufin bestimmen (Extinktion: 532 nm, Emission: 583 nm). Die Reaktion läuft mit einer 1:1 Stöchiometrie ab, wobei aus einem Äquivalent Amplex UltraRed durch Umsetzung mit der gleichen Menge an Wasserstoffperoxid eine Formeleinheit Resorufin und Ethanal gebildet werden. Dabei dient die Meerrettich-Peroxidase als Katalysator. Dieses System ist hochsensitiv und diente zum quantitativen Nachweis kleinster Mengen an Wasserstoffperoxid.

Nach viermaligem Waschen der adulten Nematoden mit dem Reaktionspuffer (0,25 M Na₂HPO₄), wurden pro Well einer 96-Well-Platte ca. 100 Nematoden in 50 µl Reaktionspuffer pipettiert und mit der gleichen Menge AmplexRed Reagenz (Tabelle A 7.21) gemischt. Nach einer dreistündigen Inkubation unter Lichtausschluss wurde die Fluoreszenzintensität im Fluoroluminometer bei Raumtemperatur gemessen. Je Behandlungsgruppe wurden 5 Ansätze gemessen, dies entsprach etwa 500 Nematoden pro Gruppe.

Die Berechnungen wurden mit Graph Pad Prism 5.0 durchgeführt und die Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni-Test bzw. ungepaartem t-Test. Das Signifikanzniveau der untersuchten Gruppen wurde wie folgt angenommen: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

3.5 Fluoreszenzmikroskopische Analysen von *C. elegans*

20 µl Nematoden, die in M9-Puffer unter verschiedenen Bedingungen inkubiert (Kapitel) wurden, wurden auf einen Objektträger (Roth) überführt und 20 µl Levamisol (2 mM) (Sigma) hinzu pipettiert, um die Würmer zu betäuben. Digitale Aufnahmen betäubter *C. elegans* zur Expressionsquantifizierung wurden am Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 von Zeiss erstellt. Für Übersichtsaufnahmen wurden ein 5x- und ein 10x-Objektiv verwendet, für detaillierte Analysen ein 63x-Objektiv in Verbindung mit 10fach Okularen. Durch die Software Motic Images Plus 2.0 konnten die Aufnahmen als 24-Bit JPEG-Datei für weitere Auswertungen gespeichert werden.

3.5.1 Semiquantitative Analyse der subzellulären DAF-16::GFP-Lokalisation

Die Nematoden des Stamms TJ356 (Tabelle A 7.1) (transgen für DAF-16::GFP) wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop in folgende Kategorien klassifiziert: Nematoden, in denen DAF-16 hauptsächlich im Nukleus lokalisiert war, wurden als nukleär bezeichnet. Nematoden ohne erkennbare DAF-16-Akkumulation im Zellkern gehörten zu der Kategorie cytosolisch und bei keiner eindeutigen Zuordnung wurden die Nematoden zu der Kategorie intermediär gezählt. Die den jeweiligen Kategorien zugeordneten Nematoden wurden für jede Behandlung ausgezählt. Hierzu wurden die Tiere mit einer 100-fachen Vergrößerung hinsichtlich der subzellulären DAF-16::GFP-Lokalisation mit einem Filter (Anregung: 450 - 490 nm, Emission: 505 - 530 nm) mikroskopiert. Für die Auswertung wurden die Aufnahmen als 24-Bit JPEG-Datei mittels Motic Images Plus 2.0 Software gespeichert, bevor die ausgezählten Kategorien zur Kontrolle normiert wurden.

3.5.2 Quantifizierung der Cholesterolaufnahme mittels Fluoreszenzmikroskopie

Für die Messung der Cholesterolaufnahme wurde Dehydroergosterol (DHE) verwendet, ein Cholesterolanalogon. Verfahren wurde dabei nach der Methode von Wüstner *et al.* (2010). DHE absorbiert im ultravioletten Lichtspektrum und kann daher durch Anregung mit einer UV-Lichtquelle fluoreszenzoptisch (Anregung: 340-380 nm, Emission: 425 nm) nachgewiesen werden. Die Nematoden wurden ab dem L1-Larvenstadium mit NGM/Bakteriensuspension inkubiert, welches DHE statt Cholesterol enthielt. Mikroskopische Aufnahmen wurden mittels eines 10x-Objektives erstellt. Von jeder Behandlungsgruppe wurden 20 Würmer fotografiert, wobei der Bildausschnitt so gewählt war, dass der Wurm vollständig erfasst wurde. Über eine Kamera (Motic 5000) wurde das Bild auf einen PC übertragen und dort mit dem Programm Motic Images Plus erfasst. Die Aufnahmen wurden für die Auswertung mittels ImageJ (Tabelle A 7.32) im 24-Bit-JPEG-Format gespeichert.

3.5.3 Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie

Aufnahmen des transgenen Stamms *zmp-2(2.1)::gfp* wurden an einem konfokalen Lasermikroskop (TCS SP2 confocal microscope (Leica, Bensheim, Germany)) erstellt. Die Nematoden wurden hierzu ebenfalls zunächst mit M9-Puffer gewaschen und mit Levamisol betäubt. Die GFP-Expression jedes Entwicklungsstadiums wurde dabei durch einen Helium-Neon (HeNe)-Laser (Anregungswellenlänge: 633 nm; Emissionsbereich: 644 – 723 nm), einen Gre-Neon (GreNe)-Laser (Anregungswellenlänge: 543 nm; Emissionsbereich: 584 – 663 nm) sowie einen Argon/Argon-Krypton (Ar/ArKr)-Laser (Anregungswellenlänge: 488 nm, Emissionsbereiche: 498 – 557 nm in Kombination mit dem HeNe-Laser; 498 – 533 nm in Kombination mit dem GreNe-Laser) detektiert. Die Aufnahmen wurden bei 630-facher Vergrößerung, einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel und einem *Line Average* von 2 erstellt.

3.5.4 Epifluoreszenzmikroskopie zur Quantifizierung mitochondrialer ROS-Bildung

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs MitoTracker Red CMH₂XRos (Invitrogen) können mitochondrial lokalisierte ROS am Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. MitoTracker Red wurde in einer Konzentration von 0,5 µM eingesetzt und die Nematoden ab dem L1-Larvenstadium inkubiert. Der Mitochondrien-selektive Farbstoff fluoresziert in der reduzierten Form nicht. Er akkumuliert in den Mitochondrien durch die Reaktion mit Thiolgruppen mitochondrialer Proteine und Peptide, nachdem er zu CMXRos oxidiert wurde. Nach der Oxidation fluoresziert der Farbstoff rot und kann zur Quantifizierung der ROS-Bildung dienen. Dabei besaß CM-H₂XRos ein Anregungsmaximum von 579 nm und ein Emissionsmaximum von 599 nm. Die Aufnahmen wurden im 24-bit-jpeg-Format erstellt, welche mittels ImageJ quantitativ ausgewertet wurden.

3.5.5 Graphische Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie

Die erstellten Bilder wurden mittels ImageJ quantitativ ausgewertet. Hierzu wurden die Bilder durch einen RGB-Split in drei einzelne 8-Bit-Graustufenbilder getrennt. Je nach Fluoreszenz wurde der grüne (GFP), rote (MitoTracker) oder blaue (DHE) Farbkanal weiter

verwendet. Zunächst wurden störende Objekte wie Larven oder Teile anderer Würmer retuschiert, bevor ein unterer Grenzwert so festzulegen war, dass die Auswahl der selektierten Pixel den Wurm vollständig einschloss, bei möglichst geringem Hintergrundrauschen. Für die durch einen einheitlich festgelegten Grenzwert selektierten Pixel wurde die integrierte Dichte des Gesamtbildes als Maß für die Fluoreszenzintensität bestimmt. So wurden kumulierte Grauwerte der ausgewählten Pixel erstellt, die mittels GraphPad Prism 5.0 statistisch ausgewertet werden konnten. Die statistische Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Bonferroni-Test. Das Signifikanzniveau der untersuchten Gruppen wurde wie folgt angenommen: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 Herstellung der *vit*-RNAi-Klone

Vit-2- und *vit-6*-RNAi-Klone wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die dafür angewendeten Methoden werden im Folgenden beschrieben.

3.6.1.1 RNA-Präparation aus Nematoden mit Trizol

Für die RNA-Extraktion wurden insgesamt 10.000 – 15.000 Würmer benötigt, die nach 10-maligem Waschen mit M9-Puffer und anschließender 2-stündiger Inkubation in M9-Puffer bei Raumtemperatur im Überkopf-Schüttler mittels Zentrifugation pelletiert wurden (2 min, 14.000 rpm). Das Wurmpellet wurde mit 1 ml Trizol (Fisher Scientific) versetzt, 2 min in ein Ultraschallbad (Bandelin electronics) gestellt und zwischenzeitlich mehrfach gevortext, um die Würmer vollständig zu homogenisieren. Es folgte eine 2-stündige Inkubation bei -80°C .

Das Homogenisat wurde bei Raumtemperatur aufgetaut, mehrfach gevortext und 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 400 μl Chloroform (Roth) versetzt, gründlich gevortext und anschließend 5 min bei Raumtemperatur und 10 min auf Eis inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C konnte die RNA aus der wässrigen Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Durch Zugabe von

500 µl Isopropanol (Sigma), anschließendem Vortexen und 5-minütiger Inkubation auf Eis wird die RNA präzipitiert und durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, 14.000 rpm) pelletiert. Nach dem Waschen des RNA-Pellets mit 75 % Ethanol wurde das Pellet unter der Sterilbank (Heraeus) bis zur Transparenz getrocknet. Das RNA-Pellet wurde mit 20 – 50 µl (je nach Pelletgröße) sterilem H₂O bidest. und RNAsin (v/v 999:1) aufgenommen und nach vollständigem Lösen der RNA mittels Nano-Drop (Nano-Drop® 1000, PeqLab Biotechnologie GmbH) deren Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die extrahierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.6.1.2 Reinheitsgrad der DNA und RNA

Um den Reinheitsgrad, die Konzentration und Integrität der aufgereinigten DNA und RNA zu bestimmen wurde deren OD bei 260 und 280 nm am Spectrophotometer gemessen. Dafür wurden die Proben kurz zentrifugiert, je 1 µl Probevolumen auf den Sensor aufgebracht und die gemessene DNA- bzw. RNA-Konzentration (in µg/µl) protokolliert. Basierend auf dem Absorptionsquotienten 260 nm zu 280 nm hat sich bei den RNA-Proben ergeben, dass keine der Proben Verunreinigungen aufwiesen.

3.6.1.3 Reverse Transkription der *C. elegans* Gesamt-RNA

Die Erststrangsynthese, in der die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wird, erfolgte nach Herstellerangaben des RevertAid Kits von Fermentas. Für die Synthese wurde der vit-2-RNAi-rev-4861 bzw. vit-6-rev-4793 Primer (Tabelle A 7.6) verwendet. Nach Auftauen der RNA auf Eis wurden in einem ersten Schritt folgende Bestandteile in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

RNA [1,8 µg/µl]	5 µl	
vit-2-RNAi-rev-4861 [10 µM]	1 µl	bzw.
vit-6-rev-4793 [10 µM]	1 µl	
dNTP-Mix [10 mM]	1 µl	
H ₂ O	7,5 µl	

Nach 5-minütiger Denaturierung bei 65 °C wurde das Gemisch gevortext und auf Eis abgekühlt. Die Synthese wurde nun in einem zweiten Schritt durch Zugabe folgender Bestandteile gestartet:

5 x RT-Puffer	4 µl
RNAse-Inhibitor	0,5 µl
Reverse Transkriptase [200 U/µl]	1 µl

Die Transkription erfolgte für 30 min bei 50 °C, die anschließende Enzym-Inaktivierung für 5 min bei 85 °C. Die entstandene cDNA wurde bei -20 °C gelagert und diente als Template für die Polymerase Kettenreaktionen (PCR) (Kapitel 3.6.1.4).

3.6.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die in der reversen Transkription synthetisierte cDNA wurde mittels PCR und spezifischer *vit-2* bzw. *vit-6*-Primer *in vitro* amplifiziert. Das Amplifikat von *vit-2* ist 450 bp groß, das von *vit-6* 700 bp. Die hier verwendete *Taq*-Polymerase von Fermentas besitzt ein Temperaturoptimum von 72 °C.

Ein Reaktionsansatz von 50 µl enthält folgende Bestandteile (Tabelle 3.1):

Tabelle 3.1 Reaktionsansatz für die PCR.

Reaktionsgemisch	Vit-2	Vit-6
cDNA aus RT	2 µl	2 µl
10 x Reaktionspuffer	5 µl	5 µl
<i>vit-2</i> -RNAi-fw-4411 (10 µM)	2,5 µl	
<i>vit-2</i> -RNAi-rev-4861 (10 µM)	2,5 µl	
<i>vit-6</i> -fw-4084 (10 µM)		2,5 µl
<i>vit-6</i> -rev-4793 (10 µM)		2,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,75 µl	1,75 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	1,25 µl	1,25 µl
H ₂ O steril	35 µl	35 µl

Die PCR wurde in dem Thermocycler Primus25 von PeqLab nach Saiki *et al.* (1988) durchgeführt und das folgende Programm gewählt:

94 °C	2 min	initiale Denaturierung	
94 °C	30 sec	Denaturierung	} 35 Zyklen
55 °C	1 min	Annealing	
72 °C	5 min	Elongation	
72 °C	10 min	terminale Elongation	

Die PCR-Produkte wurden bei -20 °C gelagert.

3.6.1.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld in 1 x TAE-Puffer (Tabelle A 7.9) und wurde zur Überprüfung der richtigen Größe der PCR-Produkte benutzt.

Zur Herstellung eines 1 % Agarosegels wurden 0,4 g Agarose mit 40 ml 1 x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen mit 1,5 µl Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) (Roth) oder 4 µl SYBR Safe (Molecular Probes) versetzt. Die Farbstoffe interkalieren in der aufgetrennten DNA und sind so unter UV-Licht (EtBr) bzw. Blaulicht (SYBR Safe) sichtbar.

10 µl des PCR-Ansatzes wurden mit 2 µl 6x Beladungspuffer (Tabelle A 7.9) versetzt und in die Taschen pipettiert, wobei die erste Tasche mit einem 100 bp Größenmarker (Fermentas) beladen war. Die Auftrennung erfolgte 1 h bei 80 V, die Detektion der DNA-Banden unter UV-Bestrahlung wurde durch eine Kamera dokumentiert.

Die in dieser Arbeit entstandenen PCR-Produkte waren 450 bp (*vit-2*) und 700 bp (*vit-6*) groß, welche der Größe der im Gel abgelesenen Banden entsprechen (Abbildung 3.3).

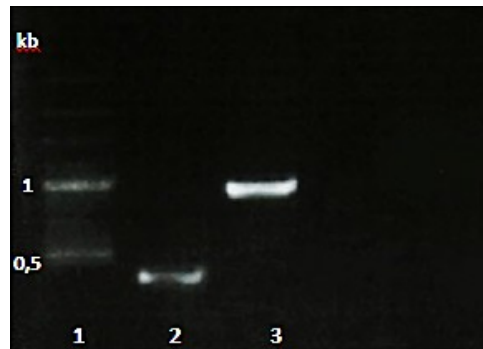


Abbildung 3.3 DNA-Gelelektrophorese zur Überprüfung des *vit-2*- und *vit-6*-Inserts.

Tasche 1: DNA-Größenmarker 100bp Plus, Tasche 2: *vit-2*-PCR-Produkt (450 bp), Tasche 3: *vit-6*-PCR-Produkt (700 bp).

3.6.1.6 Ligation der *vit*-PCR-Amplifikate in den pCR2.1-Vektor

Der pCR2.1-Vektor des TOPO[®] TA Cloning Kits (Tabelle A 7.4) ermöglichte ein TA-Cloning, da er einen T-Überhang besitzt. An letzteren ligiert der A-Überhang der *vit*-PCR-Produkte, der durch die Taq-Polymerase (Invitrogen), die eine terminale Transferase-Aktivität besitzt, gebildet wird. Die *vit*-RNAi-Amplifikate können so vermehrt und aufbewahrt werden.

Der Ligationsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Frisches PCR Produkt	1 μ l
Salzlösung	1 μ l
H ₂ O	3 μ l
pCR2.1-TOPO [®] Vektor	1 μ l

Wurde das PCR-Produkt bei -20 °C gelagert, sollte zuvor eine zusätzliche Endsynthese von 10 min bei 72 °C durchgeführt werden.

Beim TA-Vektor sind beide Schnittstellen mit Topoisomerase über kovalente 3'-Phosphotyrosyl-Bindungen blockiert, deshalb ist keine Selbstligation möglich und Fragmente mit freien 5'-OH-Enden (PCR-Produkte oder dephosphorylierte DNA) können so innerhalb 5 min ligiert werden.

Die Reaktion wurde daher bei Raumtemperatur 5 min inkubiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.6.1.7 Plasmid-Transformation in chemisch-kompetente *E. coli*- Zellen

Die Ligation wurde in TOP10F' (Invitrogen) chemisch-kompetente *E.coli* von Invitrogen transformiert, indem die Plasmid-DNA in durch Ca^{2+} -Präzipitation permeabilisierte Bakterien eingeschleust wurden (Cohen *et al.* 1972).

50 μl kompetenter *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 μl des jeweiligen Ligationsansatzes vorsichtig versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C und Kälteschock für 5 min auf Eis, wurden 250 μl SOC-Medium (BioLabs) hinzugegeben und die Zellen 1 h im 37 °C-Inkubator geschüttelt (300 rpm).

Nach dieser Regenerationsphase wurden die Bakterien zur Kultivierung auf 2xYT-Ampicillin-Platten ausgestrichen und dabei einer Blau-Weiß-Selektion (Langeley *et al.* 1975) unterzogen. Grundlage dieser Selektion ist die durch die Klonierung eines DNA-Fragments/Inserts in den pCR2.1-Vektor erfolgende Zerstörung des lacZ-Gens. Dadurch können Bakterien, welche die DNA-Plasmide mit Insert aufgenommen haben, den Farbstoff X-Gal (Roth) nicht spalten und damit keinen blauen Farbstoff bilden. Zum Nachweis der erfolgten Integration des Inserts wurden auf 2xYT-Ampicillin-Agarplatten je 40 μl IPTG [100 mM] und X-Gal [40 mg/ml] ausgestrichen. Nachdem die Platten angetrocknet waren, wurden 50 μl der Transformationsansätze pro Platte aufgetragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Aus den weißen Kolonien wurden am nächsten Tag Über-Nacht-Kulturen erstellt und auf das korrekte Insert hin überprüft.

3.6.1.8 Plasmid-DNA Präparation

Mittels Minipräparation (FastPlasmid Mini Kit 5'Prime, Tabelle A 7.4) wurde die Extraktion rekombinanter Plasmid-DNA aus einer Über-Nacht-Kultur (Sambrook *et al.* 1989) zwecks Überprüfung der richtigen Größe des Insters (Abbildung 3.3) durchgeführt.

Den Angaben des Herstellers (5'Prime) entsprechend, wurden 2 ml der Über-Nacht-Kultur 30 sec bei 14.000 rpm zentrifugiert und das Bakterienpellet mit 400 μl Lysispuffer resuspendiert. Nach 3-minütiger Inkubation wird das Lysat in ein *Spin-Column-Assembler*

überführt und 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um die DNA an den Filter zu binden. Nachdem die Säule mit Waschpuffer gereinigt und durch Zentrifugation getrocknet wurde, wurde sie in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 30 µl Elutionspuffer auf die Filtermembran gegeben. Nach 1-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die eluierte DNA wird auf Eis gelagert oder bei -20 °C eingefroren.

Die Methode wurde zur Präparation des pCR2.1-Vektors mit dem entsprechenden *vit*-Insert aus den TOP10F'-Zellen, als auch des für RNAi-Versuche benötigten L4440-Vektors aus den *DH5α*-Bakterien (Tabelle A 7.2) verwendet. Die Präparation großer Plasmid-DNA-Mengen wurde mit Kit-System Plasmid Midi (Tabelle A 7.4) nach Angaben des Herstellers Qiagen durchgeführt.

Die Sequenzierung reiner Plasmid-DNA, zur Überprüfung des richtigen Inserts, wurde am Sequenzierlabor des interdisziplinären Forschungszentrums der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

3.6.1.9 Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA

Dieser Verdau diente dazu die *vit*-Inserts aus dem pCR2.1-Vektor heraus zu schneiden, sowie den L4440-Vektor zu verdauen, um die *vit*-Inserts hinein zu ligieren. Das Reaktionsvolumen für analytische Versuche betrug 10 µl, das für präparative Versuche 50 µl. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und zusammen mit den Restriktionsendonukleasen (*Hind*III, *Xho*I) (Tabelle A 7.5) und dem entsprechenden Reaktionspuffer 4 h bei 37 °C inkubiert.

Plasmid-DNA [4 µg/µl]	10 µl
Reaktionspuffer	5 µl
<i>Hind</i> III	3 µl
<i>Xho</i> I	3 µl
H ₂ O	29 µl

3.6.1.10 DNA-Extraktion aus dem Agarosegel

Die präparative Auftrennung der verdauten DNA-Fragmente zu ihrer Isolierung und anschließender Extraktion erfolgte in einem 1 % Agarosegel in 1 x TAE-Puffer bei 80 V. Dafür wurden die Taschen mit je 50 µl Verdau-Ansatz und 10 µl Beladungspuffer beladen und 1 h lang aufgetrennt. Die Banden (*vit-2* 450 bp, *vit-6* 700 bp, L4440-Vektor ca. 3000 bp) wurden mit SYBR Safe unter Blaulicht sichtbar gemacht (Abbildung 3.4), herausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers (Peqlab) mit dem Gel Extraction Kit (Tabelle A 7.4) extrahiert.

Dazu wurden pro 100 mg herausgeschnittenem Gel 100 µl *Binding Buffer* hinzugefügt, ca. 7 min bei 55 – 65 °C inkubiert, gevortext und der Mix vollständig auf eine *Perfect Bind* DNA Säule geladen. Um die DNA an die Silikonmembran der Säule zu binden wurde 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert und anschließend zweimal mit 600 µl *CG Wash Buffer* durch nochmaliges Zentrifugieren (1 min, 10.000 x g) gewaschen. Nachdem die Säulen durch Zentrifugieren unter den gleichen Bedingungen getrocknet wurden, wurden 30 µl *Elution Buffer* auf die Matrix pipettiert, 1 min inkubiert und nochmals zentrifugiert (1 min, 5.000 x g). Die Konzentration und der Reinheitsgrad der isolierten DNA wurden mittels Nano-Drop bestimmt (3.6.3).

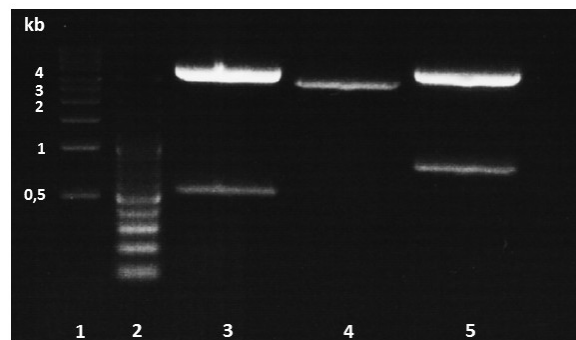


Abbildung 3.4 Restriktionsverdau unterschiedlicher Plasmid-DNA.

Taschen 1 und 2: DNA-Größenmarker (1 kb bzw. 100 bp). Tasche 3: Restriktionsverdau von pCR2.1-Vektor (~ 4 kb) und *vit-2*-Insert (~ 500 bp + ~ 100 bp MCS). Tasche 4: Restriktionsverdau des L4440-Vektor (~ 3 kb). Tasche 5: Restriktionsverdau von pCR2.1-Vektor (~ 4 kb) und *vit-6*-Insert (~ 700 bp + ~ 100 bp MCS).

3.6.1.11 Ligation der *vit*-Insert in den L4440-Vektor

Bei dieser Ligation wurden die 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle mittels der T4-Ligase verknüpft. Dafür wurden die nach dem Verdau aus dem Gel aufgereinigten *vit*-Fragmente mit dem L4440-Vektor im molaren Verhältnis 3:1 gemischt und

zusammen mit der T4-Ligase (Fermentas) und dem Puffer über Nacht bei 15 °C sowie für weitere 5-6 h bei 4 °C inkubiert.

L4440 [53 ng/μl]	0,5 μl
<i>vit-2</i> -RNAi-Insert [18 ng/μl]	1,5 μl bzw.
<i>vit-6</i> -RNAi-Insert [20 ng/μl]	1,5 μl
10 x Ligationspuffer	3 μl
T4 DNA-Ligase [2 U/μl]	2 μl
H ₂ O	23 μl

Die *Clone-Charts* der erstellten RNAi-Konstrukte sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

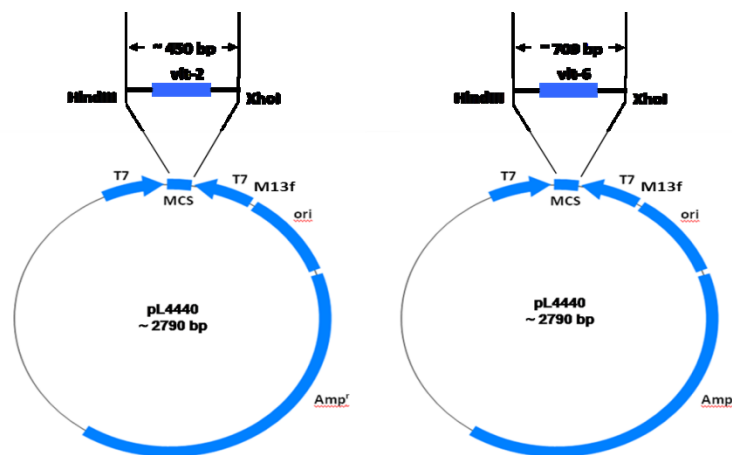


Abbildung 3.5 Schematische Darstellung der erstellten *vit*-RNAi-Plasmide im pL4440-Vektor.

3.6.1.12 Herstellung kompetenter HT115-Bakterien

Die *vit*-RNAi-Plasmide wurden nun in HT115-Bakterien (Tabelle A 7.2) transformiert, damit RNAi-Versuche in *C. elegans* durchgeführt werden konnten. Diese Zellen besitzen keine RNaseIII-Aktivität und sind deshalb besonders zur Produktion von dsRNA geeignet. Für eine Transformation wurden sie zunächst chemisch kompetent gemacht.

Eine Kolonie der HT115-Zellen wurde gepickt und in 10 ml 2xYT-Medium bei 37 °C 6 h geschüttelt. Nach der anschließenden 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 2.700 x g. Das Pellet wurde mit 30 ml eiskalter MgCl₂/CaCl₂-

Lösung (Tabelle A 7.20) vorsichtig resuspendiert, worauf eine weitere Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen und Resuspension mit 4 ml eisgekühlter CaCl_2 -Lösung folgten.

Die Zellen wurden entweder direkt für die Transformation eingesetzt oder nach Versetzen mit 15 % Glycerin als Aliquots bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.6.1.13 Transformation der *vit*-RNAi-Plasmide in kompetente HT115-Bakterien

Die ligierten *vit*-RNAi-Plasmide wurden in die chemisch-kompetenten HT115-Bakterien wie unter 3.6.4.4 beschrieben transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf 2xYT-Agar-Platten mit Ampicillin und Tetracyclin als Selektions-Antibiotika ausgestrichen, wobei der L4440-Vektor eine Ampicillin-Resistenz besitzt und die Tetracyclin-Resistenz im HT115-Bakterien-Genom integriert ist. Die Selektion erfolgte hier lediglich über die Antibiotika-Resistenz, ein Blau-Weiß-*Screening* ist aufgrund des in der MCS fehlenden *LacZ*-Gens nicht möglich.

Deshalb wurden die Kolonien mittels PCR auf das Vorhandensein des richtigen Inserts getestet. Der PCR-Ansatz entsprach dem in Tabelle 3.1 dargestellten, wobei als Primerpaar pL4440-RNAi-FOR und pL4440-RNAi-REV (Tabelle A 7.6) verwendet wurden. Aufgrund der Bindungsstellen der Primer und der Fragment-Größe der Inserts, ergab sich für *vit-2* eine Amplifikationsgröße von ca. 700 bp und für *vit-6* von ca. 950 bp. Zusätzlich zum Restriktionsverdau wurden die Konstrukte mittels Sequenzierung mit T7 und M13f überprüft.

3.6.2 Nachweise der Funktionalität der *vit*-RNAi-Konstrukte

***Vit-2*-RNAi-Konstrukt**

Der funktionelle Nachweis für den erstellten *vit-2*-RNAi-Klon erfolgte durch Fütterung des transgenen Stamms *vit-2::gfp* (RT130). Die Nematoden wurden ab dem L1-Larvenstadium 3 Tage bis zum jung-adulten Stadium in NGM-Flüssigmedium, das die entsprechenden HT115-Bakterien enthielt, aufgezogen und anschließend die *vit-2::GFP*-Expression photographisch am

Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2, Zeiss) ausgewertet. HT115-Bakterien, die ein leeres L4440-Plasmid enthielten, wurden der Kontrollgruppe verfüttert.

Fluoreszenzmikroskopische Bilder der *vit-2::gfp* Nematoden sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Nematoden, an denen eine *vit-2*-RNAi durchgeführt wurde, keine Fluoreszenz mehr aufweisen, die Expression von VIT-2::GFP also vollständig gehemmt ist. Die Kontrolle exprimiert hingegen an den charakteristischen Stellen VIT-2::GFP.

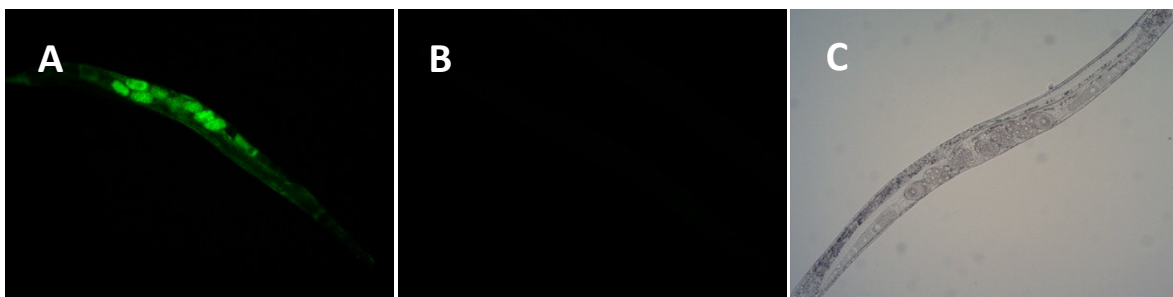


Abbildung 3.6 Funktioneller Nachweis des *vit-2*-RNAi-Klons in *vit-2::gfp* Nematoden durch Fluoreszenzmikroskopie.

A: Kontrolle, **B:** *vit-2*-RNAi, **C:** *vit-2*-RNAi; identischer Wurm in Bildern B und C; A und B zeigen Anregung mit Fluoreszenzlicht, bei C handelt es sich um eine Durchlichtaufnahme (DIC-Aufnahme)

***Vit-6*-RNAi-Konstrukt**

Der funktionelle Nachweis für den ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit erstellten *vit-6*-RNAi-Klon erfolgte über eine Western Blot-Analyse (3.7.1). Hierzu wurden die Nematoden ab dem L1-Larvenstadium mit den *vit-6*-RNAi-Klonen gefüttert. Nach Erreichen des jung-adulten Stadiums wurden die Nematoden in Lysispuffer aufgenommen, homogenisiert und das Homogenisat unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE getrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und der Western Blot mit einem Antikörper gegen VIT-6 durchgeführt.

VIT-6 wird als einziges Vitellogenin im Pseudocoelom zu yp115 und yp88 gespalten, welche über Disulfidbrücken zu einem Heterodimer (yp170) komplexieren. Diese Banden sind in der Western Blot Analyse deutlich zu erkennen und wurden zur Quantifizierung der VIT-6-Expression herangezogen.

Wie in Abbildung 3.7 ersichtlich, ist die *vit-6*-Expression nach *vit-6*-RNAi stark vermindert. Die relative VIT-6-Expression liegt im Vergleich zur Kontrollgruppe bei ca. 13 %.

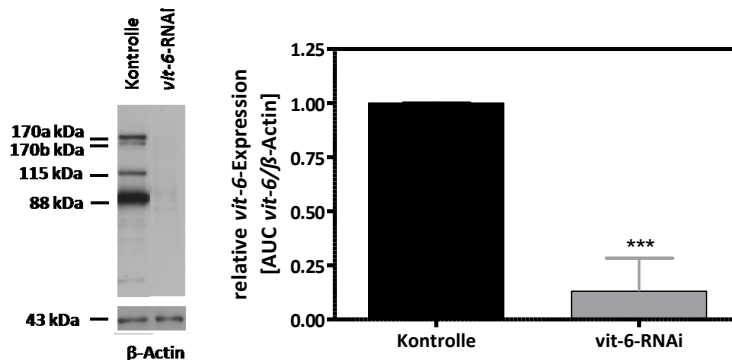


Abbildung 3.7 Western Blot Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in *C. elegans* nach *vit-6*-RNAi.

Links ist eine repräsentative Western Blot Analyse mit Referenzprotein β-Actin dargestellt. Die molekularen Massen der Proteine sind links in kDa angegeben. Die Quantifizierung der VIT-6-Expression im Verhältnis zu β-Actin wurde mittels Densitometrie ermittelt (rechts). Dargestellt sind MW ± SD (n = 3). *** p < 0,001

Durch die hohe genetische Verwandtschaft der Vitellogenine kann es durch *vit-2*-RNAi eventuell auch zu einer VIT-6-Expressionsminderung kommen. Dies konnte bestätigt werden durch einen VIT-6-Protein-Nachweis nach *vit-6*-RNAi Abbildung 3.8. Die relative VIT-6-Expression *vit-2*-RNAi behandelter Nematoden ist im Vergleich zur Kontrollgruppe bei 59 (± 12) %.

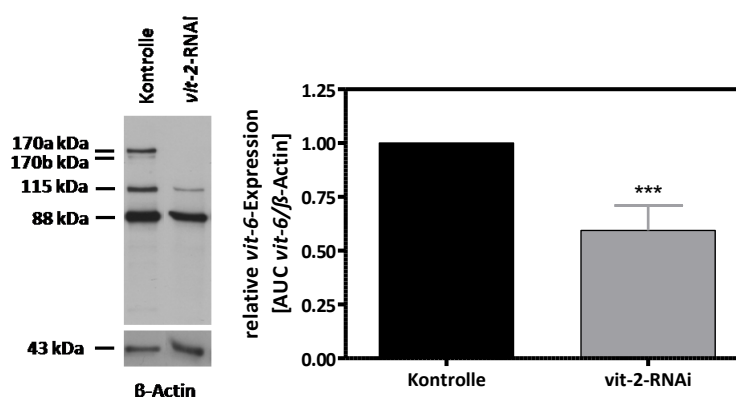


Abbildung 3.8 Western Blot Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in *C. elegans* nach *vit-2*-RNAi.

Links ist eine repräsentative Western Blot Analyse mit Referenzprotein β-Actin dargestellt. Die molekularen Massen der Proteine sind links in kDa angegeben. Die Quantifizierung der VIT-6-Expression im Verhältnis zu β-Actin wurde mittels Densitometrie ermittelt (rechts). Dargestellt sind MW ± SD (n = 3). *** p < 0,001

3.6.3 Quantifizierung der *vit-2*- und *vit-6*-Expression mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR)

Diese Methode ermöglicht eine DNA-Quantifizierung in Echtzeit, indem eine Fluoreszenz-Messung am Ende eines jeden PCR-Zyklus durchgeführt wird. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die eingesetzte mRNA wird durch den Einsatz des BrilliantII SYBR[®] Green (SG) QRT-PCR-Mastermix 1-Step Kits (Stratagene Products) (Tabelle A 7.4) in cDNA umgeschrieben, weshalb eine separate reverse Transkription entfällt. Als Referenzgen diente das ubiquitär vorkommende 18S. Es ist Bestandteil der 80S Ribosomen in Eukaryoten, leicht zu detektieren und seine Expression variiert nicht während des Zellzyklus oder auch als Antwort auf eine experimentelle Behandlung. Die qRT-PCR wurde unter Verwendung des CFX96 *Real-Time* PCR Detection Systems (Bio-Rad) durchgeführt. Dieses System enthält neben einem Thermocycler ein optisches System zur Fluoreszenz-Detektion.

N2 Wildtyp Nematoden wurden im Rahmen dieser Arbeit mit 17 β -Östradiol [10 μ M], Genistein [10 μ M], Cholesterol [0, 50, 250, 500 μ g/ml] und *P. luminescens* inkubiert und anschließend die *vit-2*- und *vit-6*-mRNA-Expression quantifiziert. Nematoden ohne Behandlung mit Effektoren wurden als Kontrollgruppe mitgeführt. Die 4-tägige Inkubation erfolgte in jeweils 5 48-Well-Platten (10.000 – 15.000 Nematoden), worauf die RNA-Extraktion stattfand (3.6.2). Mittels Nano-Drop wurden die aus den Nematoden isolierte RNA durch Verdünnen mit RNase-freiem H₂O auf Konzentration von je 0,01 ng/ μ l zur Quantifizierung der 18S RNA bzw. 10 ng/ μ l zur Quantifizierung der *vit-2*- bzw. *vit-6*-mRNA eingestellt. Die qRT-PCR-Ansätze hatten ein Volumen von 10 μ l pro Reaktionsgefäß (Greiner) und setzten sich wie folgt zusammen:

SG-Mastermix	5 μ l
Reverse Transkriptase [200 U/ μ l]	0,4 μ l
Forward Primer [1 μ M]	0,75 μ l
Reverse Primer [1 μ M]	1,25 μ l
Template-RNA	1 μ l
H ₂ O (RNase frei)	1,6 μ l

Das Pipettieren erfolgte unter sterilen Bedingungen, wobei die Ansätze während der gesamten Zeit auf Eis gekühlt wurden. In einem ersten Schritt wurden die Primerpaare (Tabelle A 7.6) in jedes Well vorgelegt (2 μ l), gefolgt von dem SG-Mastermix (Stratagene Products), der Reversen Transkriptase und dem H₂O. Zuletzt wurde 1 μ l RNA Template pro Well hinzu pipettiert. Jede Versuchsgruppe wird sowohl mit Primern für das Referenzgen 18S als auch mit *vit-2*- bzw. *vit-6*-Primern amplifiziert und 4-fach bestimmt.

Nach sorgfältigem Verschließen der Reaktionsgefäße wurde für die Durchführung der *One-Step*-qRT-PCR folgendes Programm gewählt:

50 °C	15 min	Reverse Transkription	
95 °C	10 min	initiale Denaturierung	
95 °C	30 sec	Denaturierung	} 40 Zyklen
53 °C	15 sec	Annealing	
60 °C	30 sec	Elongation	
95 °C	1 min	terminale Elongation	
53 °C	30 sec	Schmelzkurve	
95 °C	1 min	Schmelzkurve	

Mittels der CFX Manager Software (BioRad, Tabelle A 7.32) wurden die generierten Fluoreszenzdaten nach jedem Lauf automatisch verarbeitet und als Fluoreszenzsignal pro Zyklus dargestellt. Anschließend wurden sie hinsichtlich relativer Unterschiede quantifiziert.

Als Basis für die relative Quantifizierung der *vit-2*- und *vit-6*-mRNA-Expression nach Pfaffl *et al.* (2001) dienten die von der CFX Manager Software (BioRad) generierten Kurven. Der Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, wurde als *Threshold Cycle* (CT-Wert) angegeben. Da jede Behandlungsgruppe 4-fach bestimmt wurde, wurde ein MW der 4 CT-Werte gebildet, mit welchem als CT-Wert weiter verfahren wurde. Zunächst wurde die Expression des Zielgens *vit-2* bzw. *vit-6* mit dem Referenzgen 18S normalisiert, um Variationen in den anfangs eingesetzten RNA-Templates zu relativieren. Die unterschiedliche Genexpression wurde als n-fache Expression (Ratio) von der Kontrollgruppe angegeben. Die Auswertung erfolgte dabei nach der $\Delta\Delta$ CT-Methode. Dabei wurden die CT-Werte des Referenzgens von denen des Zielgens subtrahiert (Δ CT) und anschließend die beiden Δ CT-Werte der Kontrolle und der Behandlungsgruppe voneinander

abgezogen ($\Delta\Delta$ -CT-Wert). Die relativen Expressionsunterschiede konnten dann durch eine Ratio der $\Delta\Delta$ CT-Werte ermittelt werden:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT Zielgen} - \text{CT Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT Behandlung} - \Delta\text{CT Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

Die Berechnungen der Gleichungen wurden mit Graph Pad Prism durchgeführt und in Form von Balkendiagrammen mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni-Test bzw. ungepaartem t-Test. Die Ergebnisse wurden in GraphPad Prism 5.0 durch Balkendiagramme der Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Das Signifikanzniveau der untersuchten Gruppen wurde wie folgt angenommen: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

3.6.4 Herstellung des transgenen Stammes *zmp-2(2.1)p::gfp*

Der folgend beschriebene transgene Stamm *zmp-2::gfp* wurde im Rahmen dieser Arbeit in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Vilcinskas (Giessen), PD Dr. habil Boran Altincicek (Bonn) und Dr. Kai Lüersen (Münster) hergestellt.

3.6.4.1 Präparation genomischer DNA aus *C. elegans*

Genomische DNA (gDNA) diente als Template zur Herstellung des Transgens. *C. elegans* von 5 vollbewachsenen 9 cm-NGM-Agarplatten wurden mittels M9-Puffer von den Platten gewaschen und mindestens 5 mal im gleichen gewaschen, um die Tiere von den Bakterien zu befreien. Nach anschließender Zentrifugation (14.000 x g, 2 min) wurden 60 μl des Nematoden-Pellets mit 100 μl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,5) vermischt und bei 95 °C 50 min inkubiert. Nach weiterer Zentrifugation wurden 100 μl des Überstandes abgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.6.4.2 Nested PCR

Bei der *nested* PCR werden zwei PCR-Reaktionen mit verschiedenen Primerpaaren nacheinander geschaltet, um gegenüber der PCR mit nur einfachen Primerpaaren die Sensitivität und Spezifität zu steigern. Ein Aliquot des PCR-Produktes der ersten Amplifikation diente als Matrize für die zweite PCR. Bei dieser bindet ein weiteres Primerpaar an die Sequenzbereiche innerhalb der in der ersten PCR amplifizierten Matrize, mit resultierenden kürzeren, hochspezifischen DNA-Fragmenten. Die verwendeten Primer sind in Tabelle A 7.6 mit entsprechender Sequenz aufgelistet.

Reaktionsansatz für die erste PCR (2,6 kb PCR-Produkt):

gDNA	1 µl
Neu-CeleMMP5-For1 [10 µM]	1 µl
MMP5-rev3 [10 µM]	1 µl
H ₂ O	13 µl
Red Taq [1 U/µl]	2 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl

Reaktionsansatz für die zweite PCR (2,1 kb):

Template-Amplifikation aus erster PCR	1 µl
CeleMMP5-For2 [10 µM]	1 µl
MMP5Pro-Rev2 [10 µM]	1 µl
H ₂ O	13 µl
Red Taq [1 U/µl]	2 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl

Die Reaktionen beider PCRs wurden unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

96 °C	2 min	Initiale Denaturierung	
96 °C	20 sec	Denaturierung	} 35 Zyklen
60 °C	30 sec (1. PCR),		
62 °C	30 sec (2. PCR)	Annealing	
72 °C	2,5 min	Elongation	
72 °C	10 min	Terminale Elongation	

10 µl der amplifizierten DNA-Moleküle wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die restliche PCR-Probe bei -20°C gelagert. Nach Auftrennung in einem Agarosegel (Abbildung 3.9) wurde das PCR-Produkt aus dem Gel extrahiert (1,3 ng DNA/µl) und in den pGEM-T-*easy*-Vektor (Tabelle A 7.8) für die anschließende Transformation in kompetente Zellen ligiert.

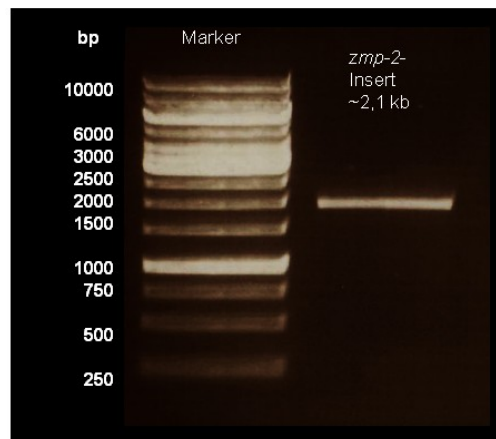


Abbildung 3.9 Elektrophoretische Auftrennung des PCR-Amplifikats.

Die Bande zeigt die Auftrennung des *zmp-2*-Promotors mit 2,1 kb.

3.6.4.3 Ligation der *zmp-2*-Promotor-Amplifikate in den pGEM-T-*easy*-Vektor

Der pGEM-T-*easy* (pGEM-T-*easy*-Vektor-Kit) ermöglicht wie der pCR2.1-Vektor ein TA-Cloning aufgrund des T-Überhangs. So besitzt der Vektor Thymidin-Überhänge, die mit den Adenin-Überhängen der PCR-Produkte hybridisieren können, welche durch die *Taq*-Polymerase angehängt werden. Der Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

<i>Zmp-2</i> -Promotor-DNA	3 µl
2 x Rapid-Buffer	5 µl
Vektor-Lösung	1 µl
T4-DNA-Ligase [2 U/µl]	1 µl

Die Reaktion fand über Nacht bei 4 °C statt.

Die darauf folgende Transformation des pGEM-T *easy* Konstrukts mit *zmp-2*-Promotor in kompetente Zellen (NEB 5'α Zellen, Biolabs) und die anschließende Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgt wie unter 3.6.1.7 und 3.6.1.8 beschrieben.

3.6.4.4 Herstellung des pGEM-T *easy* Konstrukts mit *zmp-2*-Promotor und GFP-cDNA

In einem nächsten Schritt wurde in das Plasmid-Konstrukt pGEM-T *easy* mit *zmp-2*-Promotor ein GFP-Insert ligiert. Hierzu wurde zunächst die GFP-Sequenz aus dem Vektor pPD95_75 (Addgene, Cambridge; Tabelle A 7.8) mittels *Bam*HI und *Ap*aI (Tabelle A 7.5) herausgeschnitten, bevor sie aufgereinigt und ligiert wurde.

Restriktionsverdau des isolierten Vektors pPD95_75

Um die GFP-cDNA in einem Agarose-Gel auftrennen zu können, musste sie zuvor verdaut werden. Diese Restriktion der Plasmid-DNA (je 10 µl DNA) wurde mittels der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Ap*aI unter Verwendung entsprechender Reaktionspuffer durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf ein 1 %iges Gel aufgetragen.

Die präparative Auftrennung der verdauten DNA-Fragmente zu ihrer Isolierung und anschließender Extraktion erfolgte in einem 1 % Agarosegel in 1 x TAE-Puffer bei 80 V. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurde wie in 3.6.1.10 beschrieben durchgeführt.

Restriktionsverdau von pGEM-T *easy* mit *zmp-2*-Promotor und Ligation des GFP-Inserts

Nach Bestimmung des Reinheitsgrades und der Konzentration mittels Nano-Drop wurde das Plasmid-Konstrukt pGEM-T *easy* mit *zmp-2*-Promotor ebenfalls mittels *Bam*HI und *Ap*aI geschnitten, damit das GFP-Insert wie folgt hinein ligiert werden konnte:

GFP-Insert-DNA	3 µl
2 x Rapid-Buffer	5 µl
Vektor-Lösung (pGEM-T <i>easy</i> mit <i>zmp-2</i> -Promotor)	1 µl
T4-Ligase (2 U/µl)	1 µl

Die Reaktion fand über Nacht bei 4 °C statt.

Tansformation

Abschließend wurde das erstellte Konstrukt (pGEM-T *easy* mit *zmp-2*-Promotor und GFP) wie vorangegangen beschrieben (3.6.1.7) in NEB 5'α Zellen (Biolabs) transformiert und bei -80°C gelagert. Die Überprüfung der Konstrukte erfolgte mittels Restriktionsverdau (*Eco*RI) und Sequenzierung mit SP6- und T7-Primern bei GATC (Konstanz).

3.6.4.5 Mikroinjektion des *zmp-2::gfp*-Konstrukts in *C. elegans*

Das *zmp-2::gfp*-DNA-Konstrukt (Abbildung 3.10) wurde in die Gonaden von jung-adulten Tieren nach der Methode von Mello *et al.* (1991) mikroinjiziert. Dabei wurden 50 µg/ml des Vektor-Konstrukts und 80 µg/ml des pRF4 Markerplasmids (Tabelle A 7.8) koinjiziert. Die Folgegeneration ist Träger von Markerplasmid und DNA-Konstrukt. Das Markerplasmid trägt das Gen *rol-6* (SU1006), das eine Selektion der transgenen Nematoden lichtmikroskopisch durch die induzierte rollende Fortbewegung ermöglicht. Die Nematoden wurden bei 25 °C kultiviert und mittels Platindraht entsprechend des Roller-Phänotyps selektiert.

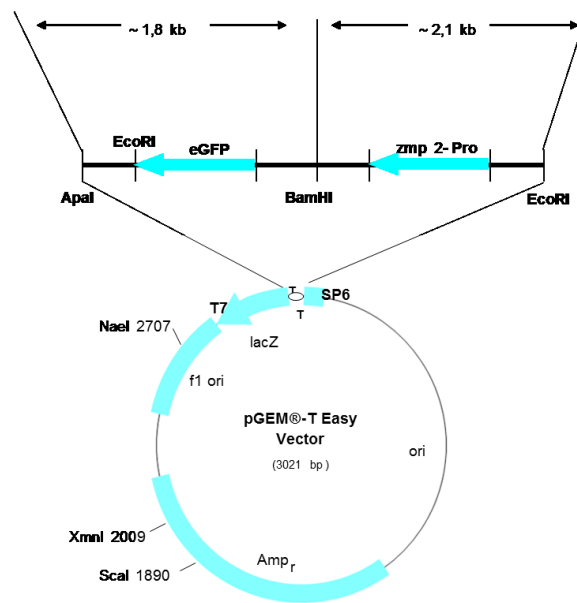


Abbildung 3.10 Genkarte des erstellten *zmp-2(2.1)::gfp*-Konstrukts.

Mittels *nested* PCR wurde ein Stück (2.1 kb) des *zmp-2*-Promotors amplifiziert und in den pGEM-T *easy*-Vektor (Promega) ligiert. Anschließend wurde die GFP-cDNA durch eine Restriktionsverdau (*Bam*HI und *Apa*I) aus dem Vektor pPD95_75 (Tabelle A 7.8) geschnitten und in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Apa*I geschnittenen pGEM-T *easy* ligiert. Das Einbringen des Konstrukts in die Gonaden von *C. elegans* erfolgte durch Mikroinjektion.

3.7 Biochemische Methoden

3.7.1 Western Blot

Die Western Blot-Analyse diente dem Nachweis, inwieweit Effektoren oder RNA-Interferenz unterschiedlicher Gene einen Einfluss auf die Höhe der VIT-6-Protein-Expression in *C. elegans* haben.

3.7.1.1 Proteinextraktion durch Homogenisierung von *C. elegans*

Für die Protein-Extraktion wurden insgesamt 5 48-Well-Platten pro Ansatz benötigt, dies entspricht ca. 10.000 Würmern. Die nach 10-maligem Waschen mit M9-Puffer pelettierten Würmer (2 min, 14.000 rpm) wurden mit 200 – 400 µl Lysispuffer (Tabelle A 7.15) versetzt und über Nacht bei -80 °C inkubiert. Letzteres ist ein wichtiger Schritt zum Aufbrechen der Würmer. Nach anschließendem Auftauen der Proben auf Eis, wurden sie mit einem Homogenisator (Janke & Kunkel AG) jeweils 8 mal 45 sec pro Probe sonifiziert (Cycle 0,5;

Amplitude 40; 4 °C). Damit die zu untersuchenden Proteine nicht zerstört werden, wurde durchweg auf Eis gearbeitet.

Anschließend wurden die Proben bei 6.000 x g und 4 °C 15 min zentrifugiert, um Zelltrümmer und kleinere Zellbestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und zog zur Proteinbestimmung die Methode nach Bradford (1976) heran, um nachfolgend standardisierte Proteinmengen von 10 µg pro Proteinsuspension auf die SDS-Gele aufzutragen (3.7.1.3).

3.7.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue des Bradford-Reagenzes (BioRad Protein Assay) bindet in ethanolhaltiger Phosphorsäure-Lösung an Proteine, wobei ein blauer Komplex entsteht und so das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Da die Menge an gebundenem Farbstoff mit dem Gehalt an aromatischen und basischen Aminosäuren im Protein korreliert, verhält sich die Extinktion bei 595 nm proportional zur Proteinkonzentration, die somit photometrisch bestimmt werden kann.

Aus den Proteinsuspensionen wurden jeweils 25 µl entnommen und mit 975 µl H₂O bidest. vermischt. Es wurden dann je 250 µl Bradford-Reagenz zugegeben, gut gevortext und nach 15 min Inkubation bei 595 nm im Spektralphotometer (Amersham Pharmacia Biotech) die Absorption gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Standardkurve [0,1 - 1 mg/ml] mit bovinem Serumalbumin als Referenzprotein (BSA in Lysispuffer) ermittelt. Die Proteinstandards sowie die Proteinproben wurden doppelt bestimmt.

3.7.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte nach der Methode von Laemmli *et al.* (1970). Dabei wurden die in Lysispuffer homogenisierten Proteinproben mit dem doppelten Volumen an dreifachkonzentriertem Laemmli-Puffer (Tabelle A 7.24) versetzt und 15 min bei 55 °C denaturiert. Nach anschließender Zentrifugation (1 min, 14.000 rpm) wurden die denaturierten Proteine in einem 8,5 %igen Trenngel, das mit einem 5 %igen Sammelgel überschichtet war, bei 200 V 45 min in einer vertikalen Kammer (Elektrophorese

Komplettsystem Mini Protean 3 Cell, BioRad) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Mit dem 8,5 %igen Trenngel (Tabelle 3.2) können Proteine mit Molekülmassen im Bereich von 43 – 200 kDa aufgetrennt werden. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gefüllt und mit 150 µl 2-Methyl-1-Propanol überschichtet.

Tabelle 3.2 Zusammensetzung zweier Trenngele (8,5 %).

Chemikalie	Menge
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3,0 ml
10 % SDS (w/v)	120 µl
30 % Acrylamidlösung	3,4 ml
Bidest. H ₂ O	5,44 ml
10 % APS	160 µl
TEMED	7 µl
Gesamtvolumen	12 ml

Nach der APS/TEMED katalysierten Polymerisation wurde das 2-Methyl-1-Propanol (Sigma) abgegossen, zügig das Sammelgel (Tabelle 3.3) auf das Trenngel gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Als Molekulargewicht-Standard diente ein Marker (BioRad) im Molekulargewichtsbereich von 43-200 kDa.

Tabelle 3.3 Zusammensetzung zweier Sammelgele.

Chemikalie	Menge
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,0 ml
10 % SDS (w/v)	40 µl
30 % Acrylamidlösung	680 µl
Bidest. H ₂ O	2,24 ml
10 % APS	40 µl
TEMED	2 µl
Gesamtvolumen	4 ml

3.7.1.4 Western Blot

Beim Semi Dry-Blotting (Owl) wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Millipore) elektrotransferiert. Zur Aktivierung wurde die Membran kurz in

Methanol (100 %, Roth) gelegt und anschließend 15 min in Blotpuffer nach Towbin (Tabelle A 7.22) inkubiert. Der Aufbau des Blots bestand aus drei Lagen Whatman-Papier (Roth) (äquilibriert in Blotpuffer), darauf folgte das Trenngel, als nächste Schicht die aktivierte Membran und erneut drei Whatman-Papiere. Der Blot erfolgte bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Membranfläche für 1 h in einem Semi-Dry-Blot-System (Owl). Dabei war entscheidend, dass sich die Anode oben und die Kathode unten befanden, da der Blotpuffer basisch ist und beinahe alle Proteine damit negativ geladen sind (Towbin *et al.* 1979).

3.7.1.5 Immunodetektion des Vitellogenin-6

Nach dem Elektro-Protein-Transfer wurden die Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper (Tabelle A 7.7) nachgewiesen. In einem ersten Schritt wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran mit einer Milchpulverlösung (Tabelle A 7.29) 1 h auf dem Schüttler (Eppendorf) gesättigt. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper (rat-anti-VIT-6) in einer Verdünnung 1:5000 in TBS-T (Tabelle A 7.28) 1 h bei RT erneut auf einem Plattenschüttler inkubiert. Der folgende Schritt bestand darin die Membran dreimal mit TBS-T 5 min unter Schüttlern zu waschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die nun immunmarkierten Proteine wurden durch einen zweiten Antikörper (goat-anti-rat-IgG, HRP-markiert), der eine Peroxidase besitzt, detektiert. Dieser sekundäre Antikörper (1:5000 Verdünnung in TBS-T) wurde ebenfalls 1 h lang bei RT inkubiert und anschließend die Membran je zweimal 5 min mit TBS-T und nachfolgend mit TBS gewaschen, um die nicht gebundenen sekundären Antikörper zu entfernen.

3.7.1.6 Chemolumineszenz-Detektion

Die Detektion von VIT-6 erfolgte anhand der durch die gebundenen Peroxide, katalysieren Reaktion mittels frisch angesetzter ECL-Lösung (Tabelle A 7.23). Dabei wurden die beiden Nachweisreagenzien (Luminol-Lösung, Verstärker-Lösung) vermischt und die Membran darin 5 min unter Lichtausschluss inkubiert. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und in einer Röntgenfilm-Kassette (Roth) platziert, bevor der zurechtgeschnittene Film 0,5 - 2 min exponiert und anschließend entwickelt und fixiert wurde.

Das Prinzip der Detektion der Antigen-Antikörper-Konjugate beruht auf der Oxidation des Luminols der ECL-Lösung durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte HRP (*horse radish peroxidase*). Das entstandene Luminolradikal wird in nachfolgenden Reaktionen zu Luminolendoperoxid und schließlich zu dem Dianion 3-Aminophthalat. Die Elektronen des Letzteren befinden sich nun in einem angeregten Zustand und durch Rückkehr der Elektronen in den Ruhezustand wird Licht emittiert (Thorpe und Kricka 1986). Dieses Licht verursacht eine Schwarzfärbung des Films (Protec Medizintechnik) an genau den Stellen, an denen sich die HRP-markierten Antikörper auf der Membran befinden und somit auch das VIT-6. VIT-6 wird als einziges Vitellogenin im Pseudocoelom zu yp115 und yp88 gespalten, welche über Disulfidbrücken zu einem Heterodimer (yp170) komplexieren. Diese Banden sind in der Western Blot Analyse deutlich zu erkennen und wurden zur Quantifizierung der VIT-6-Expression herangezogen.

3.7.1.7 Strippen der Membran

Um das Referenzprotein β -Actin (Tabelle A 7.7) auf derselben Membran nachzuweisen, wurden zunächst die Antikörper durch Strippen entfernt. Dazu wurde die Membran 45 min bei 50 °C in Strippuffer (Tabelle A 6.26) inkubiert, unter leichtem Schütteln alle 5 min. Bevor die Membran erneut mit Milchpulver blockiert wurde, wurde diese zweimal mit TBS-T 5 min bei RT auf dem Schüttler gewaschen.

3.7.1.8 Immunodetektion des Referenzproteins β -Actin

Die Detektion erfolgte in analoger Weise zu der von Vitellogenin-6. In einem ersten Schritt wurde die Membran mit Milchpulver blockiert, gefolgt von einer 1-stündigen Inkubation des ersten Antikörpers rabbit-anti-actin (Verdünnung 1:500 in TBS-T). Nach den unter 3.7.1.5 genannten Waschschritten erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper goat-anti-rabbit-IgG-HRP (Verdünnung 1:500 in TBS-T). Die Expositionszeit des Filmes auf der Membran betrug hier 1 - 2 min, anzupassen nach Signalstärke.

3.7.1.9 Densitometrische Auswertung: Western Blot

Zunächst wurden die Filme eingescannt, die Banden markiert und die Intensität der Schwärzegrade durch die Software ImageJ 1.43x (National Institutes of Health) in Peaks übersetzt. Letztere lassen sich durch die Fläche unter der Kurve (AUC) für die statistische Auswertung in GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software) heranziehen. Bevor die mit Effektoren oder RNAi exponierten Gruppen mit der Kontrolle verglichen werden konnten, wurde zunächst die Expression des Zielgens *vit-6* mit der des Referenzgens β -Actin normalisiert. Die Ergebnisse wurden in GraphPad Prism 5.0 durch Balkendiagramme der Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

Zum Vergleich einer einzelnen Bedingung mit der Kontrolle wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt. Sind mehrere Bedingungen vorhanden, erfolgte die statistische Auswertung anhand der One-way ANOVA und dem Bonferroni's Multiple Comparison Test. Das Signifikanzniveau der untersuchten Gruppen wurde wie folgt angenommen: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

3.7.2 Messung der oxidativen Protein-Modifikationen mittels OxyBlot

Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) können Proteine oxidativ verändern, wobei Seitenketten von z. B. Methionin unter der Bildung von Cystein-Disulfidbrücken modifiziert werden. Diese oxidativen Modifikationen können mittels OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit (Tabelle A 7.4) gemessen werden. Aus 10.000 – 15.000 Nematoden pro Gruppe wurde ein Proteinextrakt erstellt, wie unter 3.7.1.1 beschrieben, und 5 μ l des Proteinextrakts mit 5 μ l SDS (12 %) versetzt und anschließend 10 μ l 1x 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (DNPH) hinzupipettiert, bevor das Gemisch 15 min bei RT inkubiert wurde. Damit nach Ablauf der Inkubation die durch DNPH verursachte Derivatisierung gestoppt wird, wurden 7,5 μ l Neutralisations-Lösung (Millipore) hinzupipettiert. Die nun derivatisierten Proben wurden gelelektrophoretisch (10 % SDS-PAGE) aufgetrennt (3.7.1.3) und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet (3.7.1.4). Die Immunodetektion fand nach 1-stündigem Blockieren mit Milchpulver mit einem rabbit-anti-DNP-Antikörper (Tabelle A 7.7) (Verdünnung 1:150) statt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T der Membran wurde diese mit dem

Sekundärantikörper (goat-Anti-Rabbit IgG, HRP-gekoppelt, Verdünnung 1:300) für eine weitere Stunde inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit TBS-T für 5 min und weitere zweimal mit TBS für 5 min, wurde die Membran wie ein Western Blot entwickelt (3.7.1.5/6) und ausgewertet (3.7.1.9). Die Expositionszeit des Filmes auf der Membran betrug 5 min.

4 ERGEBNISSE

Den Vitellogeninen wird eine Bedeutung für die Lebensspanne zugesprochen. Auf letztgenannte hat die Stressresistenz einen wesentlichen Einfluss, die in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich zwei unterschiedlicher Stressfaktoren untersucht wurde: zum einen den bakteriellen Stress durch das Pathogen *P. luminescens* (Kapitel 1), zum anderen oxidativen Stress, ausgelöst durch den *Knock-down* der Zinkmetalloprotease-2 (Kapitel 2). Da Vitellogenine durch Östrogene induzierbar sind, wurde in beiden Kapiteln sowohl die Rolle des Östrogens 17 β -Östradiol als auch des Phytoöstrogens Genistein untersucht. Außerdem sind Vitellogenine als Homologe zum humanen ApoB-100 am Cholesterol-Transport beteiligt, weshalb die Lebensspannen-Einflüsse der Vitellogenine ebenfalls hinsichtlich modifizierter Cholesterol-Applikationen überprüft wurden.

Grundlegend ist zunächst die Genredundanz der Vitellogenine zu erwähnen. Vitellogenine besitzen eine hohe Sequenzhomologie (Spieth und Blumenthal 1985), weshalb von einer polymeren Wirkung ausgegangen wird und somit beim Ausschalten einzelner *vit*-Gene die Möglichkeit des gleichzeitigen Ausschaltens eng verwandter *vit*-Gene in Betracht gezogen wurde. Dies konnte vorangegangen (3.6.5) bestätigt werden, hierbei beeinträchtigte ein *vit-2-Knock-down* ebenfalls die VIT-6-Expression.

Zunächst wurde der transgene Stamm *vit-2::gfp* als Modelorganismus für die VIT-2-Expression herangezogen und Untersuchungen zur Lebensspanne unter *vit-2-RNAi* durchgeführt. Da *vit-2::gfp* jedoch nur inkonsistente, nicht auswertbare Ergebnisse lieferte, wurde die Expression der Vitellogenine mittels qRT-PCR und Western Blot bestimmt. Allerdings standen für den Western Blot lediglich VIT-6-Antikörper zur Verfügung, weshalb unterschiedliche Vitellogenine untersucht wurden. Aufgrund der polymeren Wirkungen innerhalb der Vitellogenin-Familie wurde jedoch beim *Knock-down* eines *vit*-Genes eine Beeinträchtigung mehrerer *vit*-Gene unterstellt und somit jeweils die ganze Vitellogenin-Familie in Betracht gezogen.

Die zu den jeweiligen Lebensspannen-Versuchen und Expressionsanalysen zugehörigen statistischen Auswertungen finden sich in tabellarischer Form für Ergebnis-Kapitel 1 (*P. luminescens*-Stress) im Appendix B, die für Kapitel 2 (*zmp-2-RNAi*) im Appendix C.

4.1 Einflüsse des Gram-negativen Bakteriums *P. luminescens* auf Resistenzmechanismen in *C. elegans*

In diesem ersten Kapitel wurde die immunologische Stressresistenz durch Applikation des Pathogens *P. luminescens* untersucht. Die Lebensspanne steht in einem reziproken Verhältnis zur Aktivität des Immunsystems und ist in diesem Zusammenhang ein Indikator für die Gesundheit eines Organismus.

4.1.1 Die Applikation von *P. luminescens* verkürzt die Lebensspanne in *C. elegans* unter Hitzestress-Bedingungen

Zunächst wurde der Effekt von *P. luminescens* auf die Lebensspanne unter Hitzestress im Wildtyp N2 bestimmt. Hierzu wurden synchrone jung-adulte Nematoden 24 h mit *P. luminescens* inkubiert (5×10^6 Bakterien/Well). Die Nematoden wurden dabei keinem Bakterien- bzw. Nahrungsdefizit ausgesetzt, damit dies als Grund für eine verkürzte Lebensspanne ausgeschlossen werden konnte. In Abbildung 4.1 ist der signifikant lebensverkürzende Effekt von *P. luminescens* in *C. elegans* unter Hitzestress-Bedingungen dargestellt ($p < 0,001$). Wie aus Abbildung 4.1 weiterhin hervorgeht, fand die Verkürzung der Lebensspanne durch Hitze-inaktivierte *P. luminescens*-Bakterien nicht statt ($p > 0,05$).

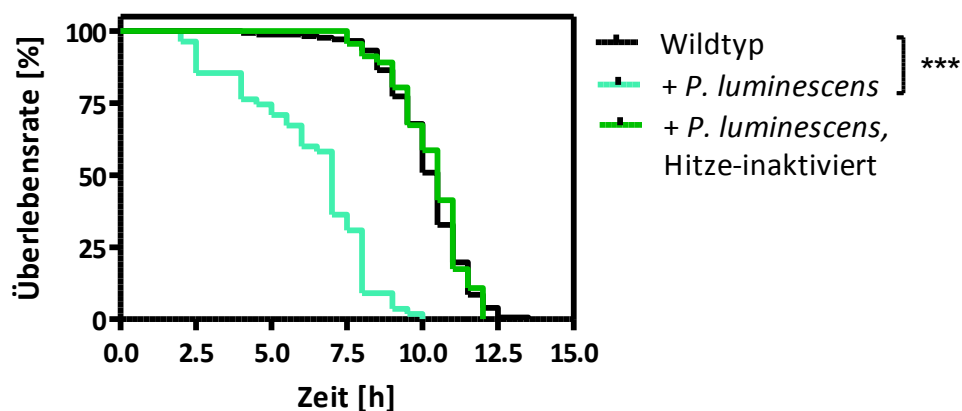


Abbildung 4.1 Effekt einer 24 h Inkubation mit *P. luminescens* auf die Lebensspanne im *C. elegans* Wildtyp unter Hitzestress.

Die mittlere Lebensspanne wird durch intakten *P. luminescens* um ca. 50 % reduziert, während Hitze-inaktivierte *P. luminescens* diese gegenüber der mit *E. coli* behandelten Kontrolle nicht beeinflussen (Tabelle B 7.1).

4.1.2 *P. luminescens* akkumuliert intestinal in *C. elegans*

Um die Lebensspanne beeinflussenden Effekte *P. luminescens*-exponierter Nematoden gewebespezifisch zu detektieren, wurden phänotypische Lokalisationsstudien durchgeführt. Es gibt fünf beschriebene Mechanismen, die von Bakterien genutzt werden, um Nematoden zu infizieren und zu töten. Einer davon ist die intestinale Kolonisierung durch pathogene Bakterien, wobei diese im Darmlumen akkumulieren bzw. an intestinale Rezeptoren von *C. elegans* adhären und so eine persistente Infektion verursachen. Um eine potentielle intestinale Infektion nachzuweisen, wurde ein GFP-transformierter *P. luminescens*-Stamm verfüttert. Wie aus den in Abbildung 4.2 dargestellten konfokal durchgeführten Fluoreszenzaufnahmen ersichtlich wird, gelangten die pathogenen Bakterien scheinbar intakt in das Intestinum adulter Tiere und akkumulierten dort. Letzteres deutet auf einen Infektionsherd hin. Um zu verifizieren, dass die Pathogenität von *P. luminescens* nicht durch das Transgen beeinflusst wurde, wurde die Überlebensspanne von *C. elegans* nach Verfütterung des grün-fluoreszierenden *P. luminescens*-Stammes bestimmt: Dessen Verabreichung führte zu einer vergleichbar starken Reduktion der Überlebensrate bei *C. elegans* im Vergleich zur Verfütterung von Wildtyp *P. luminescens* ($p > 0,05$; Tabelle B 7.1).

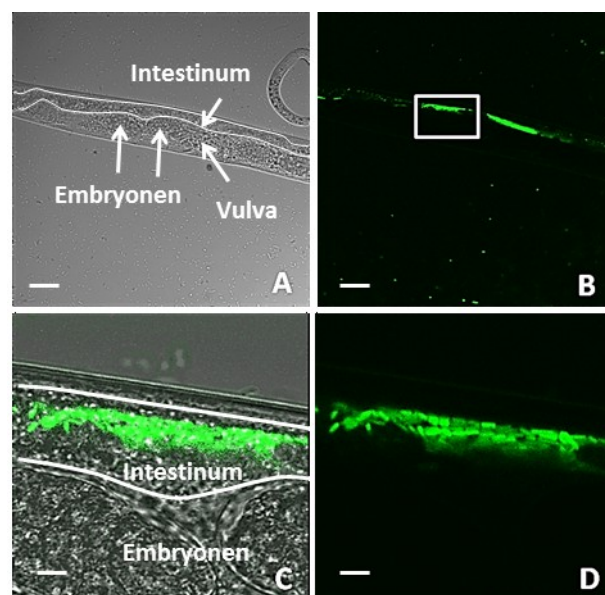


Abbildung 4.2 Intestinale Akkumulation von *P. luminescens* im *C. elegans* Wildtyp N2.

Lichtmikroskopische Aufnahme eines Wildtyps (A). Die entsprechende fluoeszoptische konfokale Aufnahme zeigt die Bildung von Infektionsherden im Darmlumen intakter *P. luminescens* (B). In C und D ist der Infektionsherd aus B vergrößert dargestellt. Bilder A und C zeigen jeweils die dazugehörigen DIC-Bilder. Maßstäbe: 50 μm (A, B), 10 μm (C, D)

4.1.3 Einfluss der Vitellogenine auf die Resistenz gegenüber *P. luminescens*

Die intestinale Akkumulation von *P. luminescens* wirkte lebensverkürzend, dies impliziert eine damit einhergehende Aktivierung des Immunsystems. In Organismen wie den Zebrafischen wird ein Einfluss der Vitellogenine bei der immunologischen Abwehr beschrieben, weshalb zunächst ein möglicher Einfluss der Vitellogenine auf die *P. luminescens*-Infektion mittels RNA-Interferenz (RNAi) untersucht wurde. Hierzu wurden die RNAi-Klone für *vit-2* und *vit-6*, wie in 3.6.1 beschrieben, selbst hergestellt. Die RNAi-Klone für *vit-3* und *vit-5* wurden bei *Geneservice Ltd* (Cambridge, UK) bezogen. Da die Vitellogenine der Subfamilien sehr hohe Homologien über ihren gesamten Sequenzbereich aufweisen, führt eine *vit-2*-RNAi auch zu einem *vit-1*-*Knock-down* und eine *vit-3*-RNAi verursacht einen gleichzeitigen *Knock-down* von *vit-4* und *vit-5*. Aufgrund dieser polymeren Wirkung können mittels *Knock-down* mehr oder weniger alle Vitellogenine in ihrer Funktion betroffen sein.

Der *Knock-down* von *vit-2*, *vit-3*, *vit-5* als auch *vit-6* beeinflussten die Überlebensrate von *C. elegans* im Vergleich zur Kontrolle nicht ($p > 0,05$; Tabelle B 7.2), exemplarisch für *vit-6*-Defizienz in Abbildung 4.3 dargestellt. Dahingehend verstärkte der *Knock-down* von *vit-2*, *vit-3*, *vit-5* oder *vit-6* den lebensverkürzenden Effekt von *P. luminescens* signifikant ($p < 0,001$) in Wildtyp-Nematoden (Abbildung 4.3, Tabelle B 7.2).

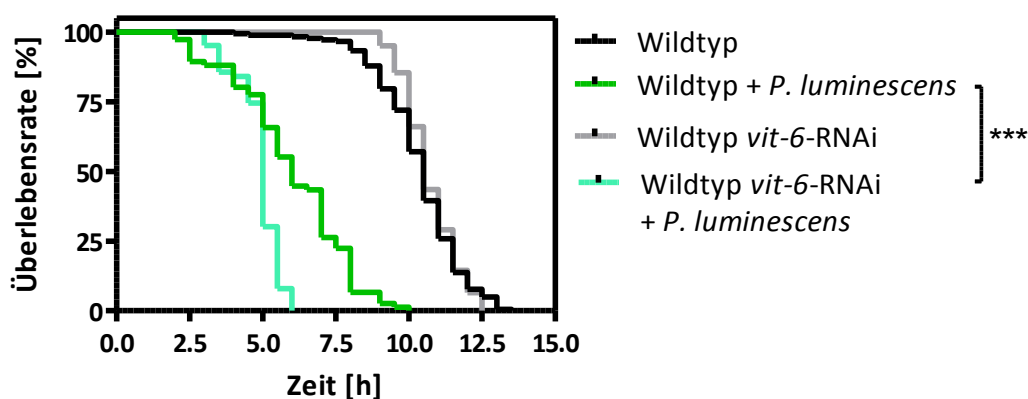


Abbildung 4.3 Effekt der *vit-6*-RNAi auf die Lebensspanne von *C. elegans* N2 unter Hitzestress nach *P. luminescens*-Inkubation.

Auch in einer *vit-2*-Deletionsmutante war eine zusätzliche Lebensverkürzung nach *P. luminescens*-Inkubation im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten (Tabelle B 7.2), was die

anhand der *vit*-RNAi Versuche erhaltenen Ergebnisse bestätigt. Die in *vit* defizienten Tieren additiv verkürzte Lebensspanne nach *P. luminescens*-Applikation impliziert einen immunoprotektiven Schutz durch die Vitellogenine.

4.1.4 Potentiell beteiligte Signalwege von *C. elegans* in der Immunabwehr gegenüber *P. luminescens*

Um zu überprüfen, welche Immun-Signalwege bei der Abwehr gegen eine *P. luminescens*-Infektion beteiligt sind, wurden verschiedene immun-responsive Proteine (Abbildung 1.3) durch RNAi in ihrer Expression reduziert. Somit konnte deren Einfluss auf die Lebensspanne unter Hitzestress nach *P. luminescens*-Infektion untersucht werden.

Mit Ausnahme des Transkriptionsfaktors DAF-16 zeigte der *Knock-down* der untersuchten immun-relevanten Proteine keine Auswirkung auf die durch *P. luminescens* bewirkte Lebenszeitverkürzung. Um eine *ced-3*-Defizienz zu untersuchen, wurde die *ced-3*-Mutante gewählt. Dieses immun-relevante Protein zeigte jedoch auch keine zusätzliche Lebenszeitverkürzung nach *P. luminescens*-Infektion im Vergleich zur Kontrolle (Tabelle B 7.3). In *daf-16* defizienten Nematoden, sowohl nach *daf-16*-*Knock-down* als auch in *daf-16*-Mutanten, war eine zusätzliche signifikante Lebensverkürzung, um 43,8 % (*daf-16*-RNAi) bzw. 37,5 % (*daf-16*-Mutante), vorhanden (Tabelle B 7.3). In Abbildung 4.4 sind die Überlebenskurven des Wildtyps und der *daf-16*-Mutante mit und ohne *P. luminescens*-Infektion abgebildet. Der fehlende protektive Einfluss bei Deletion dieser Proteine spricht für einen immunoprotektiven Effekt des Transkriptionsfaktors DAF-16 bei einer *P. luminescens*-Infektion.

RNAi für die immun-relevanten Faktoren als auch die Mutationen in *ced-3* bzw. *daf-16* hatten keinen Einfluss auf die Lebensspanne von *C. elegans* in Abwesenheit von *P. luminescens* (Tabelle B 7.3).

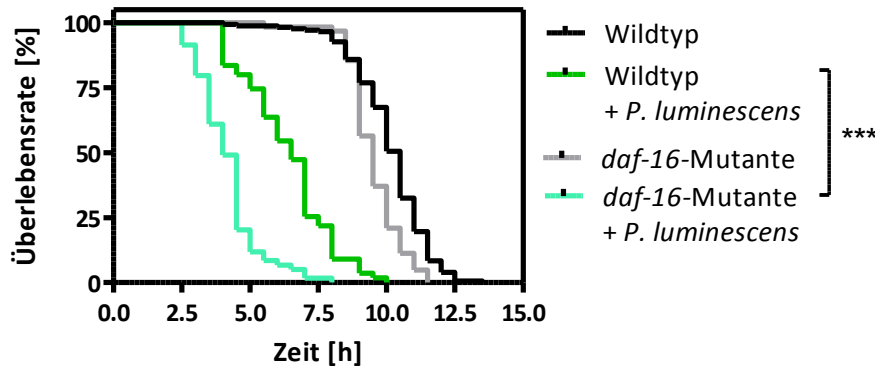


Abbildung 4.4 Effekt der *P. luminescens*-Applikation auf die Lebensspanne der *daf-16*-Mutante unter Hitzestress im Vergleich zum Wildtyp.

4.1.5 Einfluss des Steroid-Signalwegs auf die durch *P. luminescens* induzierte Lebenszeitverkürzung

Vitellogenine, für die ebenfalls wie für DAF-16 ein immunoprotektiver Effekt gezeigt wurde, sind Transporter für Cholesterole, wobei letztere nach der DAF-9-vermittelten Oxidation zu dafachronischen Säuren Liganden für DAF-12 bilden. Vitellogenine beeinflussen möglicherweise so das Substratangebot für DAF-9, und könnten damit einhergehend die immunoprotektiven Effekte über den Steroid-Signalweg durch dessen Interaktion mit DAF-16 vermitteln. Um Sterol-mediierte Signale in Bezug auf einen möglichen Einfluss auf die Immunantwort zu überprüfen, wurden die Deletionsmutanten *daf-9* und *daf-12* bezüglich ihres Verhaltens bei einer *P. luminescens*-Infektion untersucht.

Eine Infektion über 24 h mit *P. luminescens* zeigte sowohl in der *daf-9*- als auch in der *daf-12*-Deletionsmutante eine zusätzlich signifikante Lebensverkürzung ($p < 0,001$) im Vergleich zum infizierten Wildtyp unter Hitzestress (Abbildung 4.5). Durchschnittlich lebten infizierte *daf-9*- bzw. *daf-12*-Mutanten 27 % bzw. 21 % kürzer als der infizierte Wildtyp (Tabelle B 7.4).

Diese Befunde weisen auf eine Bedeutung der Proteine des Steroid-Signalwegs für einen immunologischen Schutz gegenüber *P. luminescens* hin.

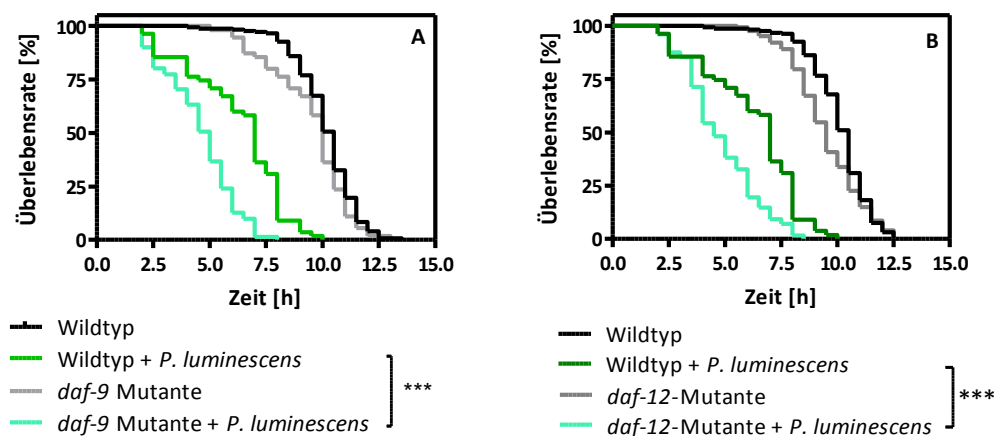


Abbildung 4.5 Effekt der *P. luminescens*-Applikation auf die Lebensspanne unter Hitzestress in der *daf-9*- (A) und *daf-12*-Mutante (B) im jeweiligen Vergleich zum Wildtyp.

4.1.6 Der immunologische Einfluss der Vitellogenine wird über den Steroid-Signalweg (DAF-9, -12) unter Beteiligung von DAF-16 vermittelt

Der Funktionsverlust von DAF-9, DAF-12, DAF-16 sowie der Vitellogenine bedingte eine erhöhte Sterberate von *C. elegans* nach Infektion mit *P. luminescens* unter Hitzestress-Bedingungen. Um die vermutete Interaktion zwischen dem Steroid-Signalweg, dem Interaktionspartner DAF-16 und den Vitellogeninen als Transporter von Cholesterol letztlich zu verifizieren und zu zeigen, dass diese sich in der gleichen Signal-Kaskade befinden, wurde eine *vit*-RNAi in *daf-9*-, *daf-12*- und *daf-16*-Mutanten bei gleichzeitiger *P. luminescens*-Inkubation untersucht. Hierbei war zu beobachten, dass die im Wildtyp beobachtete zusätzliche Lebensverkürzung durch *vit*-RNAi bei einer *P. luminescens*-Infektion in den *daf*-Deletionsmutanten nicht festzustellen ist (Abbildung 4.6). Wie auch im Wildtyp, hatte die *vit-3*- bzw. *vit-5*-RNAi in Abwesenheit von *P. luminescens* in den drei *daf*-Mutanten keinen Einfluss ($p > 0,05$) auf die Überlebensrate (Tabelle B 7.5). Weiterhin führte in der *vit-2*-Mutante eine Infektion mit *P. luminescens* nach *daf-9*-, *daf-12*- oder *daf-16*-RNAi zu keiner zusätzlichen Lebensverkürzung mehr ($p > 0,05$; Tabelle B 7.6). Abbildung 4.6 zeigt exemplarisch das Ausbleiben der additiven Lebenszeitverkürzung durch *P. luminescens*-Infektion in der *daf-9*- und *daf-12*-Mutante unter *vit-3*-RNAi, im Vergleich zur infizierten Kontrolle. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die immunoprotektiven Effekte der

Vitellogenine über den Steroid-Signalweg (DAF-9, DAF-12) unter Beteiligung von DAF-16 vermittelt werden.

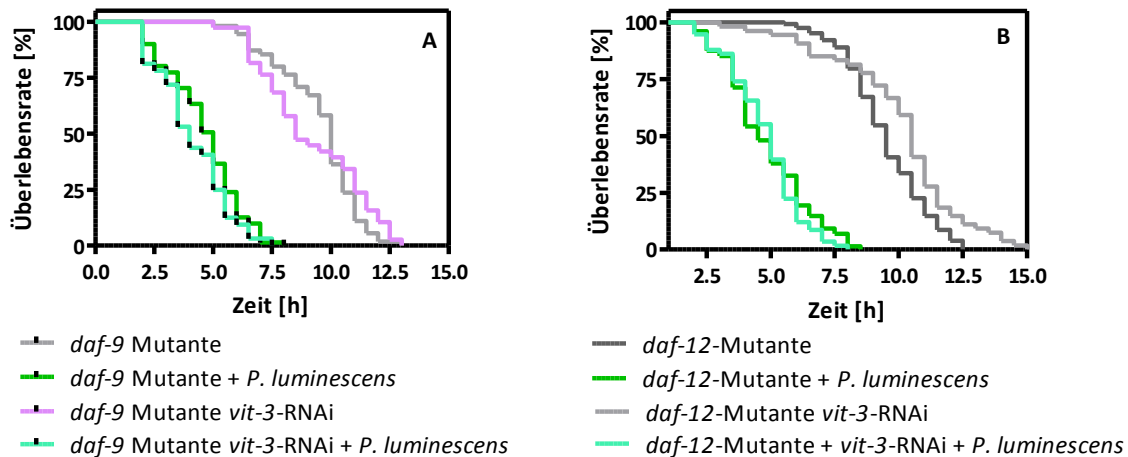


Abbildung 4.6 Effekt der *vit-3*-RNAi auf die Lebensspanne in der *daf-9*- (A) und *daf-12*-Mutante (B) unter Hitzestress nach *P. luminescens*-Infektion.

4.1.7 Cytosolische DAF-16-Lokalisation als potentieller Mechanismus der Vitellogenin-vermittelten immunologischen Resistenz gegenüber *P. luminescens*

Der Transkriptionsfaktor DAF-16 agiert in *C. elegans* stromabwärts des Insulin/IGF-1-Rezeptors DAF-2. Bei Fehlen der Insulin/IGF-1 Signale transloziert DAF-16 in den Nukleus, um u. a. die Transkription von Stress-responsiven Genen zu verstärken. Diese Gene kodieren z. B. Superoxiddismutasen (SOD), Katalasen oder kleine Hitzeschockproteine wie HSP-16.2. In diesem Zusammenhang vermittelt DAF-16 durch die nukleäre Translokation die Effekte auf die Stressresistenz. Da die DAF-Proteine DAF-9 und DAF-12 des Steroid-Signalwegs mit DAF-16 interagieren, um die immunologische Stressantwort der Vitellogenine vermitteln, wurde im Folgenden die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors DAF-16 als möglicher Mechanismus einer erhöhten Abwehr untersucht.

Zur Quantifizierung der subzellulären DAF-16-Translokation wurde der transgene Stamm *daf-16::gfp* (TJ356) verwendet, der ein DAF-16::GFP Fusionsprotein exprimiert, wodurch die subzelluläre Lokalisation von DAF-16 ermöglicht wird. Entsprechend der subzellulären

DAF-16-Lokalisation während einer *P. luminescens*-Exposition mit und ohne *vit*-RNAi, wurden die behandelten Nematoden des Stammes TJ356 in drei Kategorien eingeteilt: Nematoden mit nukleärer DAF-16-Akkumulation; Nematoden mit cytosolischer Lokalisation; Nematoden mit nukleärer und cytosolischer Lokalisation (intermediär). Abbildung 4.7 (A-C) zeigt exemplarisch Nematoden der jeweiligen Kategorie. Nach *P. luminescens*-Exposition war eine spezielle Kategorie vermehrt erkennbar, in welcher die subzelluläre Translokation von DAF-16 in die epidermalen Zellkerne jedoch nicht in die intestinalen Zellkerne zu erkennen ist (Abbildung 4.7 D). Diese Kategorie wurde als nukleär (extra intestinal) bezeichnet. Pro Behandlungsgruppe wurden ca. 50 Nematoden kategorisiert. Die Ergebnisse aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten wurden gemittelt, der prozentuale Anteil der Kategorien berechnet und als Balkendiagramme dargestellt.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, dass in den Kontrolltieren eine geringe nukleäre DAF-16-Translokation zu detektieren war, 80 % von DAF-16 lag cytosolisch vor, 18 % dieser Tiere wurden der Kategorie intermediär zugeteilt. Nach 24-stündiger *P. luminescens*-Infektion war dagegen 38 % des DAF-16 in epidermalen Nuklei akkumuliert, 56 % lagen cytosolisch vor (Abbildung 4.8).

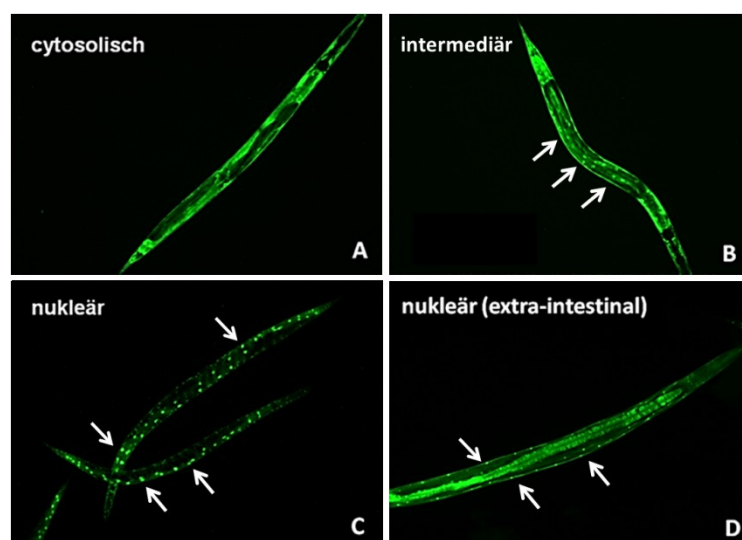


Abbildung 4.7 Subzelluläre DAF-16-Translokation in der *daf-16::gfp*-Mutante TJ356.

(A) Nematode mit einer cytosolischen DAF-16-Lokalisation. (B) Nematode der Kategorie intermediär mit cytosolischer und nukleärer DAF-16-Lokalisation. (C) Nematoden, die eine subzelluläre DAF-16-Akkumulation im Nukleus aufweisen. (D) Nematoden, die eine epidermale, jedoch nicht intestinale Akkumulation von DAF-16 in den Nuklei aufweisen. Pfeile zeigen beispielhaft die nukleäre DAF-16-Lokalisation.

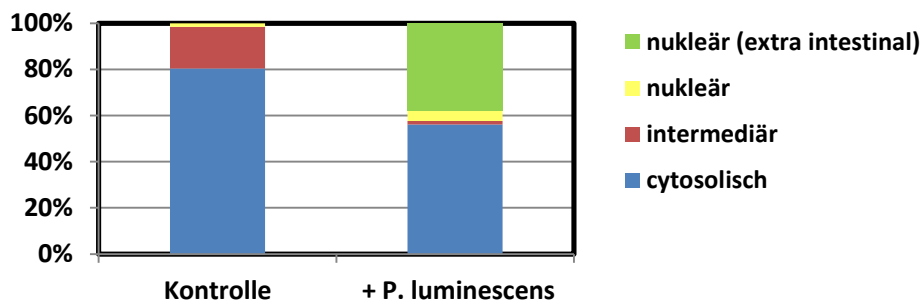


Abbildung 4.8 Subzelluläre DAF-16-Lokalisation in *daf-16::gfp* transgenen *C. elegans* nach *P. luminescens*-Infektion.

Weitergehend wurde der Einfluss einer *vit*-RNAi auf die DAF-16-Translokation untersucht. Wie in Abbildung 4.9 zu erkennen, führte sowohl eine *vit-3*- als auch *vit-5*-RNAi zu einer 100 %igen nukleären Akkumulation von DAF-16 in TJ356-Tieren. Da durch die nukleäre Akkumulation von DAF-16 vermehrt Stress-responsive Gene transkribiert werden, lässt eine *vit*-RNAi eine erhöhte Stress-Induktion in *C. elegans* vermuten. Eine verstärkte nukleäre Lokalisation von DAF-16 zeigte sich auch nach *vit*-RNAi in Kombination mit einer *P. luminescens*-Infektion, jedoch war diese nicht so stark ausgeprägt wie unter *vit-3*- oder *vit-5*-RNAi alleine und fand hauptsächlich in epidermalen Zellen, also extra intestinal, statt.

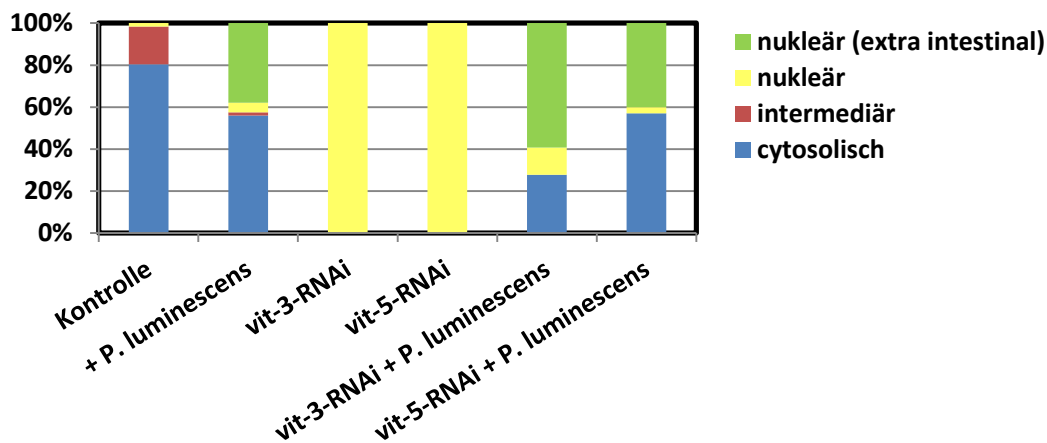


Abbildung 4.9 Subzelluläre DAF-16-Lokalisation in *daf-16::gfp* transgenen *C. elegans* nach *P. luminescens*-Infektion und *vit*-RNAi.

In *vit* defizienten Nematoden führte eine *P. luminescens*-Infektion zu einer vermehrten cytosolischen DAF-16-Lokalisation (30 % bei *vit-3*-RNAi und 60 % bei *vit-5*-RNAi). Die Lokalisation von DAF-16 in epidermalen Nuklei fand sich bei 40 – 60 %, während eine nukleäre Lokalisation in Inestinalzellen kaum mehr nachweisbar war (Abbildung 4.9).

4.1.8 Oxidativer Stress als Ursache für die Lebensspanne-Verkürzung nach *P. luminescens*-Exposition

Wie anhand der nukleären DAF-16-Lokalisation transgener *daf-16::gfp*-Tieren gezeigt, verursacht *P. luminescens* vermehrten Stress. Ob dieser durch eine vermehrte Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bedingt ist, war nachfolgend von großem Interesse, da den Vitellogeninen eine antioxidative Kapazität zugesprochen wird.

So wurden die Einflüsse von *P. luminescens* alleine und in Kombination mit *vit*-RNAi auf die ROS-Induktion im Wildtyp N2 untersucht. Erhöhte ROS-Spiegel könnten sowohl für die Lebenszeitverkürzung als auch für die extraintestinale, nukleäre DAF-16-Translokation nach *P. luminescens*-Infektion verantwortlich sein. Die erhöhte cytosolische DAF-16-Lokalisation nach *P. luminescens*-Inkubation in den Intestinalzellen spricht allerdings nicht für eine enogene Kompensation von ROS. Allerdings könnte unter diesen Bedingungen ROS zur Abwehr durch die Intestinalzellen sezerniert werden. Die relativen ROS-Spiegel wurden mittels zweier Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt. Zum einen wurde das mitochondrial lokalisiertes ROS mittels MitoTracker Red CM-H₂XRos fluoreszenz-mikroskopisch detektiert.

In Abbildung 4.10 ist exemplarisch für jede Behandlungsgruppe eine fluoreszenz-optische Aufnahme der MitoTracker-Färbung dargestellt. Nach *P. luminescens*-Infektion konnte nahezu keine mitochondriale Fluoreszenz mehr in *C. elegans* detektiert werden, nur im Darmlumen war eine leichte Fluoreszenz detektierbar. Hierbei war eine starke Abnahme um 32,5 % nach 24 h *P. luminescens*-Exposition, die signifikant geringer als die basale ROS-Produktion der Kontrolle war ($p < 0,001$), zu beobachten. *Vit-6* defiziente Nematoden wiesen eine ca. 14 %ige Erhöhung der ROS-Produktion im Vergleich zur basalen ROS-Produktion der Kontrolle auf ($p < 0,01$; Abbildung 4.10). Die durch *P. luminescens* reduzierten Spiegel mitochondrialer ROS wurden allerdings durch *vit-6*-RNAi nicht beeinflusst. Die Kombination von *vit-6*-RNAi und einer *P. luminescens*-Infektion führte auch hier zu einer im Vergleich zur Kontrolle um 36,6 % signifikant geringeren ROS-Produktion ($p < 0,001$).

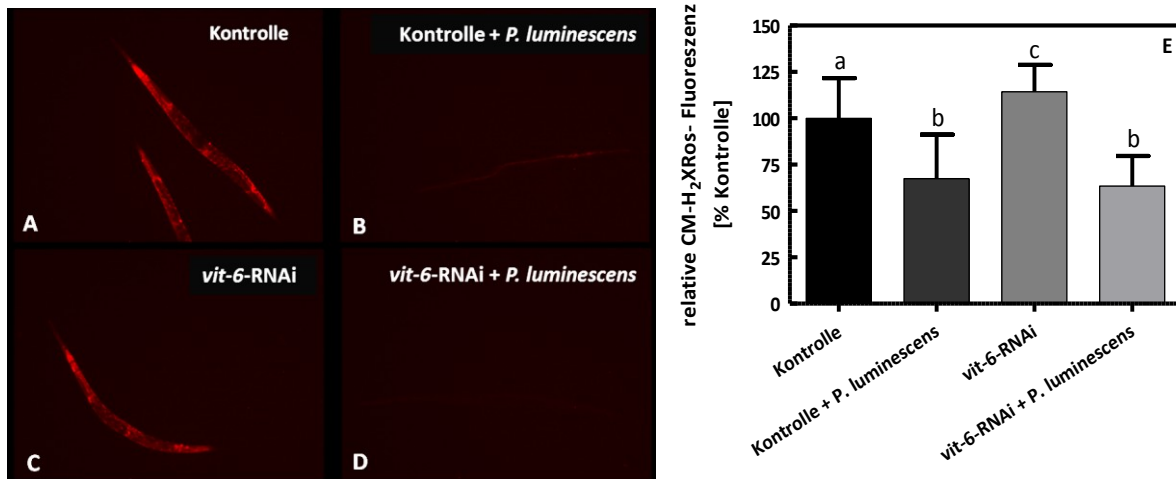


Abbildung 4.10 Mit MitoTracker Red CM-H₂XRos detektierte mitochondriale ROS in *P. luminescens* infizierten Nematoden.

Nematoden wurden ab dem L1-Larvenstadium mit Kontroll-RNAi-Bakterien (A, B) bzw. mit *vit-6*-RNAi-Klonen gefüttert (C, D) und mit dem Farbstoff MitoTracker inkubiert. Ab dem jung-adulten Stadium wurden sie 24 h mit *P. luminescens* infiziert (B, D). Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der relativen Fluoreszenz, dargestellt als MW \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 40 Tieren. Beim statistischen Vergleich der unterschiedlichen Behandlungsgruppen miteinander geben unterschiedliche Buchstaben signifikante Unterschiede an (E).

Diese Ergebnisse implizieren, dass eine *P. luminescens*-Exposition zu einem geringeren mitochondrialen ROS-Stress in *C. elegans* führt und eine damit verbundenen ROS-Sekretion in das Darmlumen unter *P. luminescens*-Exposition.

Eine weitere Methode der Quantifizierung von physiologisch gebildetem ROS ist die Inkubation der behandelten Nematoden mit dem Amplex UltraRed Reaktionsgemisches. Hierbei wird ein durch ROS induzierte Farbumschlag fluorimetrisch bei 540 nm detektiert.

Da möglicherweise die ROS-Bildung in anderen Organellen als den Mitochondrien stattfindet wie z. B. eine ROS-Sekretion in das Darmlumen (als möglicher Abwehrmechanismus), wurde dieser weitere Fluoreszenzfarbstoff (Amplex Ultra Red) herangezogen. Dieser kann Organellen-unabhängig geringste Mengen an Wasserstoffperoxid nachweisen. Wie aus Abbildung 4.11 ersichtlich, bestand in *C. elegans* ein mehr als 10-facher Anstieg in der Bildung von H₂O₂ nach *P. luminescens*-Applikation im Vergleich zur den Kontrolltieren (1039,0 \pm 195,6 vs. 100,0 \pm 34,2; $p < 0,001$).

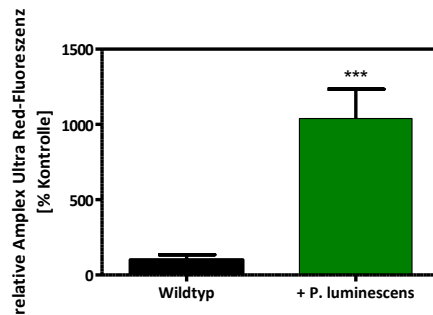


Abbildung 4.11 H₂O₂-Detektion nach *P. luminescens*-Infektion mittels Amplex Ultra Red.

Nematoden wurden nach 24-stündiger *P. luminescens*-Infektion 3 h mit dem Farbstoff Amplex Red inkubiert und anschließend die H₂O₂-Level fluorimetrisch bestimmt. Dargestellt sind MW ± SD von zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils 6 Wiederholungen (n = 12). *** p < 0,001

Weiterhin wurden Unterschiede in der ROS-Produktion der HT115 *E. coli*-Bakterien, die als Kontroll-Futter dienten, und der pathogenen *P. luminescens*-Bakterien untersucht. Hierzu wurden Tagkulturen von HT115 und *P. luminescens* gleicher optischer Dichte 1 h mit Amplex Red inkubiert und anschließend die relative Fluoreszenz bestimmt (Abbildung 4.12). Hierbei konnte eine ca. 5-fach signifikant erhöhte ROS-Produktion durch *P. luminescens*-Bakterien (538,8 ± 51,7) im Vergleich zu den HT115-Bakterien (100,0 ± 3,2) detektiert werden (p < 0,001).

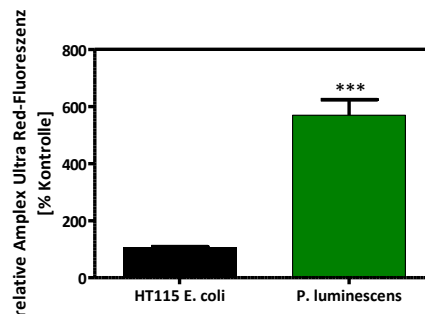


Abbildung 4.12 H₂O₂-Detektion in *E. coli* HT115- und pathogenen *P. luminescens*-Bakterien mittels Amplex Ultra Red.

Bei einer OD = 1 wurden die Bakterien 1 h mit dem Farbstoff Amplex Red inkubiert und anschließend die H₂O₂-Level fluorimetrisch bestimmt. Dargestellt sind MW ± SD von zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils 6 Wiederholungen (n = 12). *** p < 0,001

Aufgrund der verminderten mitochondrialen ROS und gleichzeitig erhöhter extrazellulärer ROS kann vermutet werden, dass ROS intestinal in *C. elegans* als Abwehr-Mechanismus gegenüber den Pathogenen sezerniert werden.

Protektive Effekte der Ascorbinsäure in *P. luminescens* infizierten Tieren

Das Pathogen *P. luminescens* bedingt vermehrten ROS-Stress, dem bei *vit-3*- oder *vit-5*-RNAi durch die nukleäre DAF-16-Translokation entgegen gewirkt wird. Die postulierte antioxidativen Effekte der Vitellogenine als Schutzmechanismus gegenüber *P. luminescens* sollte unter Verwendung des Antioxidans Ascorbinsäure überprüft werden.

Wie in Abbildung 4.13 ersichtlich, existierte aufgrund der Applikation von Ascorbinsäure keine zusätzliche Lebensverkürzung in *vit-6* defizienten Nematoden nach *P. luminescens*-Infektion mehr ($p > 0,05$). Im Mittel lebten die *vit*-RNAi behandelten und *P. luminescens* infizierten Nematoden bei zeitgleicher Applikation von Ascorbinsäure 4,4 h, die entsprechende Kontrolle 4,6 h (Tabelle B 7.7).

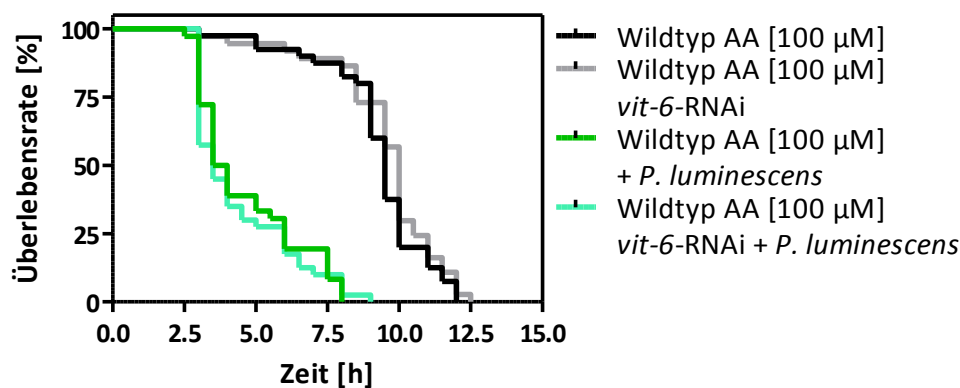


Abbildung 4.13 Effekt einer Ascorbinsäure (AA)-Applikation [100 µM] nach *vit-6*-RNAi und *P. luminescens*-Inkubation auf die Lebensspanne von *C. elegans* N2 unter Hitzestress.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Vitellogenine nicht nur in der Funktion als Transporter intrazellulärer steroidaler Signalmoleküle, sondern auch in der Funktion als Antioxidans essentiell sind.

4.1.9 *P. luminescens* erhöht die *vit-6*-mRNA-Spiegel

Aufgrund der möglichen antioxidativen Kapazität der Vitellogenine, könnten diese als Schutzproteine gegenüber *P. luminescens* fungieren. Als mögliche Antwort des Organismus auf eine *P. luminescens*-Infektion wäre somit eine vermehrte Bildung der Vitellogenine

denkbar, weshalb deren immunologischer Einfluss im Folgenden hinsichtlich einer *P. luminescens*-Infektion auf die *vit*-mRNA-Expression mittels qRT-PCR quantitativ untersucht wurde.

Wie in Abbildung 4.14 ersichtlich, fand eine signifikante, $3,4 \pm 0,7$ -fache Expressionssteigerung der Vitellogenine im Vergleich zur Kontrolle ($1,0 \pm 0,5$) nach Infektion mit *P. luminescens* statt. Hieraus kann abgeleitet werden, dass *C. elegans* als Antwort auf eine *P. luminescens*-Infektion die *vit*-6-Expression hochreguliert, vermutlich zur besseren Infektionsabwehr.

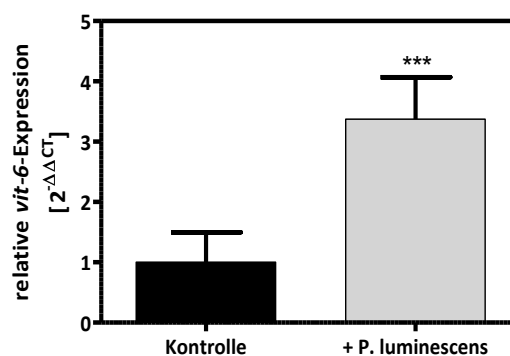


Abbildung 4.14 Relative *vit*-6-mRNA-Expression nach 24 h *P. luminescens*-Inkubation in *C. elegans*.

Die Balken repräsentieren die Mittelwerte (MW ± SD) aus jeweils zwei unabhängigen qRT-PCR-Analysen (n = 8). *** p < 0,001

4.1.10 Beeinflussung des Steroid-Signalwegs durch Applikation unterschiedlicher Cholesterol-Konzentrationen

Da Nematoden im Gegensatz zu Vertebraten auxotroph für Sterole sind, muss *C. elegans* exogenes Cholesterol aus der Umwelt aufnehmen, damit Steroide synthetisiert und zelluläre Funktionen aufrechterhalten werden können. Aufgrund der Cholesterol-transportierenden Eigenschaft der Vitellogenine, wurde nachfolgend untersucht, ob ein Einfluss der Cholesterol-Zufuhr im Hinblick auf die Resistenz von *C. elegans* gegenüber *P. luminescens* besteht. Hierzu wurden die Nematoden entweder einem absoluten bzw. relativen Cholesterolmangel oder einer erhöhten Cholesterol-Konzentration ausgesetzt. Nematoden, denen 5 µg Cholesterol pro ml NGM-Nährmedium appliziert wurden, dienten hierbei als Kontrolle.

4.1.10.1 Ein Cholesterolmangel phänokopiert den *Knock-down* von *vit-6* in Bezug auf die Beeinflussung der Lebensspanne in *C. elegans* nach *P. luminescens*-Applikation

Zunächst wurde die Auswirkung eines Cholesterolmangels auf die Vitellogenin-Proteine hinsichtlich der Lebensspanne untersucht. Aus den in Abbildung 4.15 dargestellten Überlebenskurven wird ersichtlich, dass Nematoden, die kein exogenes Cholesterol erhielten, signifikant kürzer lebten als die Kontrolle ($p < 0,001$) mit normaler Cholesterolzufuhr [5 $\mu\text{g}/\text{ml}$]. In infizierten Nematoden zeigte sich ebenfalls eine signifikante Lebensverkürzung, wenn kein Cholesterol zur Verfügung stand ($p < 0,001$). Im Mittel lebten die Nematoden unter Cholesterol defizienten Bedingungen 1,6 h kürzer als die Kontrolltiere, auch bei zusätzlicher *P. luminescens*-Infektion fand eine zusätzliche Lebensverkürzung von 1,9 h im Vergleich zur infizierten Kontrolle durch Cholesterolmangel statt (Tabelle B 7.8).

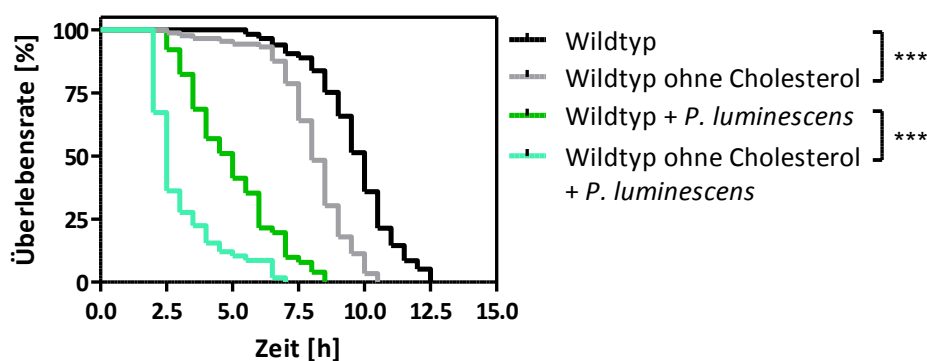


Abbildung 4.15 Effekt der *P. luminescens*-Inkubation auf die Lebensspanne Cholesterol defizienter *C. elegans* N2 unter Hitzestress.

Einfluss eines absoluten Cholesterolmangels auf die Lebensspanne in *C. elegans* nach *P. luminescens*-Applikation unter *vit-6*-RNAi

Ein Cholesterolmangel reduziert die Lebensspanne und verringert die immunologische Stressresistenz. In einem nächsten Schritt sollte nun geklärt werden, ob *vit-6*-RNAi ebenfalls einen Cholesterolmangel verursacht und dadurch die Resistenz gegenüber *P. luminescens* verringert. In Abbildung 4.16 sind die Überlebenskurven Cholesterol defizienter Nematoden nach *vit-6*-RNAi und *P. luminescens*-Infektion dargestellt. Unter Cholesterol-freier Aufzucht unterscheiden sich die Lebensspanne-Kurven von *vit-6*-RNAi behandelten Nematoden nicht

von denjenigen der Kontrolltiere ($p > 0,05$). Allerdings zeigte sich bei zusätzlicher Applikation von *P. luminescens* kein Effekt mehr einer *vit-6*-RNAi auf die Überlebensrate ($p > 0,05$).

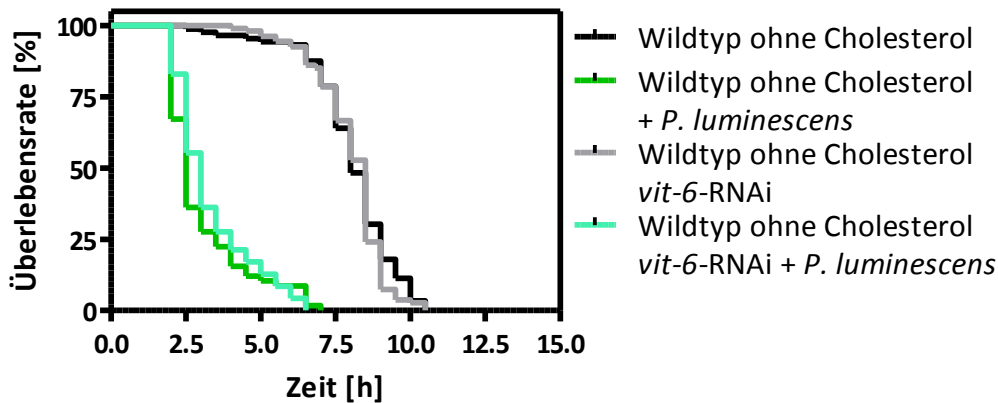


Abbildung 4.16 Effekt der *vit-6*-RNAi auf die Lebensspanne von Cholesterol defizienten *C. elegans* unter Hitzestress nach *P. luminescens*-Inkubation.

Dieser fehlende Effekt zeigte sich auch im Vergleich der mittleren Lebensspannen. Infizierte Kontrolltiere lebten genauso lang (3,1 h) wie *vit*-RNAi behandelte Nematoden (3,3 h), wenn kein Cholesterol verfügbar war (Tabelle B 7.9). Die beschriebenen Befunde lassen vermuten, dass Cholesterol eine wesentliche Funktion in der Vitellogenin-abhängigen Protektion gegenüber *P. luminescens* übernimmt.

Quantifizierung der VIT-Expression bei absolutem Cholesterolmangel mittels Western Blot

Nachfolgend stellte sich die Frage, ob unter Cholesterolmangel nur das transportierte Substrat für VIT-6 fehlt oder ob auch die VIT-6-Expression verändert wird. Dies wurde mittels Western Blot überprüft.

Bei Cholesterolmangel wurde eine signifikant geringere Vitellogenin-Menge ($p < 0,001$) im Vergleich zum Kontrollextrakt nachgewiesen (Abbildung 4.17). Die relative VIT-Expression Cholesterol defizienter Nematoden lag im Vergleich zur Kontrolle bei 11,0 %, d.h. dass die Reduzierung des zur Verfügung stehenden Cholesterols in *C. elegans* nicht durch eine erhöhte Expression von Cholesteroltransportern kompensiert werden kann. Weiterhin wird anhand der stark verminderten VIT-Expression die erhöhte Sensitivität gegenüber *P. luminescens* bei absolutem Cholesterolmangel erklärbar.

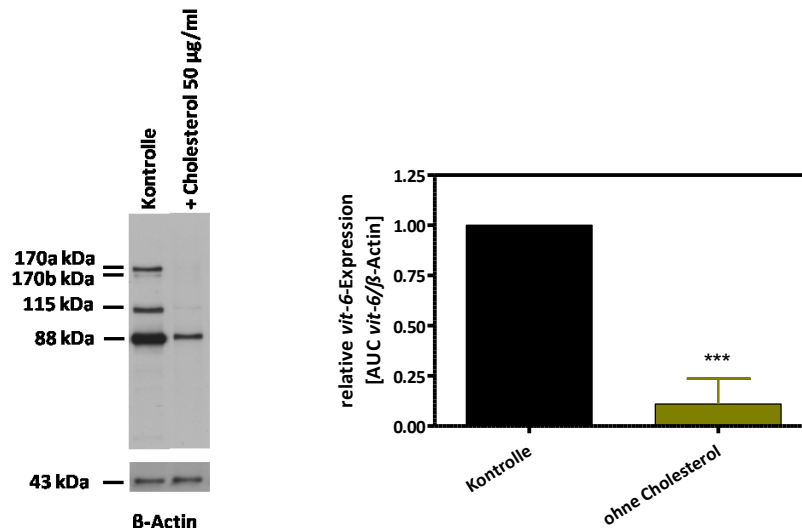


Abbildung 4.17 Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in *C. elegans* unter Cholesterolmangel.

Links ist eine repräsentative Western Blot-Analyse zum Nachweis von VIT-6 und dem Referenzprotein β -Actin dargestellt. Die molekularen Massen der Proteine sind in kDa angegeben. Die Quantifizierung der VIT-6-Expression im Verhältnis zu β -Actin wurde densitometrisch ermittelt (rechts). Dargestellt sind MW \pm SD (n = 3). *** p < 0,001

Einfluss geringer Cholesterol-Konzentrationen auf die Lebensspanne unter Hitzestress in *C. elegans*

Da ein Cholesterolmangel *per se* Stress in *C. elegans* auslöste und auch in Abwesenheit von *P. luminescens* eine verminderte Lebensspanne bedingte, wurde nachfolgend die geringste Cholesterolkonzentration ermittelt, welche die Lebensspanne nicht mehr verkürzt. Dies war deshalb von Interesse, weil die *vit*-RNAi die Lebensspanne der Kontrolle nicht beeinflusste, sondern nur in *P. luminescens* exponierten Nematoden lebensverkürzend wirkte. Es wurde also versucht, die Versorgung mit Cholesterol, wie sie unter *vit*-6-RNAi auftritt, zu simulieren. Die Überlebenskurven in Abbildung 4.18 zeigen, dass bei einer Gabe von 2,5 µg Cholesterol pro ml NGM-Nährmedium keine signifikante Lebenszeitverkürzung mehr eintritt. Diese Nematoden lebten mit durchschnittlich 8,7 h ebenso lang wie die Kontrolltiere (5 µg Cholesterol pro ml NGM), die im Schnitt 8,8 h lebten (Tabelle B 7.10).

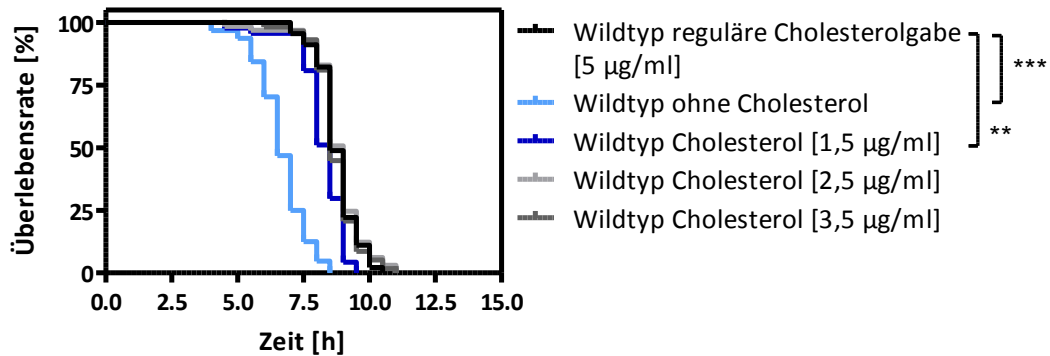


Abbildung 4.18 Effekte unterschiedlicher Cholesterolgaben auf die Lebensspanne von *C. elegans* N2 unter Hitzestress.

Einfluss geringer Cholesterol-Konzentrationen auf die Lebensspanne in *C. elegans* nach *P. luminescens*-Applikation

Die Überlebenskurven der Nematoden, denen 2,5 µg/ml Cholesterol appliziert wurde, zeigen, dass durch *P. luminescens* zwar eine Lebensverkürzung eintrat, diese aber nicht durch eine *vit*-RNAi beeinflusst wurde (Abbildung 4.19). *Vit* defiziente Nematoden lebten bei einer Gabe von 2,5 µg Cholesterol pro ml NGM-Nährmedium nach einer Infektion durchschnittlich 7,8 h, die infizierten Kontrolltiere 7,5 h (Tabelle B 7.11). Die Befunde implizieren, dass eine *vit-6*-RNAi scheinbar über einen verminderten Cholesterol-Transport die Resistenz herabsetzt.

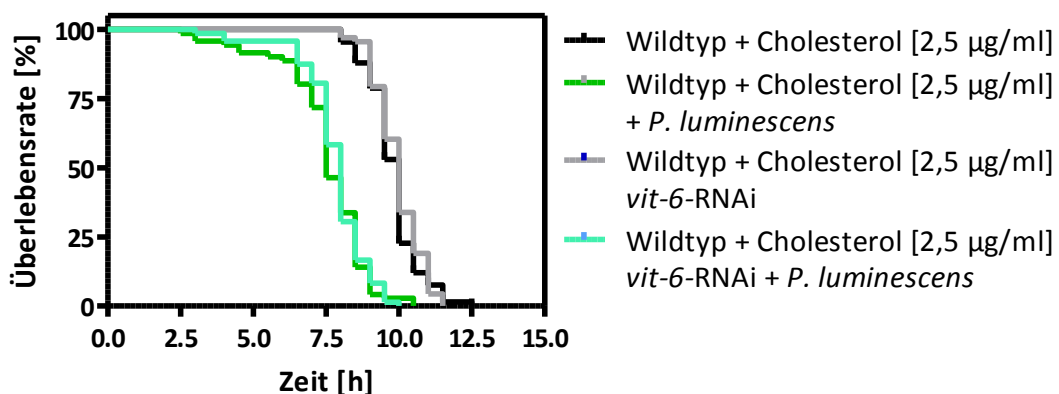


Abbildung 4.19 Effekt der *vit-6*-RNAi auf die Lebensspanne in *C. elegans* N2 bei zeitgleich verminderter Cholesterol-Applikation nach *P. luminescens*-Inkubation unter Hitzestress.

4.1.10.2 Die Applikation hoher Cholesteroldosen verkürzt die Lebensspanne *P. luminescens* exponierter Nematoden durch Verringerung der Vitellogenin-Expression

Wenn eine *vit-6*-RNAi die Resistenz aufgrund eines verminderten Cholesterol-Transports herabsetzt, stellte sich die Frage, ob erhöhte Cholesterol-Gaben die *vit*-RNAi kompensieren kann. Die Überlebenskurven nach Inkubation mit den erhöhten Cholesterol-Konzentrationen [50, 250, 500 µg/ml] unterschieden sich im Vergleich zur Kontrolle [5 µg/ml Cholesterol] nicht (Abbildung 4.20). Die mittlere Lebensdauer der mit 50 µg/ml (9,5 h), 250 µg/ml (9,3 h) und 500 µg/ml (9,7 h) Cholesterol inkubierten Nematoden war nahezu identisch mit derjenigen der Kontrolle (9,7 h) (Tabelle B 7.12).

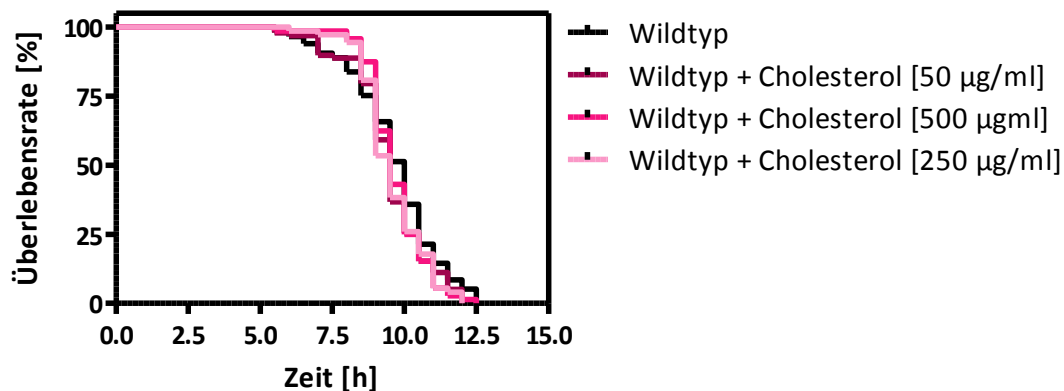


Abbildung 4.20 Effekte von erhöhter Cholesterol-Exposition auf die Lebensspanne in *C. elegans* N2 unter Hitzestress.

Einfluss erhöhter Cholesterol-Konzentrationen auf die Lebensspanne in *C. elegans* nach *P. luminescens*-Applikation

Wiederum wurde kein Lebensspanne-beeinflussender Effekt durch Veränderung der Cholesterol-Zufuhr [250 µg/ml und 500 µg/ml] im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Dies traf auch in Nematoden zu, die mit *P. luminescens* infiziert waren. Exemplarisch hierfür werden in Abbildung 4.21 die Überlebenskurven Cholesterol [500 µg/ml] und *P. luminescens* inkubierter Nematoden dargestellt.

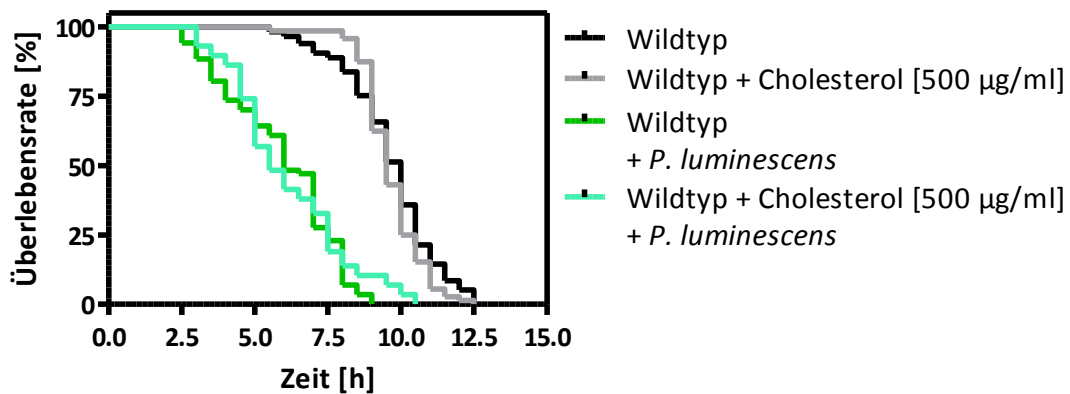


Abbildung 4.21 Effekt einer erhöhten Cholesterol-Exposition [500 µg/ml] nach Infektion mit *P. luminescens* auf die Lebensspanne in *C. elegans* N2 unter Hitzestress.

Ein Effekt der erhöhten Cholesterol-Inkubation zeigte sich nach *P. luminescens*-Infektion und *vit-6*-RNAi. Die zuvor gezeigte zusätzliche Lebensverkürzung durch *vit*-RNAi im Vergleich zur infizierten Kontrolle war nicht mehr vorhanden (Tabelle B 7.13), wie in Abbildung 4.22 exemplarisch für die Applikation von 500 µg/ml Cholesterol gezeigt wird.

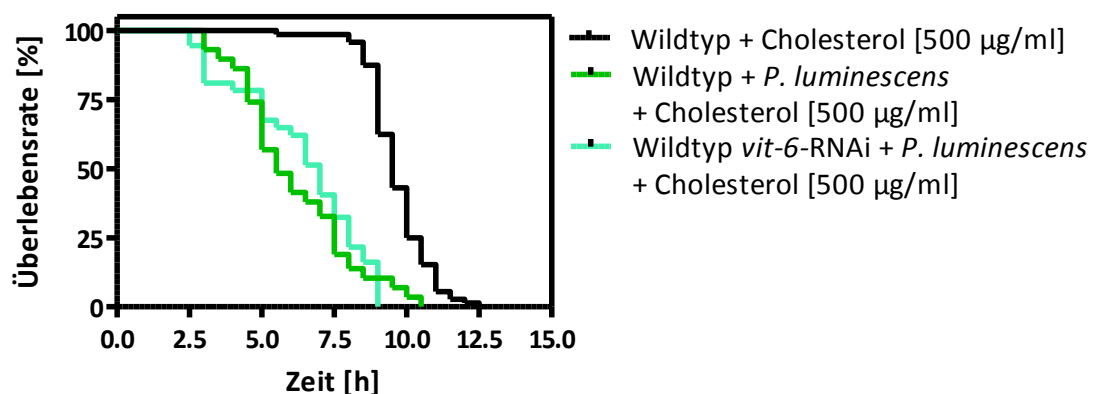


Abbildung 4.22 Effekt einer erhöhten Cholesterol Exposition [500 µg/ml] bei zeitgleicher *vit-6*-RNAi und *P. luminescens*-Infektion auf die Lebensspanne in *C. elegans* N2 unter Hitzestress.

Diese Befunde implizieren einen immunprotektiven Effekt durch erhöhte Cholesterol-Konzentrationen [250, 500 µg/ml] hinsichtlich einer Infektion durch *P. luminescens*.

Dieser Effekte könnte auf einer möglichen Diffusion von Cholesterol aufgrund der sehr hohen Konzentration beruhen oder durch VIT-unabhängige Cholesteroltransporter erklärbar sein. Da Diffusionsprozesse unmittelbar Konzentrationsabhängig erfolgen, wurden im Folgenden eine geringere Cholesterol-Konzentration von 50 µg/ml gewählt und hinsichtlich ihrer Wirksamkeit auf die Stressresistenz versus *P. luminescens* untersucht.

Einfluss 10-fach erhöhter Cholesterol-Konzentration auf die Lebensspanne in *C. elegans*

Aus Abbildung 4.23 ist ersichtlich, dass bei einer Gabe von 50 µg/ml Cholesterol in *vit*-RNAi behandelten Tieren eine signifikant additive Lebensverkürzung um 21,1 % nach *P. luminescens*-Infektion im Vergleich zur infizierten Kontrolle eintrat ($p < 0,001$), d. h. ein induzierter Cholesterolmangel unter diesen Bedingungen postuliert werden könnte (Tabelle B 7.14).

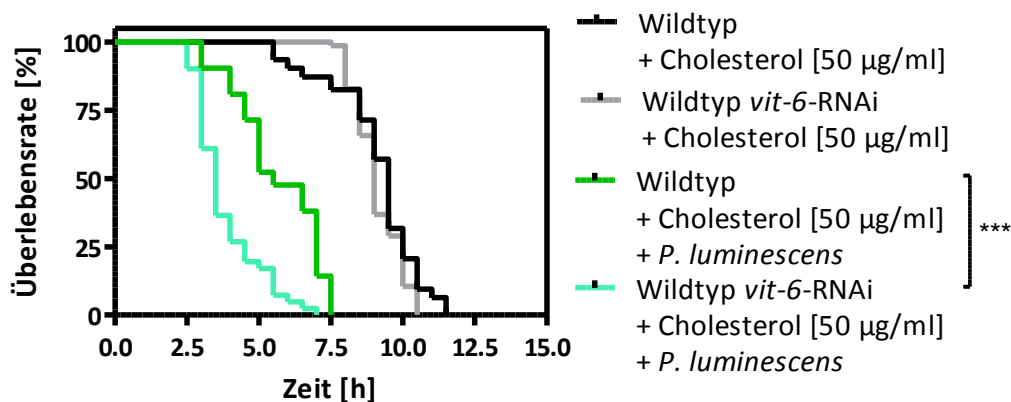


Abbildung 4.23 Effekt der Cholesterol Exposition [50 µg/ml] und zeitgleicher *vit-6*-RNAi und *P. luminescens*-Infektion auf die Lebensspanne in *C. elegans* unter Hitzestress.

Wurden die Cholesterol [50 µg/ml] supplementierten Tiere mit *P. luminescens* infiziert, konnte nunmehr eine signifikant additiv verkürzte Lebensspanne im Vergleich zum infizierten Wildtyp ($p < 0,001$) beobachtet werden (Abbildung 4.24). Die Supplementierung von 50 µg/ml Cholesterol zeigte keinen Einfluss auf die Lebensspanne in Abwesenheit von *P. luminescens*.

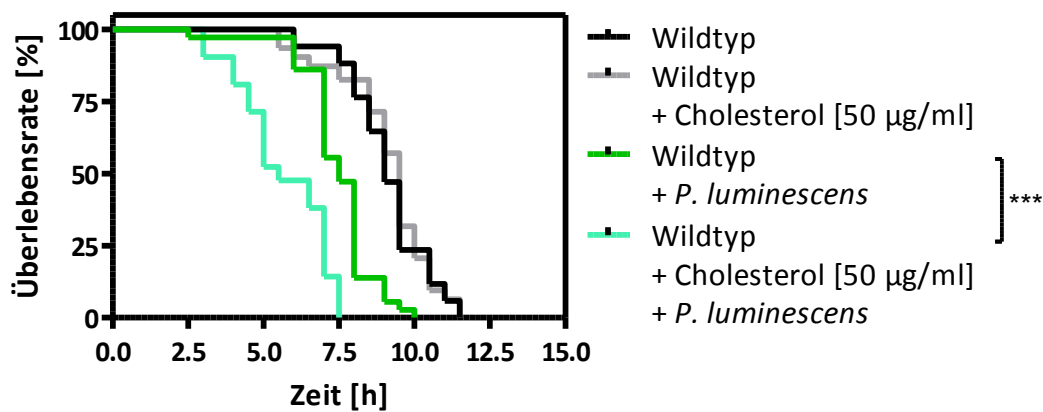


Abbildung 4.24 Effekt einer erhöhten Cholesterol Exposition [50 µg/ml] und *P. luminescens* Infektion auf die Lebensspanne in *C. elegans* N2 unter Hitzestress.

Die Ergebnisse zeigen, dass unter Applikation von 50 µg/ml Cholesterol die Lebensspanne in *P. luminescens* exponierten *C. elegans* durch *vit*-RNAi verkürzt wird, während die Applikation von 50 µg/ml Cholesterol die Resistenz gegenüber *P. luminescens* ebenfalls unter Anwesenheit von VIT-6 reduziert. Die Lebensspanne-Reduktion ist hierbei unter *vit*-6-RNAi größer als ohne den *Knock-down*.

Eine Erklärung für die Befunde könnte sein, dass durch erhöhte Gabe von Cholesterol die *vit*-6-Expression vermindert wird. Damit würde die Cholesterol-Verfügbarkeit unter 50 µg/ml Cholesterol absinken, während unter *vit*-6-RNAi die Verfügbarkeit durch die ohnehin verminderte Expression (moderate Restexpression) vermindert werden könnte. Hiernach wurden im Folgenden Expressionsstudien unter entsprechenden Bedingungen durchgeführt.

Quantifizierung der VIT-Expression nach Inkubation erhöhter Cholesterol-Konzentrationen mittels Western Blot

Hierbei konnte bei einer 10-fach erhöhten Cholesterol-Konzentration [50 µg/ml] eine signifikant geringere VIT-Expression im Vergleich zum Kontrollextrakt [5 µg/ml] nachgewiesen werden (Abbildung 4.25). Bei einer Applikation von 50 µg/ml war die relative VIT-Expression im Vergleich zur Kontrolle bei $19,1 \pm 17,9$ % ($p < 0,001$).

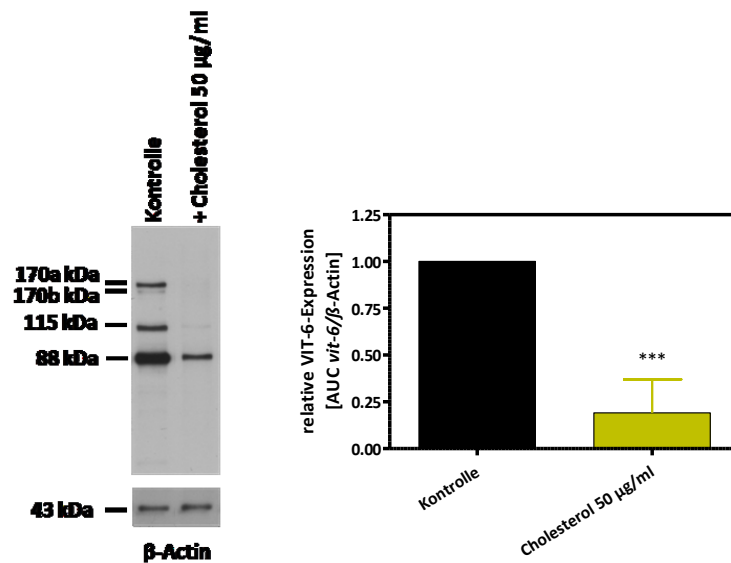


Abbildung 4.25 Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in *C. elegans* N2 bei Exposition gegenüber unterschiedlicher Cholesterol-Konzentrationen.

Links ist eine repräsentative Western Blot-Analyse für VIT-6 und das Referenzprotein β -Actin dargestellt. Die molekularen Massen der Proteine sind in kDa angegeben. Die Quantifizierung der VIT-6-Expression im Verhältnis zu β -Actin wurde densitometrisch bestimmt (rechts). Dargestellt sind MW \pm SD (n = 3), *** p < 0,001

Da die Exposition von 50 μ g/ml Cholesterol die VIT-Expression erniedrigt, spricht dies insgesamt für eine entscheidende Bedeutung der zellulären Cholesterolverorgung für die Stressresistenz gegenüber *P. luminescens* in *C. elegans*. Die Resistenz-erhöhenden Effekte stark erhöhter Cholesterolgaben unter Abwesenheit der Vitellogenine beruhen damit vermutlich auf den bereits vermuteten Diffusionsprozessen.

4.1.11 Der Vitellogenin-Rezeptor RME-2 ist notwendig für optimalen Transport von Cholesterol, die Resistenz gegenüber *P. luminescens* und die Expression von VIT-6

Vorangegangen konnte gezeigt werden, dass die immunologische Stressantwort durch Cholesterol beeinflusst werden kann. Aufgrund dessen wurde im Folgenden die Rolle des in *C. elegans* beschriebenen Cholesteroltransporters RME-2 (*receptor mediated endocytosis*) für die Cholesterolaufnahme in die Zelle und die immunologische Antwort gegenüber *P. luminescens* untersucht.

Einfluss des Vitellogenin-Rezeptors RME-2 im Cholesteroltransport

Zunächst wurde mittels mikroskopischer Analyse der Cholesterolaufnahme überprüft, ob RME-2 den Cholesteroltransport beeinflusst. Hierzu wurde Dehydroergosterol (DHE) verwendet, ein Cholesterolanalogon, welches im UV-Licht mikroskopisch nachgewiesen werden kann. Das Cholesterol des NGM-Nährmediums wurde durch DHE [40 µg/ml] ersetzt und die Nematoden ab dem L1-Larvenstadium damit gefüttert.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Analysen zeigten, wie Abbildung 4.26 zu entnehmen ist, dass sowohl eine *rme-2*-RNAi als auch eine *vit-6*-RNAi zu einer statistisch signifikanten Verminderung der DHE-Aufnahme führen. Nach Behandlung mit *rme-2*-RNAi-Bakterien zeigten die Nematoden verglichen mit den HT115-behandelten Würmern ($100,0 \pm 21,3$) eine um 16 % verminderte Fluoreszenz ($83,8 \pm 12,8$). Nach *vit-6*-RNAi war die Fluoreszenz um 24 % reduziert ($75,5 \pm 20,0$). Die partielle Abnahme der Cholesterolaufnahme zeigt, dass sowohl RME-2 als auch VIT-6 wichtig für den Cholesteroltransport sind. Da jedoch keine vollständige Abnahme des Cholesteroltransports vorliegt, kann von weiteren Cholesteroltransportern und -rezeptoren ausgegangen werden.

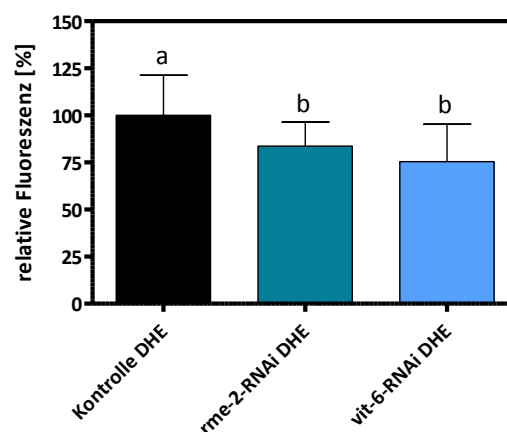


Abbildung 4.26 Relative Fluoreszenz von Dehydroergosterol (DHE) nach 4-tägiger Inkubation mit Kontroll-, *rme-2*- bzw. *vit-6*-RNAi Klonen in *C. elegans*.

Relative Fluoreszenz als MW ± SD, normiert zur Kontrolle. Beim statistischen Vergleich der unterschiedlichen Behandlungsgruppen miteinander geben unterschiedliche Buchstaben signifikante Unterschiede an.

Einfluss von RME-2 auf die Lebensspanne *P. luminescens* infizierter Nematoden

Ein *Knock-down* von *rme-2* führte zu einem geringeren Cholesteroltransport. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob eine *rme-2*-Mutante sensitiver gegenüber einer Infektion mit *P. luminescens* ist. Hierzu wurde die *rme-2*-Mutante bzw. der Wildtyp ab dem jung-adulten

Stadium 24 h mit *P. luminescens* inkubiert und anschließend die Lebensspanne unter Hitzestress-Bedingungen bestimmt. Wie in Abbildung 4.27 zu erkennen, unterschied sich die *rme-2*-Mutante nicht in der Lebensspanne vom Wildtyp ($p > 0,05$). Wurden beide jedoch mit *P. luminescens* infiziert, kam es zu einer zusätzlichen signifikanten Verkürzung der Lebensspanne um durchschnittlich 37 % in der *rme-2*-Mutante im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ($p < 0,001$; Tabelle B 7.15).

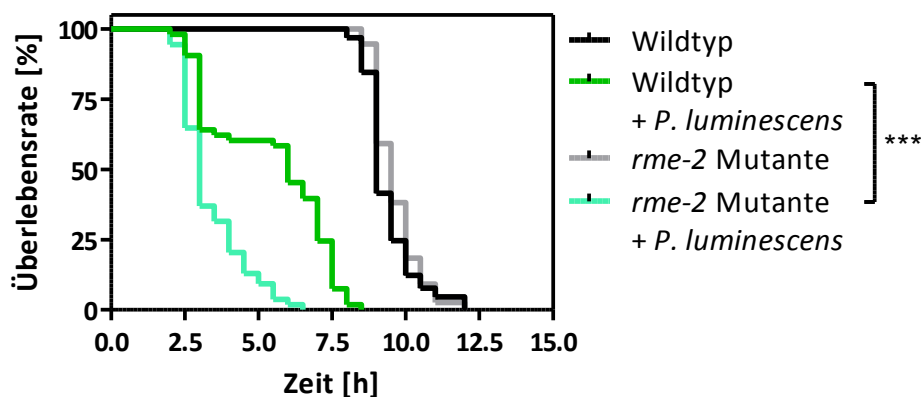


Abbildung 4.27 Effekt einer *P. luminescens*-Infektion auf die Lebensspanne in der *rme-2*-Mutante und im Wildtyp unter Hitzestress.

Um zu überprüfen, ob Vitellogenine alleine über den *rme-2* vermittelten Cholesteroltransport wirken oder doch unabhängige Effekte besitzen, wurde eine RNAi für *vit-6* in der *rme-2*-Mutante durchgeführt. Diese Untersuchungen belegten, dass eine *vit*-RNAi eine additive signifikante Verkürzung der Lebensspanne in mit *P. luminescens* infizierten *rme-2*-Mutanten verursachte. Wie in den Überlebenskurven der Abbildung 4.28 ersichtlich, lebten die *vit-6* defizienten *rme-2*-Mutanten nach Infektion mit *P. luminescens* durchschnittlich 20,5 % kürzer als diejenige ohne *vit-6*-RNAi ($p < 0,001$). Ein *vit*-RNAi *per se* führte jedoch zu keinem Unterschied in der Lebensspanne der *rme-2*-Mutante ($p > 0,05$) (Abbildung 4.28, Tabelle B 7.16).

Wenn auch signifikant, ist der Lebensspanne-verkürzende Effekt nicht ausgeprägt, weshalb von anderen Vitellogenin-Rezeptoren, über welche VIT-6 Cholesterol an die Zellen vermittelt, ausgegangen werden muss. Dennoch stellt RME-2 die entscheidende Größe in der endozytotischen Cholesterolaufnahme dar.

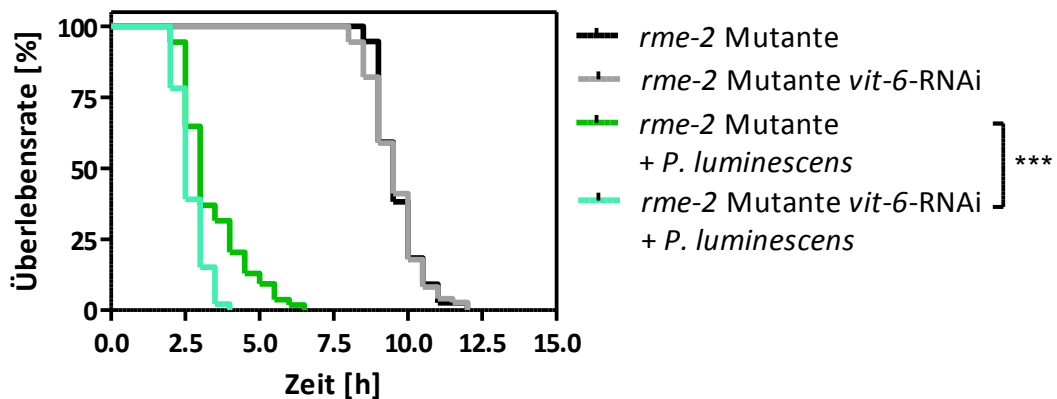


Abbildung 4.28 Effekt einer *P. luminescens*-Infektion und/oder *vit-6*-RNAi auf die Lebensspanne in der *rme-2*-Mutante unter Hitzestress.

Quantifizierung der VIT-Expression in *rme-2* defizienten Nematoden

RME-2 übernimmt damit eine mögliche Funktion in der immunologischen Abwehr, die sich durch den Cholesteroltransport erklären lässt. Entsprechend der Reduktion der VIT-6-Expression nach *vit-2*- bzw. *vit-6*-RNAi ist zu postulieren, dass auch eine *rme-2*-RNAi aufgrund der verminderten Cholesterolzufuhr für die Zelle die Expression von VIT-6 vermindert. Abbildung 4.29 zeigt das Ergebnis der Western Blot-Analyse: *rme-2* defiziente Tiere wiesen eine signifikant verminderte VIT-6-Expression auf ($p < 0,01$). Die relative VIT-6-Expression *rme-2*-RNAi behandelter Nematoden ist im Vergleich zur Kontrollgruppe bei $69 \pm 8 \%$.

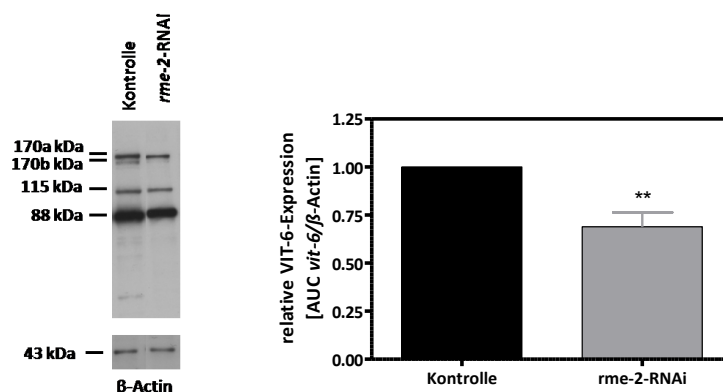


Abbildung 4.29 Western Blot Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in *C. elegans* nach *rme-2*-RNAi.

Links ist eine repräsentative Western Blot Analyse mit Referenzprotein β -Actin dargestellt. Die molekularen Massen der Proteine sind in kDa angegeben. Die Quantifizierung der VIT-6-Expression im Verhältnis zu β -Actin wurde densitometrisch ermittelt (rechts). Dargestellt sind MW \pm SD ($n = 3$). ** $p < 0,01$

4.1.12 Einfluss des Östrogens 17 β -Östradiol auf die durch *P. luminescens* verkürzte Lebensspanne in *C. elegans*

Vitellogenine werden transkriptional durch Hormone reguliert. 17 β -Östradiol scheint der stärkste Induktor der Vitellogenine zu sein, indem es über den Östrogenrezeptor deren Transkription erhöht. Untersucht wurden dementsprechend die östrogenen Effekte von 17 β -Östradiol auf die Lebensspanne unter Exposition versus *P. luminescens* und deren Abhängigkeit von der Expression der Vitellogenine.

17 β -Östradiol führt zu einer Lebensverlängerung in Gegenwart von *P. luminescens* in *C. elegans*

Zunächst war grundlegend zu klären, ob das Östrogen 17 β -Östradiol *per se* die Lebensspanne in *C. elegans* unter Hitzestress-Bedingungen beeinflusst. Die Nematoden des Wildtyps N2 wurden wie bei allen Analysen der Lebensspanne in NGM-Flüssigmedium mit 0,1, 1 und 10 μ M 17 β -Östradiol für 24 h ab dem jung-adulten Stadium oder mit 10 μ M für 4 Tage ab dem L1-Larvenstadium inkubiert. Wie in Abbildung 4.30 ersichtlich führte eine 24-stündige Applikation unterschiedlicher 17 β -Östradiol-Konzentrationen zu keinem signifikanten Einfluss auf die Lebensspanne unter Hitzestress. Auch bei zeitlich versetzter Applikation von 17 β -Östradiol für 4 Tage war kein Unterschied zur Überlebenskurve der Kontrolltiere festzustellen (Tabelle B 7.17).

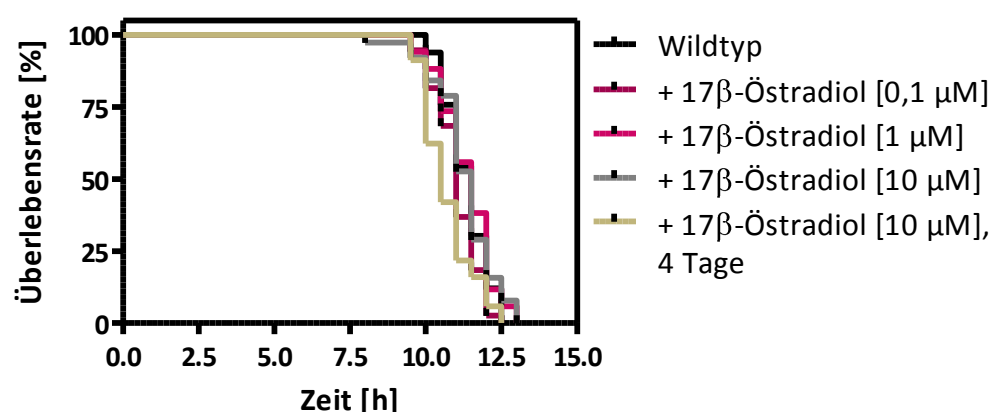


Abbildung 4.30 Effekte der 24 h Inkubation mit 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M 17 β -Östradiol sowie 4 Tage Inkubation mit 10 μ M 17 β -Östradiol.

Um immunologische Einflüsse zu detektieren, wurden anschließend die Nematoden 4 Tage mit 17 β -Östradiol [10 μ M] inkubiert gefolgt von einer 24-stündigen *P. luminescens*-Infektion ab dem jung-adulten Stadium. In Abbildung 4.31 ist zu erkennen, dass eine Inkubation mit

10 μM 17 β -Östradiol den lebensverkürzenden Effekt von *P. luminescens* unter Hitzestress fast vollständig aufhob. 17 β -Östradiol führte zu einer signifikanten Lebensverlängerung gegenüber alleiniger *P. luminescens*-Infektion ($p < 0,001$), allerdings war die erhöhte Lebensspanne noch signifikant kürzer als die der Kontrolle ($p < 0,001$). Die Vergleiche der mittleren Lebensspanne bestätigen die Befunde. *P. luminescens* inkubierte Nematoden lebten signifikant um 52,6 % kürzer als die Kontrolle und *P. luminescens* + 17 β -Östradiol um 17 % kürzer (Tabelle B 7.18). Die Befunde implizieren einen immunprotektiven Einfluss von 17 β -Östradiol.

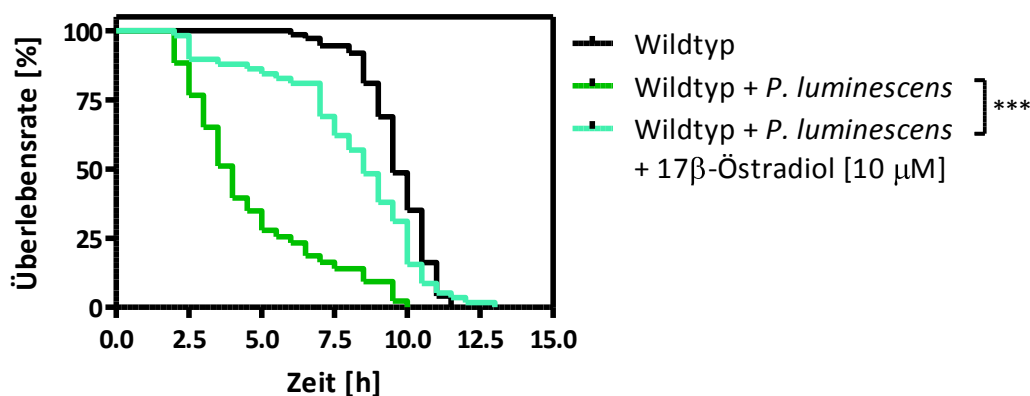


Abbildung 4.31 Effekt einer Inkubation mit 17 β -Östradiol [10 μM] auf den lebensverkürzenden Effekt von *P. luminescens* in *C. elegans* N2 unter Hitzestress.

***vit-2*-RNAi verhindert den lebensverlängernden Effekt von 17 β -Östradiol nach *P. luminescens*-Infektion**

Um nachzuweisen, dass der protektive 17 β -Östradiol-Effekt auf die *P. luminescens* induzierte Lebenszeitverkürzung durch die Vitellogenine vermittelt wird, wurde in einem weiteren Ansatz zusätzlich eine *vit-2*-RNAi durchgeführt.

Wie in Abbildung 4.32 dargestellt, war die durch 17 β -Östradiol-bedingte Kompensation der *P. luminescens*-Infektion unter *vit-2*-RNAi nicht mehr detektierbar. Die Überlebenskurve nach *vit-2*-RNAi und *P. luminescens*-Infektion ist nahezu identisch mit derjenigen mit zusätzlicher 17 β -Östradiol-Applikation ($p > 0,05$). Beide zeigten eine, aufgrund der *vit-2*-RNAi, signifikant verkürzte Lebensspanne im Vergleich zum infizierten Wildtyp ($p < 0,001$).

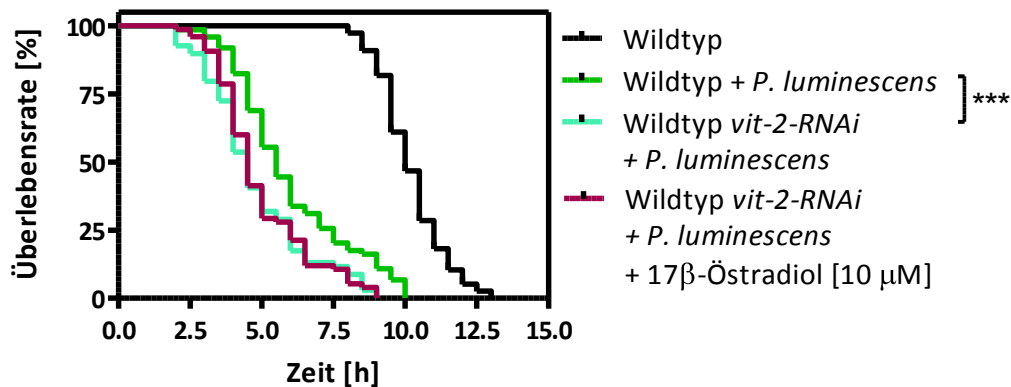


Abbildung 4.32 Effekt der *vit-2-RNAi* bei gleichzeitiger 4-tägiger Inkubation mit 17β-Östradiol [10 μM] und 24 h Inkubation mit *P. luminescens* auf die Überlebenskurven von *C. elegans* unter Hitzestress.

17β-Östradiol konnte unter *vit-2-RNAi* die Reduktion der Lebensspanne durch die kombinierte *P. luminescens* + *vit-2-RNAi*-Behandlung nicht beeinflussen ($p > 0,05$; Tabelle B 7.19). Diese Befunde unterstreichen das Postulat eines immunprotektiven Schutzes durch die Vitellogenine und ihre Induktion durch 17β-Östradiol. Um letztere zu verifizieren, wurden die *vit-2*-mRNA-Spiegel mittels einer qRT-PCR bestimmt.

Quantifizierung der *vit*-Expression nach Inkubation mit 17β-Östradiol mittels qRT-PCR

Wie in Abbildung 4.33 ersichtlich führte eine 4-tägige Inkubation mit 10 μM 17β-Östradiol im Wildtyp zu einer signifikanten Erhöhung der *vit-2*-Expression. Die relative *vit*-Expression, angegeben als $2^{-\Delta\Delta CT}$, zeigte eine Induktion der *vit-2*-Expression nach 17β-Östradiol Behandlung um den Faktor $20,3 \pm 0,8$ im Vergleich zur Kontrolle ($1,0 \pm 0,8$; $p < 0,001$). Diese Ergebnisse implizieren ERE-Motive in der Promotorregion der Vitellogenine, die eine signifikante Expressionssteigerung der Vitellogenine nach Aktivierung durch 17β-Östradiol induzieren.

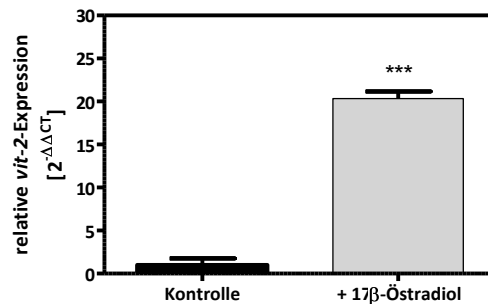


Abbildung 4.33 Relative *vit-2*-Expression nach 4 Tagen 17β-Östradiol [10 μM] Inkubation in *C. elegans*.

Die Daten der qRT-PCR-Analyse repräsentieren zusammengefasste MW ± SD aus jeweils zwei unabhängigen Analysen mit Mehrfachbestimmung, sowie aus zwei verschiedenen Primerpaaren im Verhältnis zu 18S und Normalisierung zur Kontrollgruppe (n = 12). *** p < 0,001

4.1.13 Bedeutung des nukleären Hormonrezeptors NHR-14 für die durch 17β-Östradiol induzierte Lebensspanne-Verlängerung in *P. luminescens* infizierten Tieren

Für den nukleären Hormonrezeptor 14 (NHR-14) ist eine mögliche Östrogen-Wirkung beschrieben. Um zu überprüfen, ob die durch 17β-Östradiol verursachte Lebensspanne-Verlängerung in *P. luminescens* exponierten Nematoden von NHR-14 abhängt, wurde der Transkriptionsfaktor mittels RNAi in der Expression verringert. Ausgangsannahme ist, dass eine *nhr-14*-RNAi zu einer verminderten 17β-Östradiol-Wirkung insbesondere bezüglich der *vit*-Expression führt und somit die Immunantwort reduziert ist.

Nhr-14*-RNAi hat keinen Einfluss auf den lebensverkürzenden Effekt von *P. luminescens* in *C. elegans

Wie aus Abbildung 4.34 hervorgeht, zeigte sich eine geringe, aber signifikante Lebensverlängerung nach *nhr-14*-RNAi im Vergleich zur Kontrolle um 7,3 % (p < 0,01). *Nhr-14*-RNAi hatte allerdings keinerlei Effekt auf die durch *P. luminescens* verkürzte Lebensspanne in *C. elegans* (p > 0,05; Tabelle B 7.20).

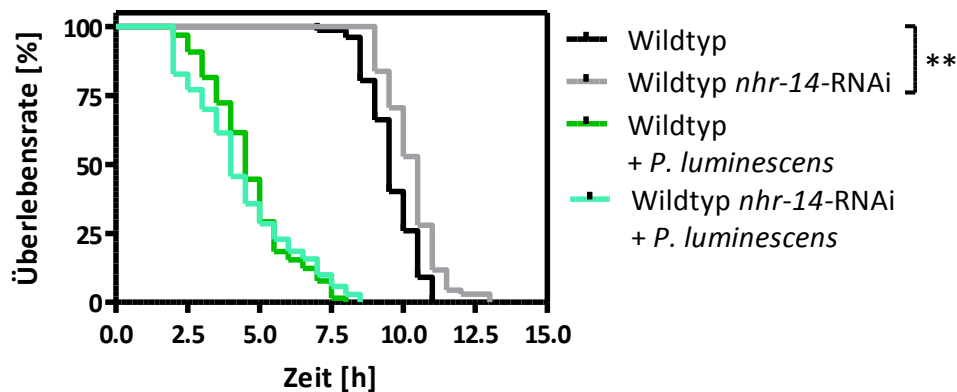


Abbildung 4.34 Effekt der *nhr-14*-RNAi auf die Lebensverkürzung von 24 h *P. luminescens*-Inkubation in *C. elegans* N2 unter Hitzestress.

Nhr-14-RNAi zeigt keinen Einfluss auf einen 17β -Östradiol-Effekt nach *P. luminescens*-Behandlung im Wildtyp

Um eine *NHR-14*-Unabhängigkeit im Rahmen einer *P. luminescens*-Infektion letztlich zu verifizieren, wurden folgend *nhr-14* defiziente Nematoden mit *P. luminescens* und/oder 17β -Östradiol inkubiert und anschließend die Lebensspanne unter Hitzestress bestimmt.

Wie aus den Überlebenskurven der Abbildung 4.35 ersichtlich wird, blieb der protektive Effekt von 17β -Östradiol auf die *P. luminescens*-bedingte Lebensverkürzung in *nhr-14* defizienten Nematoden erhalten. 17β -Östradiol steigerte in *nhr-14* defizienten Nematoden die mittlere Lebensspanne bei *P. luminescens*-Infektion von $8,4 \pm 1,4$ h auf $10,6 \pm 2,3$ h ($p < 0,001$; Tabelle B 7.21).

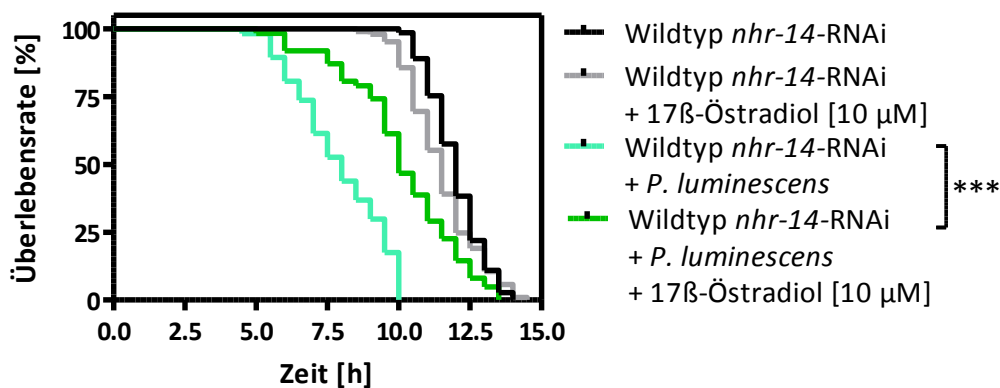


Abbildung 4.35 Effekt der *nhr-14*-RNAi auf die Lebensverkürzung einer *P. luminescens*-Inkubation und 17β -Östradiol [10 μ M] Applikation in *C. elegans* N2 unter Hitzestress.

***Nhr-14*-RNAi hat keinen Einfluss auf die Expression von Vitellogeninen**

Da die Effekte des 17β -Östradiols auf die Immuno-Protektion des Wurmes NHR-14 unabhängig waren, lag es nahe zu vermuten, dass NHR-14 auch keinen maßgeblichen Effekt auf die VIT-6-Expression besitzt. Abbildung 4.36 zeigt die Detektion der VIT-6-Proteinexpression durch Western Blot-Analyse. *Nhr-14* defiziente Tiere wiesen keine signifikant verminderte VIT-6-Expression auf (91 ± 12 % der Kontrolle, $p > 0,05$), was die Vermutung bestätigt.

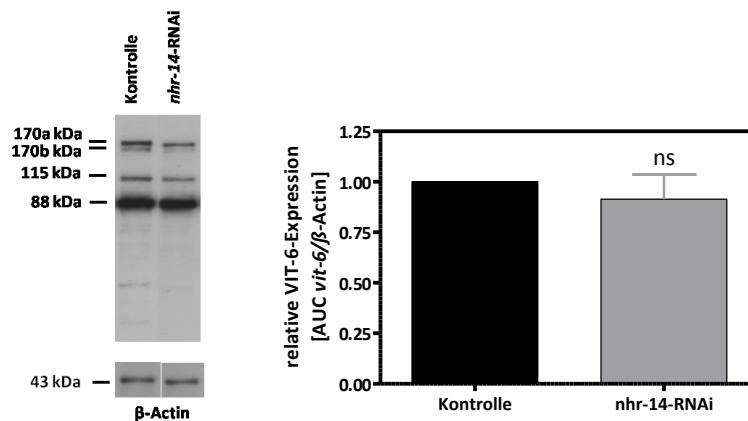


Abbildung 4.36 Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in *nhr-14*-RNAi behandelten *C. elegans*.

Links ist eine repräsentative Western Blot Analyse für VIT-6 und das Referenzprotein β -Actin dargestellt. Die molekularen Massen der Proteine sind in kDa angegeben. Die Quantifizierung der VIT-6-Expression relativ zu β -Actin wurde densitometrisch ermittelt (rechts). Dargestellt sind MW \pm SD ($n = 3$).

4.1.14 Der Einfluss des Phytoöstrogens Genistein auf die Lebensspanne in *P. luminescens* exponierten *C. elegans*

Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu 17β -Östradiol wird das Soja-Isoflavonoid Genistein als eine potentiell Östrogen-wirksame Substanz und somit als Phytoöstrogen bezeichnet. In Abhängigkeit der endogenen Östrogen-Spiegel kann es aber auch als potentes Anit-Östrogen wirken. Untersucht wurden die östrogenen/anit-östrogenen Effekte von Genistein auf die Lebensspanne unter Hitzestress mit und ohne zeitgleichem *Knock-down* von *vit-6* und Infektion mit *P. luminescens*.

Genistein führt zu einer additiven Verkürzung der Lebensspanne nach Behandlung mit *P. luminescens*

Wie aus Abbildung 4.37 ersichtlich, hatte Genistein keinen Einfluss auf die Überlebenskurve ($p > 0,05$). Außerdem führte die 4-tägige Behandlung mit 100 μM Genistein unter Applikation von *P. luminescens* zu einer zusätzlichen Lebensverkürzung um durchschnittlich 12,5 % im Vergleich zur alleinigen Applikation von *P. luminescens* ($p < 0,001$; Tabelle B 7.22).

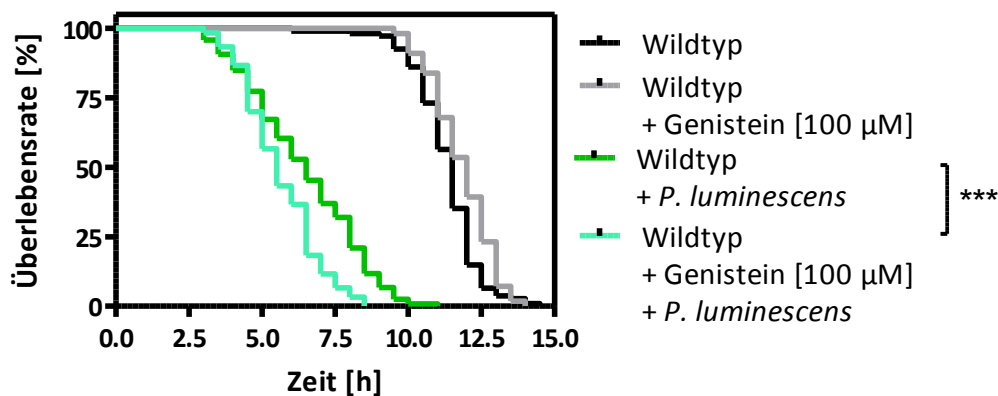


Abbildung 4.37 Effekt einer *P. luminescens*-Behandlung und Inkubation mit Genistein [100 μM] auf die Lebensspanne im *C. elegans* Wildtyp unter Hitzestress.

Diese Ergebnisse lassen auf eine mögliche anti-östrogene Wirkung des Genisteins, insbesondere auf die Vitellogenin-Expression, schließen.

Vit-6-RNAi verstärkt den lebensverkürzenden Effekt von Genistein nach *P. luminescens*-Infektion

Wie aus Abbildung 4.38 ersichtlich, bewirkte der *Knock-down* von *vit-6* eine zusätzliche Reduktion der Lebensspanne in den mit *P. luminescens* und Genistein behandelten Nematoden ($p < 0,001$; Tabelle B 7.23).

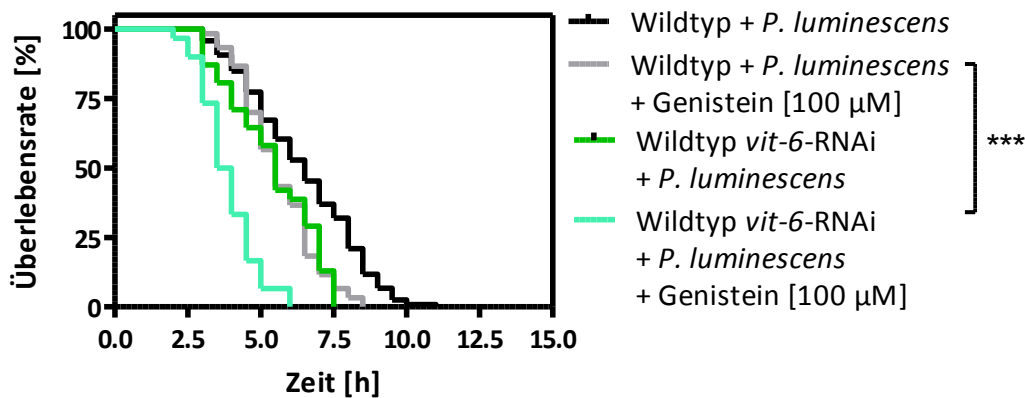


Abbildung 4.38 Effekt einer Genistein-Behandlung [100 µM] unter *P. luminescens*-Exposition und *vit-6*-RNAi auf die Lebensspanne im *C. elegans* Wildtyp unter Hitzestress.

Genistein vermindert die mRNA- und Protein-Spiegel der Vitellogenine

Ob die Lebensspanne-reduzierende Effekte von Genistein in *P. luminescens* inkubierten Nematoden auf einer reduzierten *vit*-Expression beruhen, sollte abschließend ermittelt werden. Zunächst wurde die *vit-2*- und *vit-6*-mRNA-Expression Genistein inkubierter Nematoden mittels qRT-PCR mit spezifischen *vit-2*- und *vit-6*-Primern bestimmt. Es konnte eine verminderte *vit*-Expression auf 30,5 % (*vit-2*, $p < 0,05$) bzw. 30,4 % (*vit-6*, $p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden (Abbildung 4.39).

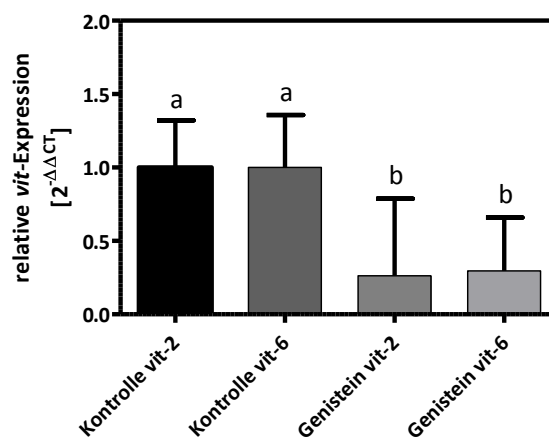


Abbildung 4.39 Relative *vit-2*- und *vit-6*-Expression nach Genistein Behandlung [100 µM] in *C. elegans*.

Nach 4-tägiger Inkubation ab L1-Stadium mit Genistein wurde mittels qRT-PCR-Analyse die relative Expression der *vit-2*- und *vit-6*-Transkripte quantifiziert. Dargestellt sind die MW \pm SD aus zwei unabhängigen Analysen mit Mehrfachbestimmung im Verhältnis zu 18S und Normalisierung gegen die Kontrolltiere. Beim statistischen Vergleich der unterschiedlichen Behandlungsgruppen miteinander geben unterschiedliche Buchstaben signifikante Unterschiede an.

In der Western Blot-Analyse wurde die VIT-6-Expression mittels spezifischem VIT-6-Antikörper bestimmt. Hierbei wurden die qRT-PCR-Ergebnisse auf Protein-Ebene bestätigt. Eine Genistein-Inkubation führte zu einer um 75 ± 11 % verminderten VIT-6-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 4.40).

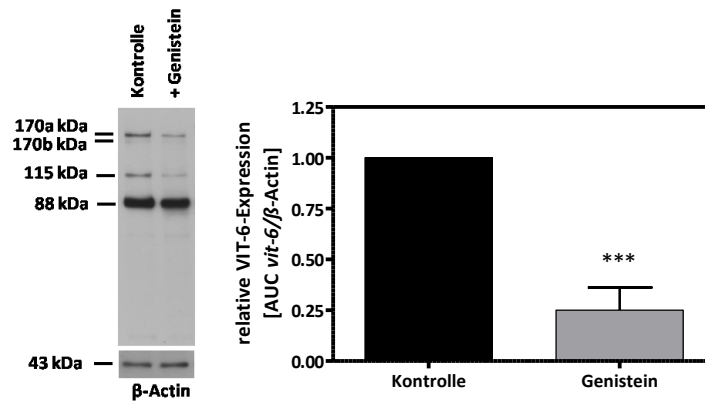


Abbildung 4.40 Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in *C. elegans* N2 nach Inkubation mit Genistein [100 μ M].

Links ist eine repräsentative Western Blot-Analyse mit VIT-6 und dem Referenzprotein β -Actin dargestellt. Die molekularen Massen der Proteine sind in kDa angegeben. Die Quantifizierung der VIT-6-Expression im Verhältnis zu β -Actin wurde densitometrisch ermittelt (rechts). Dargestellt sind MW \pm SD (n = 3). *** p < 0,001.

Genistein vermindert sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene statistisch signifikant die Vitellogenin-Expression, dies impliziert dessen anti-östrogene Kapazität und erklärt die immun-suppressive Wirkung von Genistein in *P. luminescens*-infizierten Tieren.

4.2 Bedeutung der Zinkmetalloprotease ZMP-2 für die Lebensspanne unter Hitzestress in *C. elegans*

In diesem zweiten Ergebnis-Kapitel wurde die Zinkmetalloprotease-2 (ZMP-2) mittels RNAi vermindert exprimiert. Hierbei lag die Vermutung zugrunde, dass durch den *zmp-2-Knock-down* oxidativer Stress induziert wird, welcher zur Akkumulation extrazellulärer Proteine und Lipide führt. In diesem Zusammenhang wurde die Bedeutung der Vitellogenine als Transporter oxidierter Lipide untersucht. Aber auch der Vitellogenin-vermittelte Cholesteroltransport, welcher über DAF-9, DAF-12 und DAF-16 die Vitellogenin-Synthese beeinflusst, wurde als potentieller Schutzmechanismus in Betracht gezogen.

Die zu diesem Kapitel zugehörigen Tabellen mit den entsprechenden statistischen Auswertungen sind im Appendix C aufgelistet.

4.2.1 *Zmp-2*-RNAi verkürzt die Lebensspanne in *C. elegans* unter Hitzestress

Um die Funktion des ZMP-2 *in vivo* untersuchen zu können, wurde zunächst dessen Expression durch RNAi vermindert. In einem ersten Schritt wurden ausschließlich diese RNAi-Klone an die Würmer verfüttert. In einem zweiten Ansatz erhielten die Würmer eine 1:1 Mischung aus Kontroll- und *zmp-2*-RNAi-Klonen, damit ein Vergleich für spätere Doppel-RNAi-Versuche gezogen werden kann. In Abbildung 4.41 und Tabelle C 7.1 ist ersichtlich, dass sowohl eine ausschließliche *zmp-2*-RNAi als auch eine verdünnte RNAi zu einer signifikanten Lebenszeitverkürzung im Wildtyp N2 unter Hitzestress führten. Der RNAi-Verdünnungseffekt ist sichtbar, da sich die Überlebenskurve der verdünnten RNAi signifikant von der *zmp-2*-RNAi Überlebenskurve signifikant unterscheidet ($p < 0,001$).

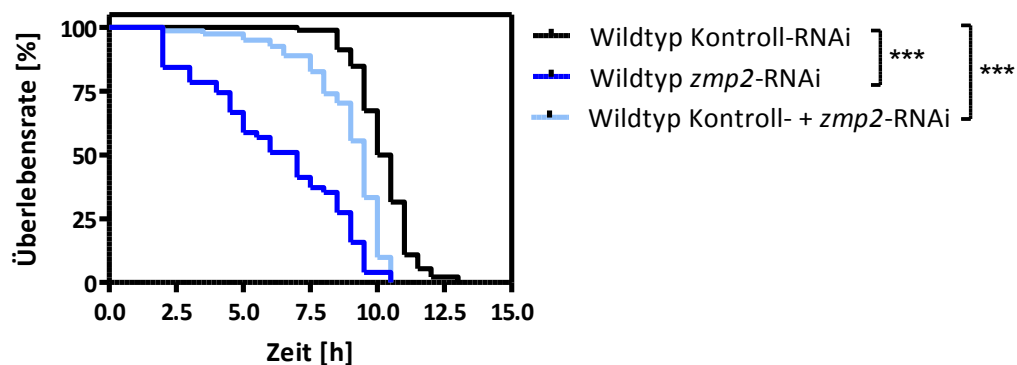


Abbildung 4.41 Effekt der *zmp-2*-RNAi auf die Lebensspanne im *C. elegans* Wildtyp unter Hitzestress.

4.2.2 Stadien- und gewebespezifische Lokalisation der *zmp-2*-Expression

Um die Lebensspanne-beeinflussenden Effekte *zmp-2* defizienter Nematoden näher zu erklären, wurden GFP-Lokalisationsstudien nachfolgend durchgeführt. Anhand der ZMP-2-Lokalisation können Rückschlüsse gezogen werden, in welchen Stadien der Entwicklung und in welchen Zellen ZMP-2 aktiv ist. Hierzu wurde der transgene Stamm *zmp-2::gfp* im Rahmen dieser Arbeit generiert. Zur Erstellung des transgenen Wurmstamms *zmp-2::gfp* wurden wie in 3.2.3.4 beschrieben die GFP cDNA an eine 2,1 kb große *zmp-2*-Promotorsequenz fusioniert. Ein Vorteil dieses Konstrukts ist, dass die Transkription des Gens vom eigenen Promotor kontrolliert wird. Dies führt zu einer möglichst realistischen Wiedergabe der *in vivo* *zmp-2*-Transkription in *C. elegans*, da die Promotoraktivität proportional zum Fluoreszenzlevel ist. Somit kann die Expressionsmenge, der -ort, sowie die -zeit von *zmp-2*

mittels GFP-Detektion bestimmt werden und hiermit einhergehend auf die physiologischen Funktionen von ZMP-2 geschlossen werden.

Die Embryonen entwickeln sich maternal vom Einzellstadium bis hin zum Vielzellstadium, in welchem sie dann abgelegt werden und sich anschließend über das 1,5-fold – 3-fold-Stadium zur L1-Larve entwickeln, bevor sie schlüpfen. Im Einzellstadium wird das Ei von der Spermatheca umschlossen, in welcher eine deutliche *zmp-2*-Expression detektiert werden konnte (Abbildung 4.42 A 1+2 und A 5+6). Demnach kann ein Einfluss von ZMP-2 in der Keimbahn bzw. bei der Fertilisation vermutet werden. Wie aus den Abbildung 4.42 A 1-4 ersichtlich wird, war *zmp-2* schon im Embryo im Vielzellstadium kurz vor der maternalen Eiablage zunächst diffus exprimiert. Im Verlauf der Embryonenentwicklung konnte eine gewebespezifische Ausprägung betrachtet werden. War im Vielzellstadium noch eine diffuse Expression zu erkennen (Abbildung 4.42 A7+8), wurden im 1,5-fold (Abbildung 4.42 A9+10) und 3-fold-Stadium (Abbildung 4.42 A11+12) eine deutliche epidermale Expression sichtbar.

Abbildung 4.43 B1+2 zeigen eine L2-Larve während der Häutung zur L3-Larve. Diese Abbildungen implizieren einen *zmp-2*-Einfluss während des Häutungsprozesses. Um dies näher zu betrachten, wurden Nematoden des transgenen Stammes *zmp-2::gfp* mittels Hungern über einen Zeitraum von zwei Wochen in das Dauerlarvenstadium versetzt. Danach wurden die Tiere mit 1 % SDS gewaschen, diesen Waschschrift überleben nur Tiere im Dauerstadium. Anschließend wurden die Tiere mit *E. coli*-OP50 gefüttert und jede Stunde konfokal die GFP-Expression detektiert. Hierbei zeigte sich nach ca. 8 h eine *zmp-2*-Expression in epidermalen Zellen, die mit denen der Abbildung 4.43 B1+2 vergleichbar ist (Bilder nicht gezeigt). In der Literatur ist ein Zeitraum von ca. 10 h nach der Wahrnehmung von günstigeren Bedingungen beschrieben, bis sich der Wurm häutet und zur L4-Larve entwickelt. Diese Ergebnisse unterstützen die Aussage, dass ZMP-2 eine wichtige Funktion im Häutungsprozess übernimmt.

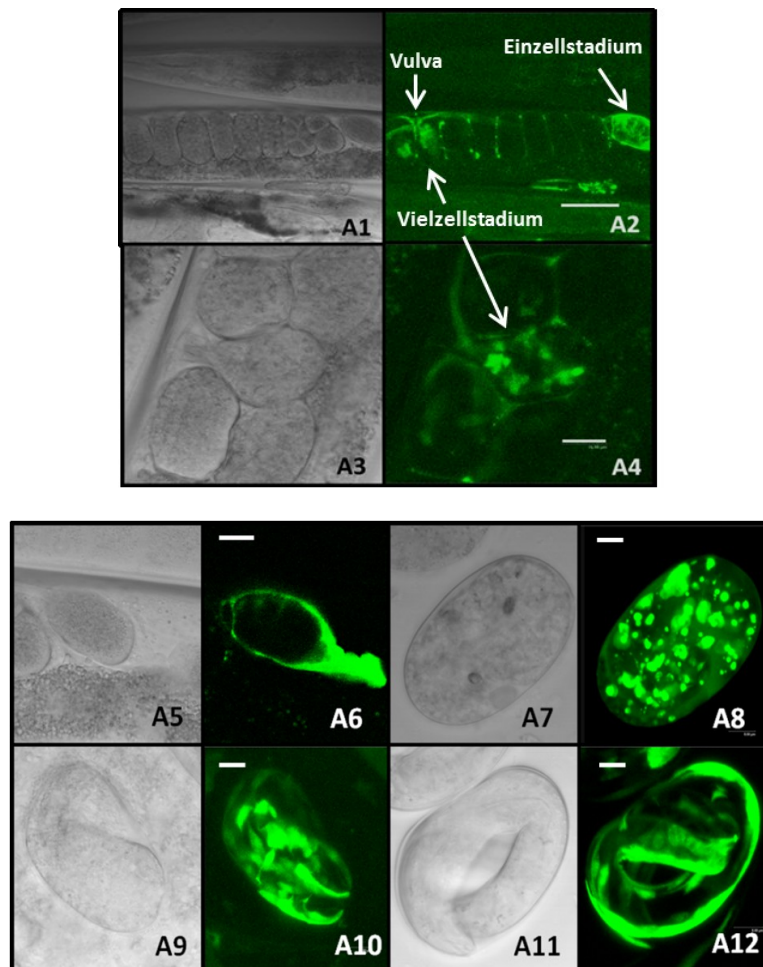


Abbildung 4.42 Embryonale Expression von *zmp-2* in *C. elegans*.

Eine *zmp-2*-Expression im transgenen Stamm *zmp-2::gfp* war ab dem Vielzellstadium zu erkennen. Eier kurz vor der Ablage zeigten erstmals eine *zmp-2*-Expression (A1-4). Nach der Eiablage wurde *zmp-2* zunächst diffus (A7+8) exprimiert, im 1,5-fold (A9+10) und 3-fold-Stadium (A11+12) war dann eine gewebespezifische *zmp-2*-Expression erkennbar. Das Ei im Einzelstadium ist von der Spermatheca umschlossen, in welcher ebenfalls eine *zmp-2*-Expression detektiert werden konnte (A1+2, A5+6). Ungerade Zahlen zeigen jeweils das Lichtbild zu den entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen. Größenbalken: A2: 40 μm , A4/6: 16 μm , A8/10/12: 8 μm .

Ab dem L4-Larvenstadium werden Spermathecae und Vulva gebildet, zu diesem Zeitpunkt war in diesen Geweben eine stadienspezifische Ausprägung von ZMP-2 zu detektieren (Abbildung 4.43 D1+2, E1+2). Posterior gelegene Strukturen, die möglicherweise Zellen des Intestinums repräsentieren, zeigten ab dem L1-Larvenstadium bis zum adulten Tier eine *zmp-2*-Expression (Abbildung 4.43 C1+2, Abbildung 4.44 F1+2). Ab dem gleichen Zeitpunkt waren ebenfalls zwei Zellen im Bereich des Kopfes GFP markiert, die einen potentiellen Einfluss durch ZMP-2 auf neuronale Strukturen vermuten lassen (Abbildung 4.43 C1+2, Abbildung 4.44 G1+2).

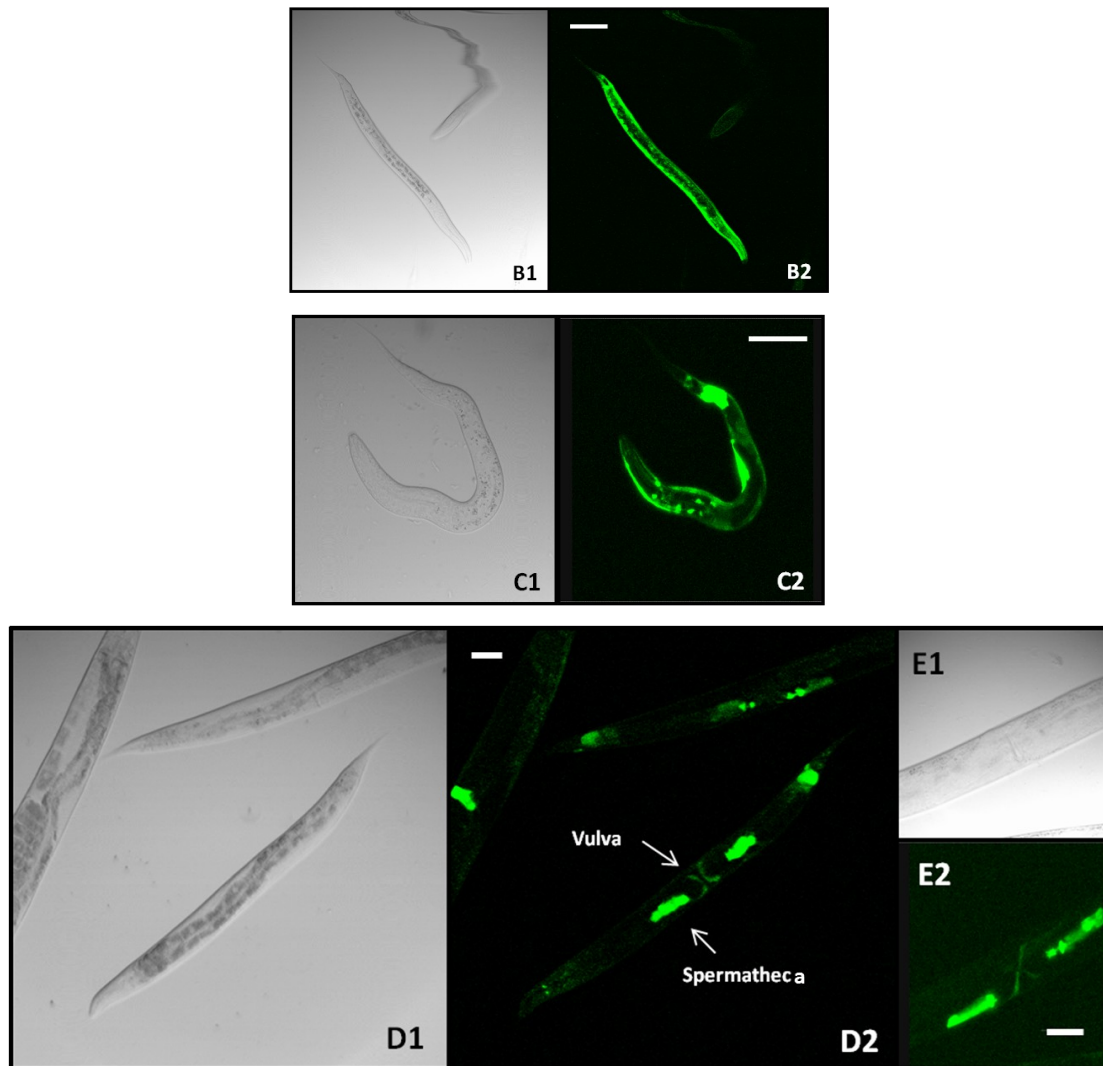


Abbildung 4.43 *zmp-2*-Expression in *C. elegans*-Larven.

B1+2 zeigen eine hypodermale Expression von *zmp-2* einer L2-Larve, die sich gerade im Häutungsprozess zur L3-Larve befindet. GFP-markierte Gewebestrukturen ab dem L1-Larvenstadium repräsentieren eine *zmp-2*-Expression in den posterioren Darmzellen und in zwei Kopfneuronen (C1+2). D1+2 und E 1+2 zeigen L4-Larven. In diesem Stadium war die Beteiligung von ZMP-2 an der Spermathecae- und Vulva-Entwicklung ersichtlich. Ungerade Zahlen zeigen jeweils das Lichtbild zu den entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen. Größenbalken: B2/C2/D2/E2: 40 μm .

In adulten Hermaphroditen war die stärkste Expression in den beiden Spermathecae, sowie am Übergang von Spermatheca zu Uterus und uterinen Muskeln zu erkennen (Abbildung 4.44 H1-H4, Abbildung 4.42 A1+2). *Zmp-2* defiziente Nematoden zeigten phänotypisch eine verminderte Anzahl an Nachkommen, dies könnte auf die ZMP-2-Lokalisation in den Spermathecae zurückzuführen sein.

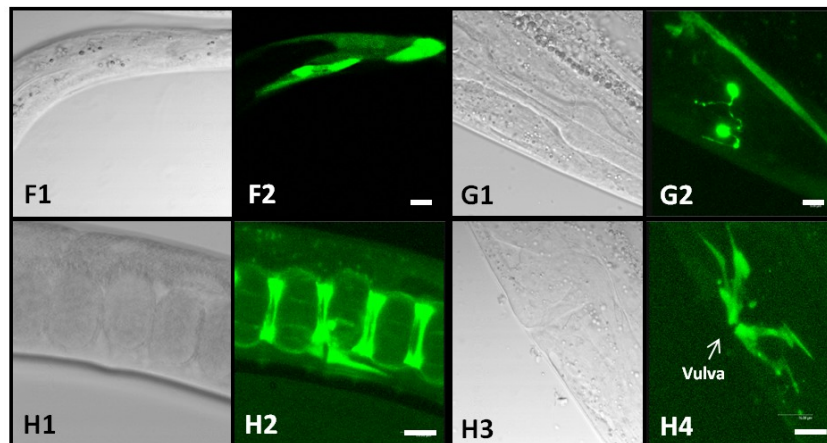


Abbildung 4.44 *zmp-2*-Expression in adulten Tieren.

Ab dem L1-Larvenstadium bis zum adulten Tier war eine *zmp-2*-Expression in posterioren Darmzellen zu erkennen (F1+2). Ebenfalls ab L1 wurde eine *zmp-2*-Expression in zwei Kopfneuronen detektiert (G1+2). In H1-4 konnte eine *zmp-2*-Expression in der Vulva und in uterinen Muskelzellen adulter Hermaphroditen beobachtet werden. Ungerade Zahlen zeigen jeweils das Lichtbild zu den entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen. Größenbalken: F2/G2: 8 μ m, H2: 20 μ m, H4: 160 μ m.

4.2.3 Vitellogeneine werden für die Lebensspanne-Verkürzung durch *zmp-2*-RNAi benötigt

Nachdem gezeigt wurde, dass sowohl die alleinige als auch die verdünnte *zmp-2*-RNAi die Lebensspanne in *C. elegans* unter Hitzestress verkürzten, wurde in einem weiteren Schritt der Effekt einer zusätzlichen *vit*-RNAi auf die Lebensspanne im Wildtyp untersucht. Aus den Überlebenskurven und deren statistischem Vergleich geht hervor (Tabelle C 7.2), dass *vit*-RNAi den lebensverkürzenden Effekt durch *zmp-2*-RNAi in *C. elegans* aufhebt, indem *vit-6*-RNAi in Kombination mit *zmp-2*-RNAi im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Lebensverlängerung bewirkte ($p < 0,001$). Die Kaplan-Meier-Kurven von Kontroll- + *zmp-2*-RNAi und *zmp-2*- + *vit-6*-RNAi sind in Abbildung 4.45 exemplarisch dargestellt.

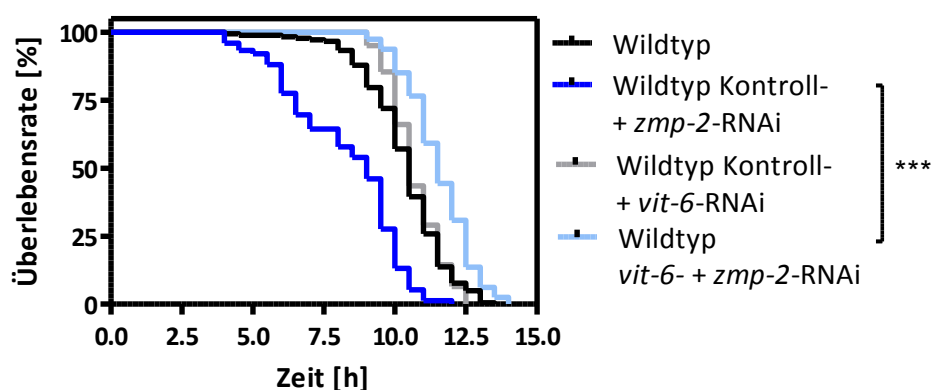


Abbildung 4.45 Effekt der *zmp-2*-RNAi bei zeitgleicher *vit-6*-RNAi auf die Überlebenskurve in *C. elegans* unter Hitzestress.

4.2.4 In *daf-9*- und *daf-12*-Mutanten ist der Effekt von *zmp-2*-RNAi verstärkt

Da vorhergehend (4.1.5) gezeigt wurde, dass DAF-9, DAF-12 und DAF-16 wesentlich die Resistenz gegenüber *P. luminescens* erhöhen, wurde deren Einfluss auf die durch *zmp-2*-RNAi verursachte Lebenszeit-Verkürzung untersucht.

Die Deletionsmutanten zeigten keine Unterschiede in der Überlebensrate im Vergleich zum Wildtyp N2, nach *zmp-2*-RNAi war jedoch eine zusätzliche signifikante Lebensverkürzung im Vergleich zu N2 zu erkennen. In den Überlebenskurven der Abbildung 4.46 fällt die signifikant stärkere Lebensverkürzung durch *zmp-2*-RNAi in der *daf-9*-Mutante ($p < 0,001$) und *daf-12*-Mutante ($p < 0,001$) im Vergleich zum *zmp-2* defizienten Wildtyp auf. Im Mittel lebten die *zmp-2* defizienten *daf*-Mutanten 15 % (*daf-9*-Mutante) bzw. 14 % (*daf-12*-Mutante) kürzer als der *zmp-2*-RNAi behandelte Wildtyp (Tabelle C 7.3).

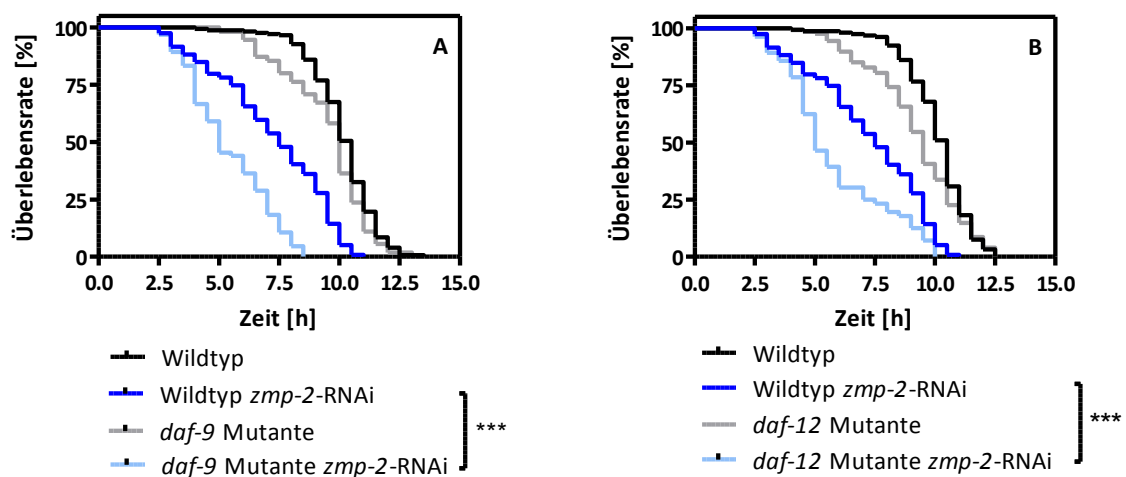


Abbildung 4.46 Effekt der *zmp-2*-RNAi auf die Lebensspanne in der *daf-9*- (A) und *daf-12*-Mutante (B) unter Hitzestress.

Diese Ergebnisse implizieren einen protektiven Einfluss des Steroid-Signalwegs auf die *zmp-2*-RNAi vermittelte Lebensspanne-Verkürzung. Dahingehend zeigte sich, dass keine Lebensspanne-Verkürzung durch *zmp-2*-RNAi sowohl in der *daf-16*-Mutante als auch nach zeitgleicher *daf-16*-RNAi im Wildtyp zu beobachten war (Tabelle C 7.3). In Abbildung 4.47 sind exemplarisch die Überlebenskurven *zmp-2* defizienter *daf-16*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp dargestellt ($p < 0,001$). Dies spricht für eine zentrale Rolle von DAF-16 bei der *zmp-2*-RNAi-vermittelten Lebensverkürzung.

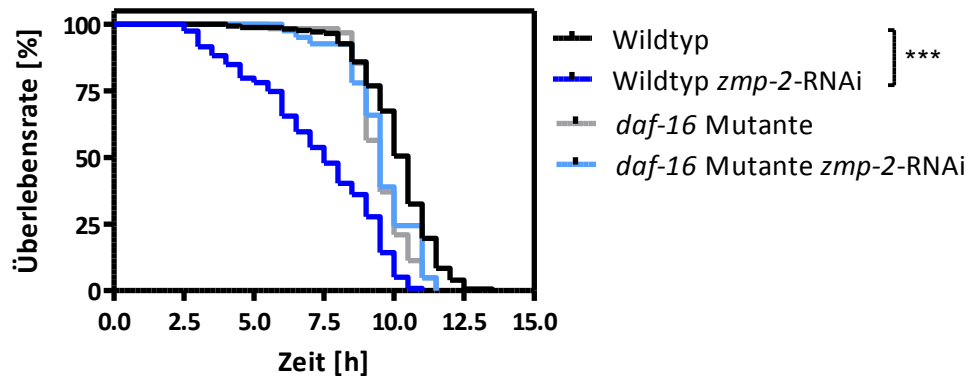


Abbildung 4.47 Effekt der *zmp-2*-RNAi auf die Lebensspanne in der *daf-16*-Mutante unter Hitzestress.

4.2.5 14-3-3-Proteine und SIR-2.1 sind an der *zmp-2*-RNAi induzierten Lebenszeitverkürzung beteiligt

Um die wesentliche Rolle von DAF-16 in der Lebensspanne *zmp-2* defizienter Tiere näher zu untersuchen, wurden die 14-3-3-Proteine (PAR-5, FTT-2, SIR-2.1), die als Co-Faktoren von DAF-16 beschrieben sind (Morton *et al.* 2002, Wang und Shakes 1997), in ihrer Expression vermindert. Analog zu *daf-16* defizienten Nematoden blieb die Lebenszeitverkürzung bei zeitgleicher *zmp-2*-RNAi in *sir-2.1*, *ftt-2* bzw. *par-5* defizienten Tieren aus ($p > 0,05$; Tabelle C 7.4). Wohingegen eine *zmp-2*-RNAi *per se* die Lebensspanne signifikant verkürzte ($p < 0,001$). In Abbildung 4.48 sind beispielhaft die Überlebenskurven des Wildtyps nach *zmp-2*- und *ftt-2*-RNAi, sowie deren kombinierter *Knock-down* dargestellt. Hierin zeigt sich eine Linksverschiebung der Überlebenskurve durch *zmp-2*-RNAi im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,001$), welche jedoch bei zusätzlicher *ftt-2*-RNAi aufgehoben wird ($p > 0,05$).

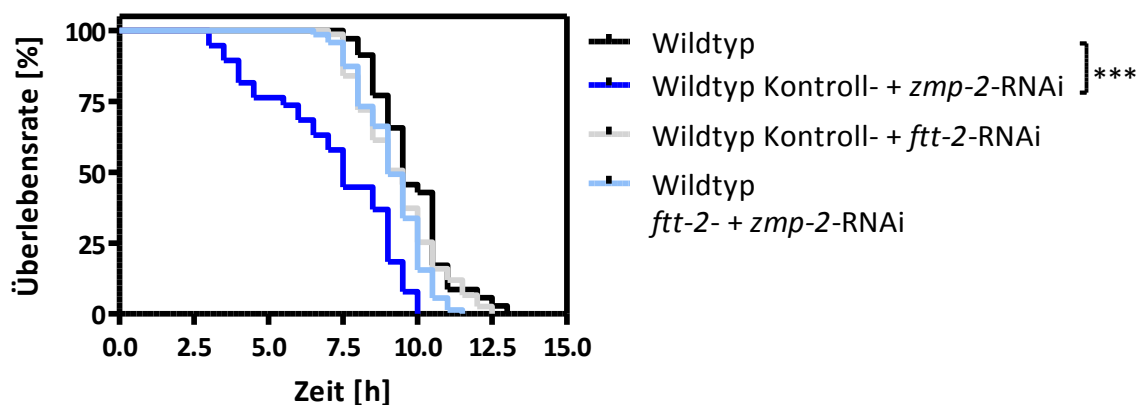


Abbildung 4.48 Effekt der *zmp-2*-RNAi und zeitgleicher *ftt-2*-RNAi auf die Lebensspanne in *C. elegans* N2 unter Hitzestress.

4.2.6 Die durch den funktionellen Verlust von DAF-16 verhinderte Lebensspannen-Reduktion in *zmp-2* defizienten Nematoden benötigt die Aktivität des Steroid-Signalwegs

Aufgrund der ausbleibenden Lebensverkürzung nach *zmp-2*-RNAi und zeitgleichem *daf-16*-*Knock-down* bzw. *daf-16*-*Knock-out*, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt auf die Lebensspanne *daf-12* bzw. *daf-9* benötigt. Hierzu wurde sowohl in der *daf-9*- als auch in der *daf-12*-Deletionsmutanten ein Doppel-RNAi der *zmp-2*- und *daf-16*-Gene durchgeführt. In den beiden Mutanten zeigte sich eine signifikante Lebensverkürzung nach *zmp-2*- und zeitgleicher *daf-16*-RNAi im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,001$; Abbildung 4.49). *Daf-16*-RNAi kombiniert mit *zmp-2*-RNAi in der *daf-9*-Mutante führte im Mittel zu einer 46 %igen Lebensverkürzung im Vergleich zur Kontrolle, in der *daf-12*-Mutante fand eine 37 %ige Reduktion der Lebensspanne statt (Tabelle C 7.5).

Da eine *daf-16*- + *zmp-2*-RNAi in den *daf*-Mutanten (*daf-9* und *daf-12*) eine verkürzte Lebensspanne induzierte, kann davon ausgegangen werden, dass die *zmp-2*-RNAi-Effekte hinsichtlich der Lebensspanne von DAF-16, DAF-9 und DAF-12 abhängig sind und sowohl DAF-9 als auch DAF-12 *down-stream* von DAF-16 agieren.

Hieraus ergibt sich folgendes Konzept: Unter *zmp-2*-RNAi führt eine *daf-16*-Deletion zu einer DAF-9- und DAF-12-abhängigen Lebenszeiterhöhung. Ist jedoch DAF-16 vorhanden, ist die Lebensspanne DAF-9- und DAF-12-abhängig in *zmp-2* defizienten Tieren reduziert. Hierbei unterliegt der Befund, dass ein *daf-9*- und *daf-12*-*Knock-out* unter *zmp-2*-RNAi die Lebensspanne vermindert.

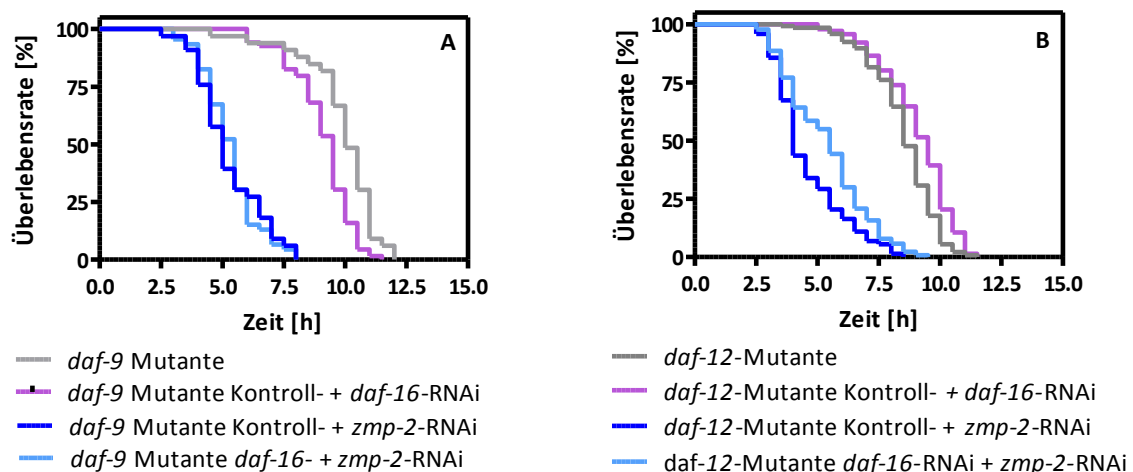


Abbildung 4.49 Effekt der *zmp-2*-RNAi bei zeitgleicher *daf-16*-RNAi auf die Lebensspanne in der *daf-9*- (A) und *daf-12*-Mutante (B) unter Hitzestress.

4.2.7 Der Einfluss von Vitellogeninen auf die Lebensspanne in *zmp-2* defizienten Tieren wird über den Steroid-Signalweg vermittelt

Bislang ließ sich aus den Ergebnissen ableiten, dass funktionelles Vitellogenin und DAF-16 notwendig sind, um unter *zmp-2*-RNAi die Lebensspanne zu vermindern. Außerdem wirken DAF-9 und DAF-12 Lebenszeitverlängernd bei *zmp-2*-Defizienz. Aufgrund der Eigenschaft als Transporter apolarer Moleküle wurde auch hier der Einfluss der Vitellogenine auf den Steroid-Signalweg (DAF-9 und DAF-12) in Abhängigkeit des Interaktionspartners DAF-16 auf die *zmp-2*-RNAi induzierte Lebensverkürzung und der dies unterstützenden Vitellogenin-Wirkung hin überprüft.

In der Deletionsmutante *daf-12* fand keine Rechtsverschiebung der Überlebenskurven durch *vit*-RNAi bei zeitgleicher *zmp-2*-RNAi statt, wie exemplarisch für *vit-3*-RNAi in Abbildung 4.50 dargestellt ist. Diese *vit*- + *zmp-2*-RNAi behandelten *daf-12*-Mutanten zeigten je nach untersuchtem Vitellogenin eine 43 - 45 %ige Lebenszeitverkürzung. In der *daf-9*-Mutante ist ein partieller Effekt vorhanden. Die *zmp-2*-RNAi induzierte Lebensverkürzung wurde nach *vit-5*- + *zmp-2*-RNAi partiell aufgehoben (Tabelle C 7.6), nach *vit-3*- + *zmp-2*-RNAi fand kein Anstieg der Lebensspanne statt (Abbildung 4.50).

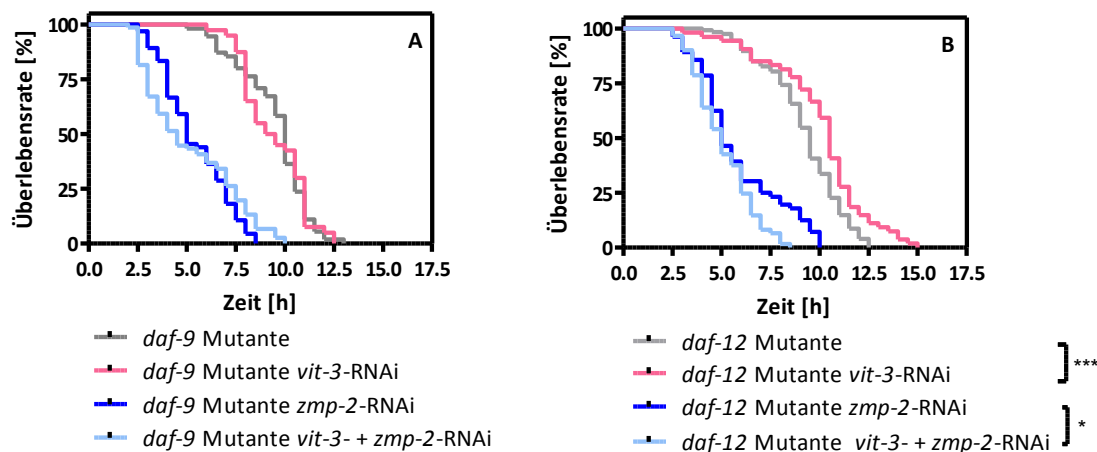


Abbildung 4.50 Effekt der *zmp-2*-RNAi bei zeitgleicher *vit-3*-RNAi auf die Lebensspanne der *daf-9*- (A) und *daf-12*-Mutante (B) unter Hitzestress.

Im Mittel zeigten die *vit-5*- + *zmp-2*-RNAi behandelten *daf-9*-Mutanten eine 19 %ige Lebensverkürzung im Vergleich zur Kontrolle. Eine kombinierte *vit-3*- + *zmp-2*-RNAi führte hingegen zu einer 45 %igen Lebensverkürzung in der *daf-9*-Mutante (Tabelle C 7.6). In diesem Zusammenhang sind diese DAF-Proteine als essentiell für den *vit*-RNAi induzierten Ausgleich der verkürzten Lebensspanne *zmp-2* defizienter Nematoden anzusehen.

Sowohl *daf-16*-RNAi als auch *vit*-RNAi brauchen funktionales DAF-9 und DAF-12 für die Lebenszeitverlängerung unter *zmp-2*-RNAi. Dieses Ergebnis verwundert in Bezug auf die Funktion der Vitellogenine, insofern postuliert wurde, dass sie Substrate für DAF-9 und damit auch für DAF-12 liefern. Erklärbar wäre das Ergebnis aber, wenn nach *vit*-RNAi (Reduktion der Expression auf 13 %) noch genügend Cholesterol für die Synthese dafachronischer Substrate transportiert würde und die Aktivierung von DAF-12 die toxischen Effekte transportierter oxidierter Cholesterole überkompensiert.

4.2.8 *Zmp-2*-RNAi induziert eine nukleäre DAF-16-Lokalisation in *C. elegans*

Die adulten *daf-16::gfp*-Tiere zeigten nach *zmp-2*-RNAi, im Gegensatz zu *P. luminescens* infizierten Tieren, keine extra-intestinale nukleäre DAF-16::GFP-Lokalisation. Es ist lediglich eine nukleäre, cytosolische bzw. intermediäre DAF-16-Lokalisation zu detektieren. In *zmp-2* defizienten TJ356-Tieren trat eine vorherrschende nukleäre DAF-16-Akkumulation von ca. 86 % (Kontrolle: 2 %) auf. Eine intermediäre Verteilung von DAF-16 zeigte sich in 12 % der

Tiere, eine cytosolische DAF-16-Lokalisation war hingegen nur noch in 2 % der Tiere zu beobachten (Abbildung 4.51). Diese Ergebnisse suggerieren einen vermehrten ROS-Stress *zmp-2* defizienter Nematoden, der als Vermittler einer nukleären DAF-16-Translokation beschrieben ist.

In *zmp-2* defizienten Nematoden lag DAF-16 nahezu vollständig nukleär vor. In einem nächsten Schritt wurde der *vit*-RNAi-Einfluss in *zmp-2*-RNAi behandelten Nematoden überprüft. Sowohl bei alleiniger als auch bei zeitgleicher RNAi von *vit-3*, *vit-5* und *zmp-2* konnte ebenfalls eine nahezu vollständige DAF-16-Akkumulation im Nukleus beobachtet werden (Abbildung 4.51).

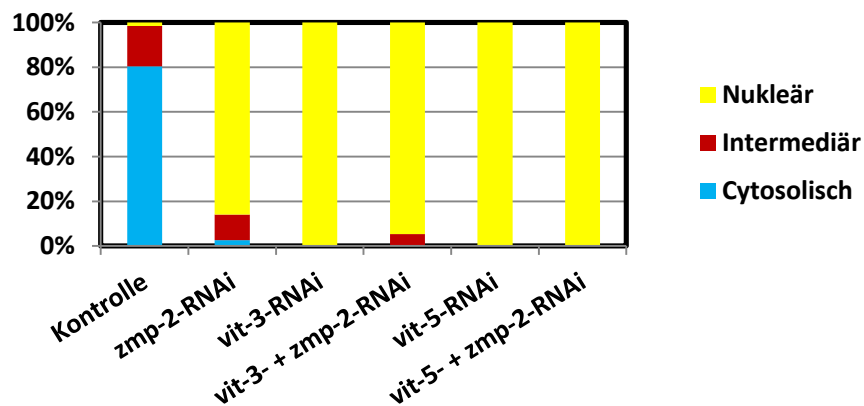


Abbildung 4.51 DAF-16-Translokation der *daf-16::gfp*-Mutante nach kombinierter *zmp-2*- und *vit*-RNAi.

4.2.9 Quantifizierung der Vitellogenin-Expression nach *zmp-2*-RNAi mittels qRT-PCR und Western Blot

Weiterhin wurde der Einfluss der *zmp-2*-RNAi auf die Vitellogenin-Expression untersucht. Letztere wurde sowohl auf RNA- (qRT-PCR) als auch auf Protein-Ebene (Western Blot) quantifiziert. Wie in Abbildung 4.52 ersichtlich wird eine signifikant geringere Menge von *vit-2*- und *vit-6*-mRNA in *zmp-2*-RNAi-Nematoden im Vergleich zum Kontrollextrakt ($p < 0,001$) nachgewiesen. Deren statistischer Vergleich zeigt, dass eine *zmp-2*-RNAi zu einer signifikanten Reduktion sowohl der *vit-2*- ($0,01 \pm 0,4$) als auch der *vit-6*-Expression ($0,01 \pm 0,3$) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ($1,0 \pm 0,3$ bzw. $1,0 \pm 0,4$) führte.

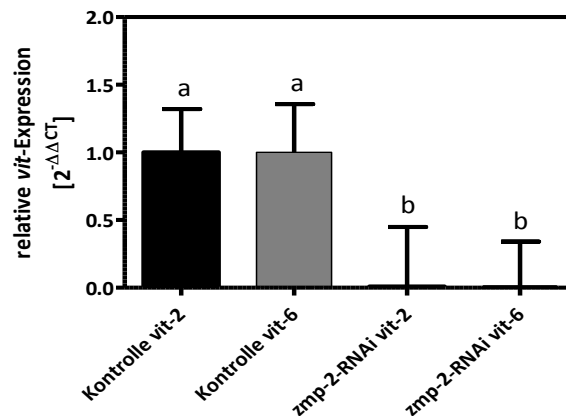


Abbildung 4.52 Relative *vit-2*- und *vit-6*-Expression nach 4-tägiger *zmp-2*-RNAi in *C. elegans*.

Die Balken repräsentieren die Mittelwerte (MW ± SD) aus jeweils zwei unabhängigen qRT-PCR-Analysen (n = 7). Beim statistischen Vergleich mittels ANOVA und Bonferroni-Holm *post hoc*-Test der unterschiedlichen Behandlungsgruppen miteinander geben unterschiedliche Buchstaben signifikante Unterschiede an.

Eine weitere Methode zur Expressionsquantifizierung der Vitellogenine ist die Western Blot-Analyse. Auf der Proteinebene kam es ebenfalls zu einer starken Reduktion der VIT-6-Expression, wenngleich nicht so stark ausgeprägt wie auf mRNA-Ebene. Eine *zmp-2*-RNAi führte zu einer signifikanten Reduktion der relativen VIT-6-Proteinmenge auf 43 % im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,01$; Abbildung 4.53).

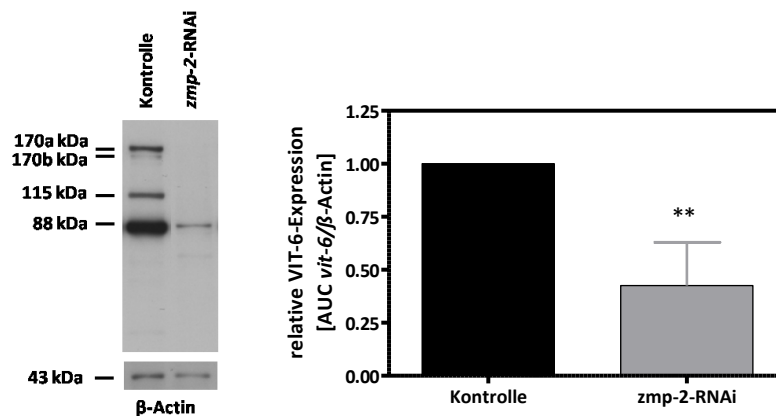


Abbildung 4.53 Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der VIT-6-Expression in *zmp-2*-RNAi behandelten *C. elegans*.

Links ist eine repräsentative Western Blot-Analyse mit VIT-6 und dem Referenzprotein β -Actin dargestellt. Die molekularen Massen der Proteine sind in kDa angegeben. Die Quantifizierung der VIT-6-Expression im Verhältnis zu β -Actin wurde densitometrisch ermittelt (rechts). Dargestellt sind MW ± SD (n = 3). ** $p < 0,01$.

Die Effekte einer *zmp-2*-RNAi scheinen insgesamt sehr stark von der Vitellogenin-Expression abzuhängen. So führte eine *zmp-2*-RNAi selbst zur Verminderung der VIT-Expression. Die Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses auf die Lebensspanne sind jedoch völlig konträr: *zmp-2*-RNAi verkürzte die Lebensspanne, gleichzeitiges Unterdrücken der VIT-Expression durch RNAi hob diesen Effekt auf. Zu postulieren ist deshalb eine Balance zwischen

oxidiertem Cholesterol und dafrachronischen Suren. Werden Vitellogenine vermindert exprimiert, sind die oxidierten Cholesterole intrazellulr, aufgrund fehlender Transporter, limitiert und die Lebensspanne ist unter *zmp-2*-RNAi nicht mehr verkürzt.

4.2.10 Bedeutung von ROS fr die Lebensspanne-Verkürzung nach *zmp-2*-RNAi

Oxidative Stressantwort in *C. elegans* nach *zmp-2*-RNAi

Entsprechend der Hypothese, dass unter *zmp-2*-RNAi vermehrt oxidative Produkte in die Zellen transportiert werden, wurden zunrchst die Spiegel mitochondrialer ROS in *C. elegans* bestimmt.

Ffr die Bestimmung der oxidativen Stressantwort werden auch hier zwei verschiedene Methoden gewhlt: Mitochondrien-selektive Farbstoff CM-H₂XRos und der Fluoreszenz-Farbstoff Amplex Ultra Red (siehe 4.1.9). Abbildung 4.54 zeigt exemplarische Fluoreszenzaufnahmen von MitoTracker Red inkubierten Nematoden, die mit unterschiedlichen RNAi-Bakterien behandelt wurden. Schon hieraus ist erkennbar, dass *zmp-2*-RNAi alleine bzw. mit *vit-6*-RNAi kombiniert zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenz fhrt.

Tatschlich bewirkte eine *zmp-2*-RNAi einen starken Anstieg der ROS-Bildung in den Mitochondrien im Vergleich zur basalen ROS-Produktion der Kontrolle, allerdings war dieser genauso hoch wenn zuschtzlich *vit-6* durch RNAi vermindert exprimiert wurde (Abbildung 4.54).

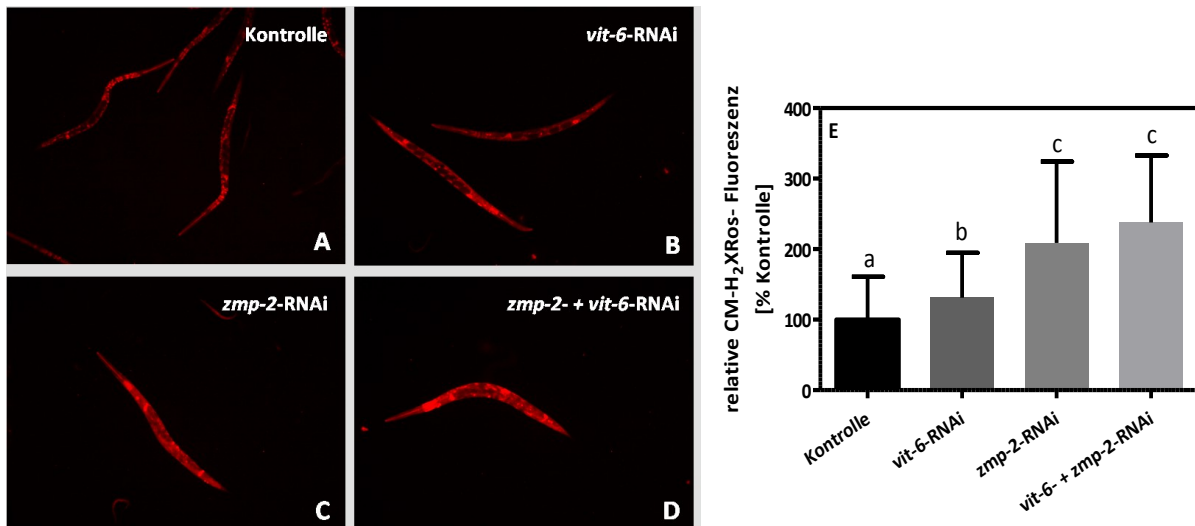


Abbildung 4.54 Mit Mito Tracker Red CM-H₂XROS markierte Nematoden zum Nachweis mitochondrialer ROS und deren densitometrische Auswertung.

Nematoden wurden ab dem L1-Larvenstadium mit Kontroll- (A), *vit-6*- (B) oder *zmp-2*-RNAi-Klonen (C) bzw. mit *zmp-2* + *vit-6*-RNAi-Klonen in Kombination (D) gefüttert und dem Fluoreszenzfarbstoff Mito Tracker Red CM-H₂XROS inkubiert. (E) Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der relativen Fluoreszenzsignale, auf die Kontrolle normiert (100 %), dargestellt als MW ± SD aus drei unabhängigen Versuchen. Beim statistischen Vergleich der unterschiedlichen Behandlungsgruppen miteinander geben unterschiedliche Buchstaben signifikante Unterschiede an.

Nach densitometrischer Auswertung zeigte sich, dass die basale ROS-Produktion in *zmp-2* defizienten Nematoden um das ca. 2-fache ($209,0 \pm 115,1$) und in *vit-6*-RNAi behandelten Nematoden um das 1,3-fache ($131,1 \pm 61,1$) im Vergleich zur Kontrolle ($100,0 \pm 60,8$) signifikant anstieg. Eine kombinierte RNAi aus *vit-6* und *zmp-2* ($237,9 \pm 94,8$) bedingte ebenfalls eine im Vergleich zur Kontrolle 2,4-fach signifikant erhöhte mitochondriale ROS-Produktion (Abbildung 4.54).

Weiterhin wurde der H₂O₂-Spiegel mittels Amplex Ultra Red im Extrazellulärraum detektiert. Beide RNAi, sowohl *zmp-2*-RNAi als auch die kombinierte RNAi aus *zmp-2* und *vit-6* führten zu einem signifikanten Anstieg der H₂O₂-Produktion, wiederum in der gleichen Größenordnung (Abbildung 4.55). Diese Befunde zeigen, dass der ROS-Stress in Nematoden mit der nukleären DAF-16-Translokation assoziiert ist.

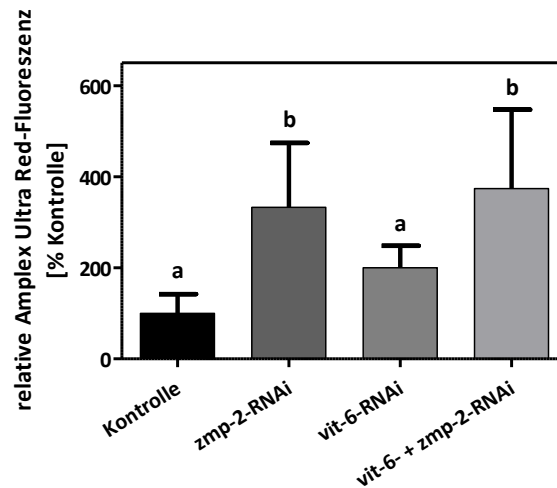


Abbildung 4.55 H₂O₂-Sekretion durch *zmp-2*-RNAi mit und ohne zeitgleicher *vit-6*-RNAi mittels Amplex UltraRed.

Nematoden wurden ab dem L1-Larvenstadium mit den entsprechenden RNAi-Klonen gefüttert und 3 h mit dem Farbstoff Amplex Red inkubiert, bevor die relative Fluoreszenz mittels Fluoroskan bestimmt wurde. Dargestellt sind MW ± SD von n = 12 aus zwei unabhängigen Messungen. Beim statistischen Vergleich der unterschiedlichen Behandlungsgruppen miteinander geben unterschiedliche Buchstaben signifikante Unterschiede an.

OxyBlot-Analyse zur Bestimmung von oxidativen Protein-Modifikationen nach *zmp-2*-RNAi

Sowohl *zmp-2*-RNAi als auch *vit-6*-RNAi induzieren ROS-Stress, ersterer vermutlich über die Erhöhung oxidiertes Lipide/Proteine, letzterer durch eine reduzierte Expression eines anti-oxidativ wirksamen Proteins. Um zu überprüfen, inwiefern sich eine RNAi beider Faktoren auf die oxidative Modifikation zellulärer Proteine auswirkt, wurde eine OxyBlot Methode angewandt. Hierbei werden nicht einzelne Proteine hinsichtlich oxidativer Änderungen untersucht, sondern die Gesamtheit aller oxidierten Proteine der unterschiedlichen Behandlungsgruppen quantifiziert.

Wie in Abbildung 4.56 dargestellt ist, führte eine *zmp-2*-RNAi zu signifikant vermehrt oxidativ geschädigten Proteinen im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,01$). Die oxidativen Schäden waren ca. 2-fach in *zmp-2* defizienten Tieren im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Interessanterweise führte eine *vit-6*-RNAi nur zu einer leicht erhöhten oxidativen Veränderung von Proteinen. Eine *vit-6*-RNAi verursacht nur eine 1,3-fach erhöhte oxidative Schädigung im Vergleich zur Kontrolle ($p > 0,05$). Dies liegt vermutlich dadurch begründet, dass weniger oxidierende Verbindungen in die Zellen transportiert werden. Eine gleichzeitige Ascorbinsäure Applikation [100 µM] von 4 Tagen in *zmp-2* defizienten Tieren schützte jedoch vor dieser oxidativen Modifikation (80 % der Kontrolle, $p > 0,05$). Um diese ROS-Hypothese zu

überprüfen wurde in einem nächsten Schritt die Lebensspanne nach *zmp-2*-RNAi mit zeitgleicher Applikation von Ascorbinsäure in unterschiedlichen Konzentrationen [1 mM, 100 μ M] untersucht.

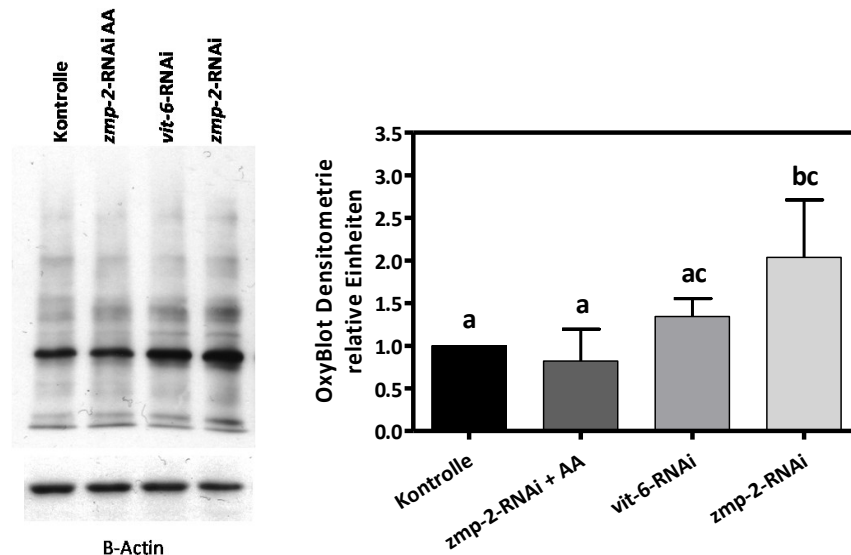


Abbildung 4.56 OxyBlot-Analyse zur Quantifizierung der oxidativen Modifikationen.

Links ist eine repräsentative OxyBlot-Analyse mit Referenzprotein β -Actin zum Nachweis der DNP-Expression dargestellt. Die Quantifizierung der DNP-Expression im Verhältnis zu β -Actin wurde mittels Densitometrie ermittelt (rechts). Beim statistischen Vergleich der unterschiedlichen Behandlungsgruppen miteinander geben unterschiedliche Buchstaben signifikante Unterschiede an ($n = 3$). DNP = 2,4-Dinitrophenol, AA = Ascorbinsäure [100 μ M].

Ascorbinsäure kompensiert die Lebensverkürzung in *zmp-2* defizienten Nematoden

Wurden Wildtyp-Tiere gegenüber 1 mM bzw. 100 μ M Ascorbinsäure ab dem L1-Larvenstadium exponiert, waren keine signifikanten Unterschiede in der Lebensspanne zu erkennen. So wick die mittlere Lebensspanne um 2 % [1 mM] bzw. 8 % [100 μ M] im Vergleich zu den Kontrolltieren ab ($p > 0,05$; Tabelle C 7.7). In Abbildung 4.57 ist zu erkennen, dass eine *zmp-2*-RNAi zu der beschriebenen Linksverschiebung der Überlebenskurven führt, während die Applikation von Ascorbinsäure [100 μ M] diese Lebensverkürzung vollständig aufhebt.

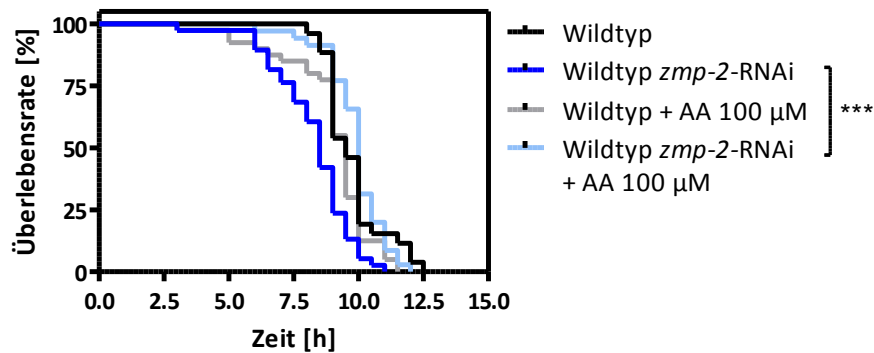


Abbildung 4.57 Effekt der *zmp-2*-RNAi und zeitgleicher Ascorbinsäure (AA) Exposition auf die Lebensspanne in *C. elegans* unter Hitzestress.

Aufgrund dieser Befunde und der Tatsache, dass die Applikation von Ascorbinsäure in *zmp-2*-RNAi behandelten Nematoden die vermehrte Proteinoxidation verhinderte (Abbildung 4.56), kann die zuvor beschriebene These der verkürzten Lebensspanne *zmp-2* defizienter Nematoden durch vermehrten oxidativen Stress bestätigt werden.

4.2.11 Einfluss unterschiedlicher Cholesterolverversorgung für die Lebensspanneverkürzung durch *zmp-2*-RNAi

Einfluss niedriger Cholesterolkonzentrationen auf die Lebensspanne unter Hitzestress in *C. elegans* bei *zmp-2*-RNAi

Da bei Cholesterolmangel eine Verkürzung der Lebensspanne eintritt, wurde im Folgenden die geringste Cholesterolkonzentration gewählt, die die Lebensspanne unter Hitzestress-Bedingungen nicht mehr beeinflusst. Wie vorangegangen bereits gezeigt wurde (4.19), ist eine Applikation von 2,5 µg Cholesterol pro ml NGM-Nährmedium nicht mehr Lebensspanne verkürzend.

Unter Cholesterol-Defizienz [2,5 µg/ml] trat der *vit*-RNAi-induzierte Ausgleich der verkürzten Lebensspanne *zmp-2*-RNAi-behandelter Nematoden nicht mehr ein (Tabelle C 7.8). Wie in Abbildung 4.58 weiterhin zu entnehmen ist, unterscheiden sich die Überlebenskurven nach *zmp-2*-RNAi nicht von den Überlebenskurven *zmp-2* + *vit-6*-RNAi behandelter Nematoden ($p > 0,05$). Beide RNAi-Induktionen führten, im Vergleich zu den Kontrolltieren, zu einer signifikanten Linksverschiebung der Überlebenskurven ($p < 0,001$).

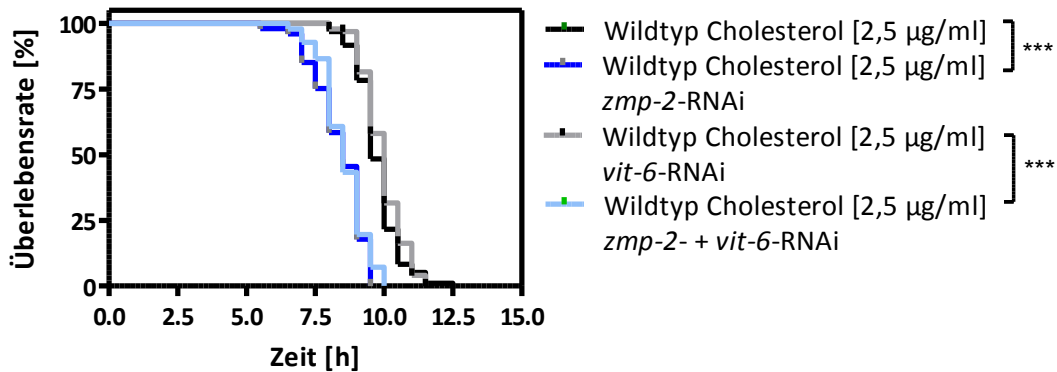


Abbildung 4.58 Effekt der *vit-6*-RNAi und zeitgleicher *zmp-2*-RNAi auf die Lebensspanne von *C. elegans* N2 unter Hitzestress bei geringer Cholesterolgabe [2,5 µg/ml].

Entsprechend der in 4.2.7 erstellten Hypothese, werden unter *vit-6*-RNAi genügend dafachronische Säuren für die Aktivierung von DAF-12 gebildet bei zeitgleich vermindertem Transport oxidierter Lipide/Proteine unter *zmp-2*-RNAi. Die zur Bildung der dafachronischen Säuren notwendigen Anlieferung von Cholesterol scheint unter *vit-6*-RNAi bei einer Applikation von 2,5 µg/ml Cholesterol nicht mehr möglich.

4.2.11.1 Erhöhte Cholesterol-Konzentrationen beeinträchtigen den Lebensspannen-Ausgleich durch *vit-6*-RNAi in *zmp-2* defizienten Nematoden

Die Quantifizierung der *vit*-Expression nach Inkubation unterschiedlicher Cholesterol-Konzentrationen mittels Western Blot zeigte, dass eine erhöhte Applikation von Cholesterol zu einer geringeren VIT-Expression führt.

Nachfolgend werden diese Cholesterol-Effekte nach *zmp-2*-RNAi bei zeitgleichem *Knock-down* der Cholesteroltransporter Vitellogenine hin untersucht. *Vit-6* defiziente Nematoden wiesen nach einer Inkubation von 250 µg/ml bzw. 500 µg/ml Cholesterol eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant verkürzte Lebensspanne auf ($p < 0,001$). *Zmp-2* defiziente Nematoden lebten bei erhöhten Cholesterol-Konzentrationen signifikant um 12 % bzw. 21 % kürzer als die Kontrolle (Tabelle C 7.9). Ein weiterer Effekt der Inkubation mit erhöhten Cholesterol-Konzentrationen zeigte sich bei zeitgleicher RNAi von *zmp-2* und *vit-6*. Die vorangegangenen gezeigte Kompensation der *zmp-2*-RNAi induzierten Lebensverkürzung durch *vit*-RNAi war bei hohen Cholesterolgaben nicht mehr ersichtlich. Im Gegenteil, die *vit* und

zmp-2 defizienten Nematoden lebten nach Exposition mit erhöhten Cholesterolkonzentrationen zusätzlich kürzer als *zmp-2* defiziente Nematoden (Abbildung 4.59).

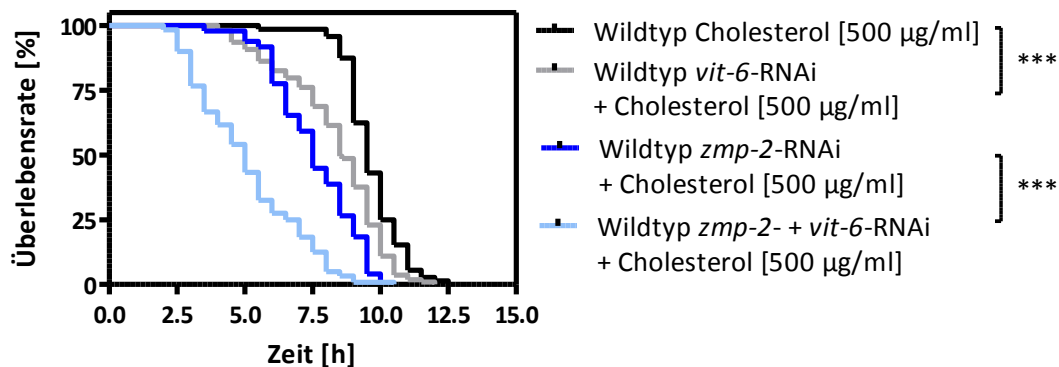


Abbildung 4.59 Effekt einer erhöhten Cholesterol Exposition [500 µg/ml] bei zeitgleicher *vit-6*- und *zmp-2*-RNAi auf die Lebensspanne in *C. elegans* N2 unter Hitzestress.

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde eine stark erhöhte Cholesterol-Exposition gewählt. Aufgrund möglicher Diffusionsmechanismen und hiermit assoziierten möglichen toxischen Effekten erhöhter Lipid-Konzentrationen, wurde auch hier eine geringere Cholesterol-Konzentration von 50 µg/ml gewählt. Wie in Abbildung 4.60 exemplarisch dargestellt, induzierte eine *zmp-2*-RNAi auch bei 50 µg/ml Cholesterol eine Verkürzung der Lebensspanne ($p < 0,001$). Jedoch konnte diese Verkürzung durch eine *vit-6*-RNAi nicht mehr aufgehoben werden. Im Mittel lebten die Kontrolltiere 15,6 % länger als *zmp-2* defiziente Nematoden ($p < 0,001$) und 21,1 % länger als *zmp-2* + *vit-6* defiziente Tiere ($p < 0,001$) bei einer 50 µg/ml Cholesterolgabe (Tabelle C 7.10). Eine Erklärung hierfür ist, dass unter Bedingungen des erhöhten Cholesterolangebots durch *zmp-2*-RNAi viele oxidativ modifizierte Lipide/Proteine entstehen, die trotz verminderter VIT-Expression noch ausreichend in die Zelle gelangen, um die Lebensspanne zu reduzieren. Dafür sprechen auch die Ergebnisse nach Inkubation mit 500 µg/ml Cholesterol (Abbildung 4.59), die zeigten, dass nach *vit-6*- + *zmp-2*-RNAi sogar eine Lebensspannenverkürzung eintrat, die signifikant größer ist als die durch *zmp-2*-RNAi alleine verursachte.

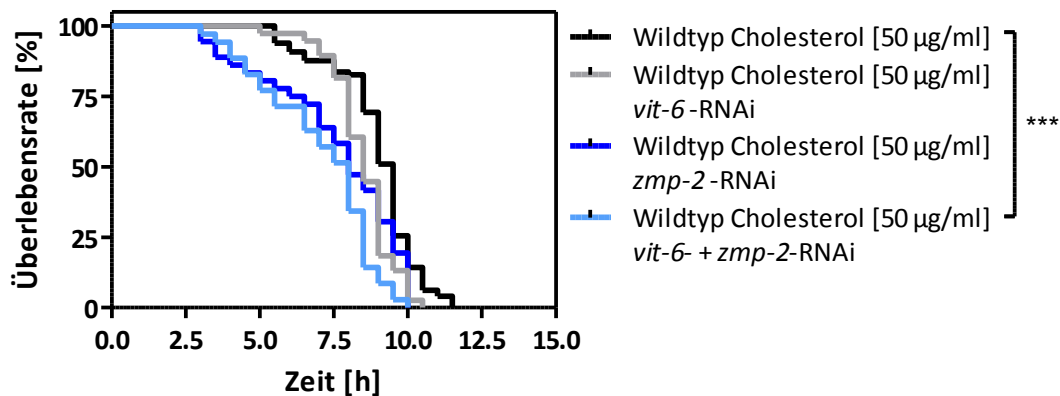


Abbildung 4.60 Effekt der Cholesterol Exposition [50 µg/ml] und zeitgleicher *vit-6*- und *zmp-2*-RNAi auf die Überlebenskurven in *C. elegans* N2 unter Hitzestress.

4.2.12 Die *zmp-2*-RNAi induzierte Lebenszeitverkürzung ist vom Vitellogenin-Rezeptor RME-2 abhängig

Ein *Knock-down* von *rme-2* führte, wie vorangegangen gezeigt, sowohl zu einer geringeren VIT-Expression als auch zu einem geringeren Cholesteroltransport. Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern diese Veränderungen mit der Verkürzung der Lebensspanne durch *zmp-2*-RNAi assoziiert sind. Wie Abbildung 4.61 zeigt, kam es nur durch *zmp-2*-RNAi in der *rme-2*-Mutante nicht zu einer Lebenszeitverkürzung ($p > 0,05$, Tabelle C 7.11). Das Ausbleiben der Lebensspannen-Verkürzung lässt sich durch die geringere VIT-Expression in *rme-2*-Mutanten erklären, da eine *vit*-RNAi ebenfalls die *zmp-2*-RNAi induzierte Lebenszeitverkürzung aufhebt. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass die *zmp-2*-RNAi induzierten Effekte vom Transport der Vitellogenine abhängen. Dementsprechend war der *Knock-down* von *vit-6* ohne Einfluss auf die Lebensspanne in *rme-2*-Mutanten unter *zmp-2*-RNAi (Abbildung 4.61, Tabelle C 7.11).

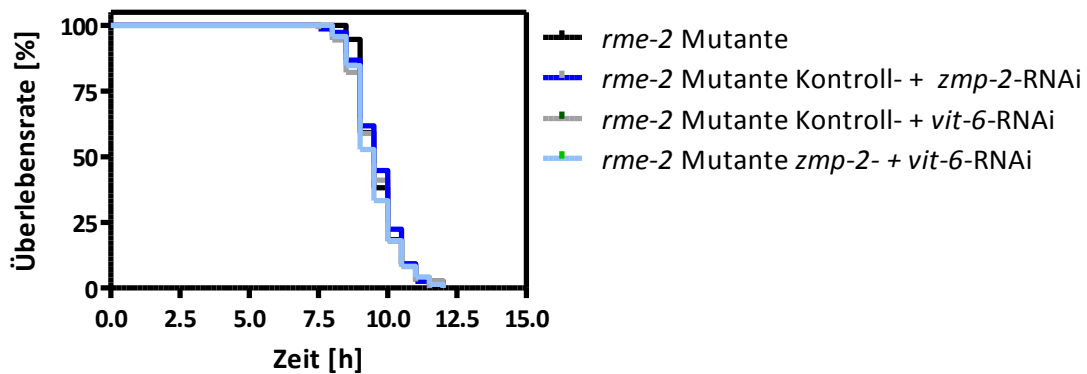


Abbildung 4.61 Effekt der *zmp-2*-RNAi und zeitgleicher *vit-6*-RNAi auf die Überlebenskurve in *rme-2*-Mutanten unter Hitzestress.

4.2.13 Einfluss von 17 β -Östradiol auf die *vit*-RNAi-vermittelte Kompensation der *zmp-2*-RNAi induzierten Lebenszeitverkürzung

Wie zuvor nachgewiesen (4.1.12), erhöht eine 17 β -Östradiol-Applikation die *vit*-Expression, sie hat jedoch keinen Einfluss auf die Lebensspanne.

Der Einfluss von 17 β -Östradiol auf den lebensverkürzenden Effekt *zmp-2* defizienter Nematoden wurde in einem ersten Ansatz mit einer reinen *zmp-2*-RNAi durchgeführt. In einem zweiten Ansatz wurde eine mit der Kontrolle verdünnte *zmp-2*-RNAi eingesetzt, um einen möglichen Vergleich zu einer später geplanten Doppel-RNAi von *zmp-2*- und *vit-2*-RNAi zu haben. Die Tiere wurden zusätzlich mit 10 μ M 17 β -Östradiol 4 Tage ab dem L1-Larvenstadium inkubiert, bevor die Lebensspanne bestimmt wurde. In Abbildung 4.62 A sind die Überlebenskurven der mit 17 β -Östradiol inkubierten Nematoden im Vergleich zur Kontrolle und *zmp-2*-RNAi behandelten Würmern dargestellt. Wie hieraus ersichtlich wird, hob eine Exposition mit 17 β -Östradiol den lebensverkürzenden Effekt der *zmp-2*-RNAi partiell auf ($p < 0,001$). Im Vergleich zur Kontrolle wiesen sie jedoch weiterhin eine signifikante Lebensverkürzung auf ($p < 0,01$). Die mittlere Lebensspanne war, im Vergleich zur Kontrolle, nach *zmp-2*-RNAi signifikant um 39 % verkürzt, nach zusätzlicher 17 β -Östradiol Inkubation nur noch um 16 %. Sie lebten im Mittel 38 % länger als nach *zmp-2*-RNAi (Tabelle C 7.12). Diese Befunde lassen auf mögliche antioxidative Effekte, unabhängig von den Vitellogeninen, des 17 β -Östradiols schließen.

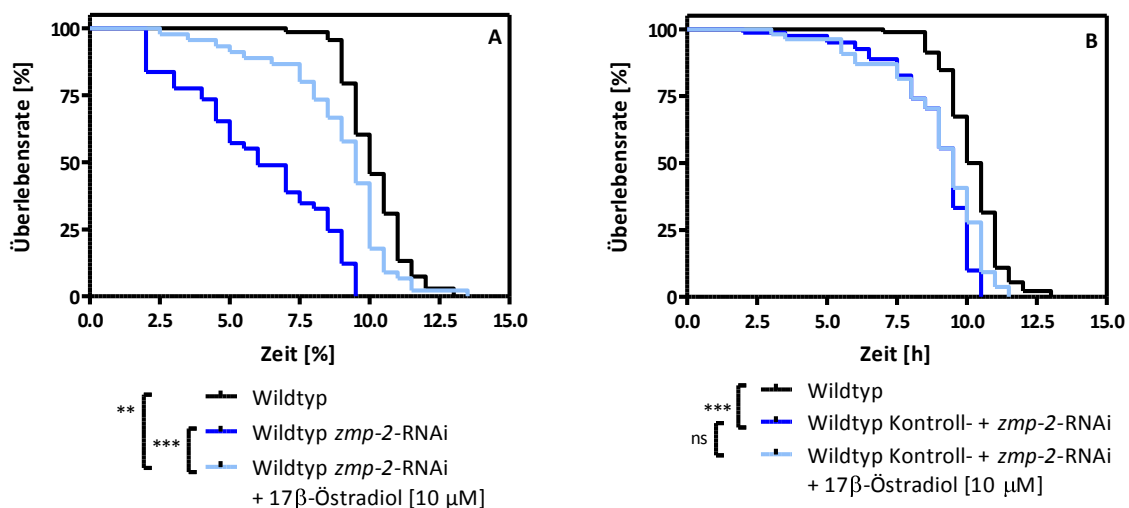


Abbildung 4.62 Effekte einer 4 Tage Inkubation mit 17β -Östradiol [$10\ \mu\text{M}$] auf den lebensverkürzenden Effekt von *zmp-2*-RNAi (A) und mit Kontroll-RNAi verdünnter *zmp-2*-RNAi (B) in *C. elegans* unter Hitze stress.

Die Überlebenskurven von Nematoden mit verdünnter *zmp-2*-RNAi und 17β -Östradiol Exposition implizieren keine Kompensation der Lebensverkürzung. Es gab, wie in Abbildung 4.62 B dargestellt, keinen signifikanten Unterschied zwischen den Überlebensraten von Würmern, die mit verdünnter *zmp-2*-RNAi behandelt wurden und solchen, die zusätzlich mit 17β -Östradiol ($p > 0,05$) inkubiert wurden (Tabelle C 7.12). Diese Ergebnisse zeigen, dass unter diesen Bedingungen einer *zmp-2*-RNAi die erhöhte Expression von Vitellogeninen nicht zu einer Beeinflussung der Lebensspanne führen. Da unter erhöhter Cholesterolfuhr die Lebensspanne verkürzt ist, spricht dies dafür, dass der durch Vitellogeninen vermittelte Transport oxidierter Lipide/Proteine bereits ohne erhöhte Expression sein Maximum erreicht hat.

4.2.14 Einfluss des Phytoöstrogens Genistein auf die Lebensspanne in *zmp-2*-RNAi behandelten *C. elegans*

Wie im Kapitel 4.1.14 gezeigt wurde, bedingt die Applikation des Phytoöstrogens Genistein eine Verminderung der Vitellogenin-Expression auf transkriptionaler und translationaler Ebene. Diese war jedoch höher als die *vit*-Expression unter *vit*-RNAi. Ebenfalls konnte gezeigt

werden, dass eine 4-tägige Genistein-Exposition [100 μM] keinen Einfluss auf die Lebensspanne unter Hitzestress hat.

Genistein führt zur partiellen Kompensation des Lebensverkürzenden Effekts von *zmp-2*-RNAi in *C. elegans*

In Abbildung 4.63 sind die Überlebenskurven von Wildtyp-Tieren dargestellt. Nach *zmp-2*-RNAi bewirkte Genistein eine signifikante Verlängerung der Lebensspanne, allerdings erreichen die so behandelten Nematoden nicht die Lebensspanne der Kontrolle. Der statistische Vergleich der Überlebenskurven *zmp-2* defizienter Nematoden mit und ohne Genistein-Inkubation zeigte einen signifikant lebensverlängernden Effekt um durchschnittlich 10 % nach Genistein Behandlung ($p < 0,01$; Tabelle C 7.13).

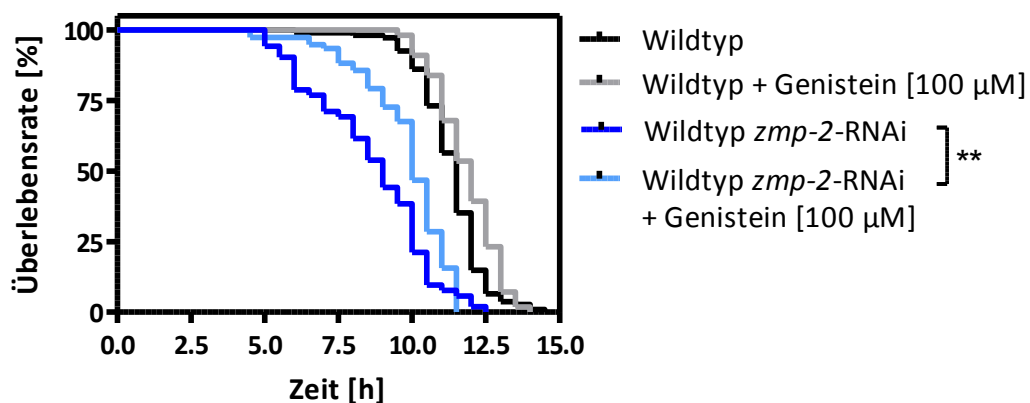


Abbildung 4.63 Effekte einer 4-tägiger Inkubation mit Genistein [100 μM] mit und ohne *zmp-2*-RNAi auf die Lebensspanne im *C. elegans* Wildtyp unter Hitzestress.

5 DISKUSSION

Die kausalen Zusammenhänge zwischen physiologischen Vorgängen und der Langlebigkeit des Menschen sind Gegenstand zahlreicher Forschungsvorhaben. Hierbei wird dem Transport und der Speicherung von Lipiden eine zentrale Rolle zugeschrieben. Aktuelle Studien weisen die Assoziation bestimmter Lipoproteinprofile mit dem Erreichen eines hohen Lebensalters nach. Einer der Schlüsselfaktoren für die Langlebigkeit scheint die Partikelgröße und -menge der *Low Density Lipoproteins* (LDL) zu sein. In langlebigen Menschen und deren Geschwistern wurden signifikant größere LDL-Partikel nachgewiesen als in der entsprechenden Kontrollkohorte (Vaarhorst *et al.* 2010, Heijmans *et al.* 2006). Je kleiner und dichter, desto atherogener sind die LDL-Partikel. Sie werden leichter oxidiert, dringen leichter in Gefäßwände ein und weisen eine verminderte Bindung an den LDL-Rezeptor auf. Dominieren die kleinen dichten LDL-Partikel, ist beispielsweise das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöht. Auch wird mit diesen eine Insulinresistenz, das metabolische Syndrom und Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert (Berneis 2004). Neben charakteristischen Strukturdomänen lassen genetische Homologien auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung der humanen Lipoproteine und der Vitellogenine eierlegender Vertebraten und Invertebraten schließen. Die Genomsequenzen des humanen Apolipoprotein B-100 (ApoB-100) und der Vitellogenine von Nematoden weisen hoch konservierte Bereiche auf (Baker 1988). ApoB-100 fungiert als Ligand der zellulären Aufnahme von Lipoproteinen über LDL-Rezeptoren. Vitellogenine besitzen eine entsprechende Funktion als Cholesteroltransporter der Nematoden. Die Identifizierung von RME-2 als Vitellogeninrezeptor bestätigt außerdem die Hypothese einer analog regulierten endozytotischen Aufnahme von LDL-Partikeln und Vitellogeninen, da es sich bei RME-2 um ein Mitglied der LDL-Rezeptor-Superfamilie handelt (Schneider und Nimpf 2002, Grant und Hirsh 1999). Auch in anderen Organismen beeinflussen Vitellogenine die Lebensspanne. In Honigbienen sind beispielsweise erhöhte Vitellogenin-Gehalte mit einer erhöhten Lebensspanne assoziiert (Brandt *et al.* 2005). Neben der Bedeutung im Fettstoffwechsel und in der Lebensspanne gibt es Hinweise auf weitere Funktionen der Vitellogenine. Das Immunsystem von Organismen scheint hier ein generelles Ziel zu sein. In Honigbienen wurde gezeigt, dass die Unterdrückung der Vitellogenin-Synthese zu einer Hemmung des Immunsystems in Verbindung mit einer verminderten Lebensspanne führt (Amdam *et al.* 2003). Auch in Stachelhäutern wurden Vitellogenine als Bestandteil humoraler

Abwehrmechanismen gegenüber mikrobiellen Eindringlingen identifiziert (Glinski und Jarosz 2000).

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* bietet ideale Voraussetzungen als Modellorganismus zur Untersuchung des Lipidtransports und dessen Auswirkungen auf Stressresistenz und Lebensspanne. Die transparente Anatomie der Nematoden erlaubt den Einsatz fluoreszenzoptischer Detektionsverfahren, z. B. zur unmittelbaren Erfassung der Cholesterolaufnahme in die Zellen (Matyash *et al.* 2001), ihre relativ kurze Lebensdauer ermöglicht die zeitnahe Erfassung der Lebensspanne und das vollständig sequenzierte Genom erlaubt die Anwendung vielfältiger genetischer Analysemethoden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Vitellogenine als Zielgene des Cholesteroltransports ausgewählt. Die physiologische Bedeutung der Vitellogenine wurde hinsichtlich der Resistenz zweier unterschiedlicher Stressoren in *C. elegans* untersucht. Hierbei wurde insbesondere die Interaktion der Vitellogeninen mit den Lebensspannen-regulierenden Signalwegen, dem ILS und dem erst kürzlich beschriebenen Steroid-Signalweg, untersucht.

5.1 Einfluss der Vitellogenine auf die Immunantwort gegenüber *P. luminescens*

P. luminescens vermindert die Lebensspanne

Der Invertebrate *C. elegans* ist ein freilebender Nematode, der in seiner Umwelt Mikroorganismen ausgesetzt ist. Die im Erdboden vorkommenden Bakterien dienen einerseits als Nahrung, andererseits können sie jedoch Pathogene darstellen, weshalb ein effektives Abwehrsystem essentiell für das Überleben der Nematoden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde *C. elegans* mit dem pathogenen Bakterium *Photorhabdus luminescens* (*P. luminescens*) inkubiert, um die Bedeutung der Vitellogenine für die immunologische Antwort zu untersuchen.

P. luminescens ist ein Gram-negatives Bakterium der Familie der *Enterobacteriaceae* (Fischer-Le Saux *et al.* 1999), das in *C. elegans* die Entwicklung, Reproduktivität und Lebensspanne beeinträchtigt. Ist *C. elegans* während der Entwicklung *P. luminescens* ausgesetzt, sterben die Larven meist vor Erreichen des L4-Larvenstadiums (Sicard *et al.* 2007). Aufgrund des starken Einflusses der Pathogene auf die Entwicklung und der Tatsache, dass Vitellogenine erst ab dem L4-Larvenstadium exprimiert werden (MacMorris und Blumenthal 1993), wurde

P. luminescens jung-adulten Nematoden für 24 h appliziert und anschließend die Lebensspanne unter Hitzestress-Bedingungen gemessen. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Lebensspanne *P. luminescens* exponierter Tiere im Vergleich zur Kontrolle. Im Mittel lebten mit *P. luminescens* inkubierte Tiere ca. 50 % kürzer als die nicht behandelte Kontrolle. Durch den *P. luminescens* bedingten frühzeitigen Tod der Nematoden konnte von einer Infektion ausgegangen werden, die zur Induktion des Immunsystems in *C. elegans* führt. Sicard *et al.* (2007) konnten nachweisen, dass die Abwesenheit von *E. coli* die Pathogenität von *P. luminescens* erhöht. Da die Nematoden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu den HT115- bzw. OP50-*E. coli* mit *P. luminescens* inkubiert wurden, bestand kein Nahrungsdefizit und eine daraus resultierende Lebenszeit beeinflussende Malnutrition der Nematoden, weshalb eine vollständig ausgebildete Abwehrantwort unterstellt werden darf. Dieser pathogene Einfluss auf die Lebensspanne war jedoch bei Hitze-inaktivierten Bakterien nicht mehr zu detektieren, folglich kann von Hitze-instabilen Toxinen ausgegangen werden, welche die Lebensspanne verkürzen.

Die Immunosenezenz definiert eine generelle Abnahme der Immun-Effektivität in alternden Organismen (Kurz und Tan 2004). Diese physiologischen Änderungen sind auch in *C. elegans* zu finden (Schmucker *et al.* 2001, Schmucker 2002). In *C. elegans* ist das Intestinum nicht nur das primäre Gewebe für die Flüssigkeitsaufnahme, sondern, wie im Menschen, das größte immunologische Kontaktorgan. Weiterhin nimmt die Pumpaktivität des Grinders (Chitin-überdecktes Organ) im Alter ab. Im frühen Larvenstadium gelangen nur selten intakte Bakterien in das Darmlumen. Erst in adulten Tieren werden intakte Bakterien im Lumen detektiert (Gems und Riddle 2000, Garigan *et al.* 2002). Das Intestinum ist ebenfalls das primäre Gewebe für die *P. luminescens*-Akkumulation, wie in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, in welchem vermutlich Hitze-instabile Gewebe-degradierende Substanzen durch die Pathogene freigesetzt werden.

Die Rolle der Vitellogenine in der Immunabwehr

Zhang *et al.* (2005) wiesen erstmals antimikrobielle Aktivitäten der Vitellogenine im Lanzettenfisch nach. Darauf folgend wurden für die Prachtbarbe und den Karpfen ähnliche anti-mikrobielle Aktivitäten der Vitellogenine beschrieben (Shi *et al.* 2006, Liu *et al.* 2009). Generell sind die Vitellogenine wesentliche Faktoren für die antibakterielle Aktivität im

Serum verschiedener Organsimen. Die Vitellogenin-Expression ist z. B. mittels Injektion von LPS (Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien) und LTA (Lipoteichonsäure) in männlichen Zebrafischen sowohl auf translationaler als auch transkriptionaler Ebene induzierbar (Tong *et al.* 2010). Analog hierzu führte eine Injektion von *E. coli* in der männlichen Prachtbarbe zu einer Erhöhung der Serum-Vitellogenine (Shi *et al.* 2006). Letztere können *in vivo* Gram-negative Bakterien wie *E. coli* und Gram-positive wie *S. aureus* binden, deren Wachstum Dosis-abhängig inhibieren und durch Zerstören der Bakterienzellwände, sowie durch eine induzierte Erhöhung der Makrophagen-Phagozytose, die Pathogene töten (Li *et al.* 2008, Liu *et al.* 2009, Tong *et al.* 2010). Damit übereinstimmend wurde für Serum-Vitellogenine der Lachse die Fähigkeit der Neutralisierung einer Infektion mit infektiösen Pankreasnekrose-Viren (IPNV) gezeigt (Garcia *et al.* 2010). ApoB-100 ist das humane Homolog zu den Vitellogeninen (Baker 1988) und wird in der Leber synthetisiert. ApoB-100 ist ein wesentlicher Protein-Bestandteil von LDL als auch VLDL. Beiden wird eine Funktion in der angeborenen Immunabwehr zugesprochen, die sich in Form von Binden und Neutralisieren der LPS äußert (Van Lenten *et al.* 1986). Bartolomé *et al.* (2008) unterstreichen dies, indem sie zeigen konnten, dass in Nagern eine Injektion von LPS zum einen zu einer vermehrten VLDL-Sekretion zum anderen die hepatischen ApoB (-100 und -48) translational erhöht werden. Zhang *et al.* (2011) charakterisieren Vitellogenine als Sensor-Moleküle mit Mustererkennungsrezeptoren (PRR), die als Proteine der parakrinen Akute-Phase-Antwort Bakterien und Viren identifizieren und zerstören. Zusammengefasst implizieren diese Studien eine immun-relevante Funktion der Vitellogenine sowohl gegenüber Viren als auch Bakterien.

Für *C. elegans* ist noch kein immunologischer Einfluss der Vitellogenine beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels qRT-PCR gezeigt werden, dass eine 24-stündige *P. luminescens*-Applikation zu einer signifikant vermehrten *vit*-Expression führt. Dies lässt auf eine mögliche immunrelevante Funktion der Vitellogenine schließen. Immunologische Funktionen der Vitellogenine zeigten sich jedoch nicht nur anhand deren vermehrter Expression, auch konnte ein Einfluss auf die Lebensspanne in Gegenwart von *P. luminescens* unter Hitzestress detektiert werden. Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass eine *vit*-RNAi *per se* keinen Einfluss auf die Lebensspanne hatte. Wurden jedoch *vit* defiziente Tiere mit *P. luminescens* inkubiert, konnte beim Vergleich zur infizierten Kontrolle eine additive Verkürzung der Lebensspanne um durchschnittlich 10 % detektiert werden.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der Vitellogenine (Spieth und Blumenthal 1985) wurde bei der Betrachtung einzelner *vit*-Gene die Möglichkeit des gleichzeitigen Ausschaltens eng verwandter *vit*-Gene unterstellt. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass durch ein *Knock-down* von *vit-2* auch *vit-6* vermindert exprimiert wurde. Hierauf basierend kann eine Genredundanz unterstellt werden, welche besagt, dass die *vit*-Gene in *C. elegans* dieselbe Funktion erfüllen bzw. die *vit*-Gene sich eine Funktion teilen. Diese Befunde sprechen für die polymere Wirkung der Vitellogenine, weshalb folgend davon ausgegangen wird, dass bei einem *Knock-down* eines einzelnen Vitellogenins auch die anderen Vitellogenine in ihrer Funktion beeinträchtigt sind.

Die Pathogen-Sensitivität gegenüber *P. luminescens* ist DAF-16-abhängig

P. luminescens akkumuliert intestinal in *C. elegans*, in dessen Intestinum drei Hauptsignalkaskaden beschrieben sind, die Abwehrmechanismen beeinflussen: der Insulin-Signalweg, der p38 MAP-Kinase-Signalweg und der TGF β -Signalweg (Hultmark 1996, Prager und Jolles 1996). Da die inflammatorische Antwort auf eine bakterielle Infektion ein physiologischer Prozess ist, an welchem möglicherweise auch andere Gewebe involviert sind, wurden alle sieben Signalwege, die in *C. elegans* als hauptverantwortlich für die Immunantwort beschrieben sind, überprüft: zusätzlich zu den drei oben genannten, der des programmierten Zelltodes (*programmed cell death*, PCD), sowie Signalwege, die durch die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), die *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) und den *Toll-like receptor* (TLR) reguliert werden (Schulenburg *et al.* 2008). Diese einleitend genauer beschriebenen Immunsignalwege wurden mittels *Knock-down* der spezifischen immunrelevanten Proteine im Hinblick auf ihre Bedeutung im Rahmen der Immunantwort gegen *P. luminescens* näher untersucht. Hierbei konnte ausschließlich für DAF-16 ein immunologischer Einfluss bei einer *P. luminescens*-Infektion festgestellt werden. Sowohl der *daf-16-Knock-down* als auch *daf-16-Knock-out* bewirkten eine signifikante Lebenszeitverkürzung in Gegenwart von *P. luminescens*.

DAF-16 gehört zu den Forkhead-Transkriptionsfaktoren (Lee *et al.* 2002 und 2003, Munoz 2003), die homolog zu den humanen FOXO (Forkhead box class O)-Transkriptionsfaktoren sind. Wie FOXO wird auch DAF-16 über den Insulin-Weg kontrolliert (Giannakou und Partridge 2004), weshalb deren Aktivität von externen Stimuli wie Nahrung, oxidativem

Stress und Hitzestress streng reguliert wird (Kim *et al.* 2004, Aballay *et al.* 2003, Huffman *et al.* 2004, Matsuzawa *et al.* 2005). Hierbei besitzt die posttranskriptionale Modifikation, wie z. B. die Dehosphorylierung, von DAF-16, die zu einer nukleären DAF-16-Translokalisierung führt, einen wesentlichen Einfluss (Aballay *et al.* 2003, Huffman *et al.* 2004, Mochida *et al.* 2000, Kim *et al.* 2005). In *C. elegans* ist DAF-16 in der transkriptionalen Regulation von Genen involviert, die wesentlich für die Langlebigkeit und Stressantwort, aber auch für die angeborene Immunantwort sind (Shim *et al.* 2003, GuhaThakurta *et al.* 2002). Eine DAF-16-kontrollierte Immunantwort in *C. elegans* konnte als wesentlich für die Abwehr gegenüber Bakterien wie *P. aeruginosa* PA14 (Tan *et al.* 1999, Evans *et al.* 2008), *S. aureus*, *A. tumefaciens* und *S. marcescens* (Mallo *et al.* 2002, Couillault und Ewbank 2002, Sifri *et al.* 2003) nachgewiesen werden. Auch FOXO3a der Säugetiere kontrolliert inflammatorische Prozesse als Antwort auf eine Infektion (Kurz und Ewbank 2003, Kim *et al.* 2002). Die Aktivierung von FOXO resultiert beispielsweise in einer Transkription antimikrobieller Peptide (AMP), welche potentielle Krankheitserreger schon vor dem Eindringen in den Körper unschädlich machen können. Neben der Vermittlung der Stressresistenz können FOXO-Proteine auch in Säugern die Lebensspanne regulieren. Zwei unabhängige Studien an japanischen und deutschen Hundertjährigen belegen, dass die Langlebigkeit mit drei SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) des FOXO3a-Gens signifikant assoziiert sind (Flachsbar *et al.* 2009, Wilcox *et al.* 2008). Diese in der Literatur beschriebenen Befunde gehen mit dem in dieser Arbeit detektierten Einfluss von DAF-16 in der Lebensspanne und Stressresistenz konform.

So ist DAF-16 ein beschriebener und das Vitellogenin ein neu entdeckter Faktor in *C. elegans*, der eine wesentliche Rolle für die Lebensspanne und die Immunantwort gegenüber *P. luminescens* spielt. Nachfolgend wurde die Interaktion der beiden Faktoren miteinander überprüft, hierbei stand die Verbindung zwischen DAF-16 und DAF-12 im Fokus.

Der Steroid-Signalweg und der Interaktionspartner DAF-16 vermitteln die Immunantwort gegenüber *P. luminescens*

DAF-16 ist ein wesentlicher Mediator des eingangs beschriebenen endokrinen Insulin/Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Signalweg (ILS). Eine moderate Inhibierung dieses

Signalweges führt zu einer höheren Stressresistenz und Verlängerung der Lebensspanne (Kimura *et al.* 1997, Lin *et al.* 2001, Abbildung 5.1). Der Transkriptionsfaktor DAF-16 führt zur Expression einer ganzen Reihe von Genen, die an Mechanismen der Stressresistenz beteiligt sind. Hierzu gehören zum Beispiel eine Superoxid Dismutase (*sod-3*) (Honda und Honda 1999), eine transmembranäre Tyrosin-Kinase (*old-1*) (Murakami und Johnson 2001) sowie ein Metallothionein (*mtl-1*) (Barysyt *et al.* 2001). Damit diese Gene exprimiert werden können, transloziert DAF-16 bei Stress in den Nukleus (Lin *et al.* 2001). Dies ist allerdings nur im unphosphorylierten Zustand möglich. Durch Phosphorylierung von DAF-16 inhibiert der ILS also dessen Aktivität, und führt so zu einer geringeren Stressresistenz (Lin *et al.* 2001, Mukhopadhyay *et al.* 2006). Experimentelle Studien belegen, dass eine Entfernung der Keimbahn-Stammzellen in *C. elegans* zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt (Hsin und Kenyon 1999). Dieser Effekt ist abhängig von DAF-16 und geht mit dessen Translokation in die Nuklei intestinaler Zellen einher (Lin *et al.* 2001, Abbildung 5.1). Wie sich zeigte, beruht die so induzierte Lebensverlängerung auf einem Signalweg, der parallel zum ILS verlaufen muss (Yamawaki *et al.* 2010). Zentraler Mediator ist hier der nukleäre Hormonrezeptor DAF-12. Antebi *et al.* (2000) wiesen nach, dass DAF-12 als Schnittstelle zwischen den beiden Signalwegen fungiert, die Dauerstadium, Stressresistenz und Langlebigkeit in *C. elegans* regulieren. Für den zum ILS parallelen Signalweg dienen als endogene Liganden für DAF-12 zwei Gallensäure-ähnliche 3-Keto-Steroide, die auch als Δ^4 - und Δ^7 -dafachronischer Säuren (DAs) bezeichnet werden (Motola *et al.* 2006). Da es sich hierbei um hormonell wirksame Steroidale Verbindungen handelt, wurde diese Kaskade als Steroid-Signalweg bezeichnet. Die Synthese der DAs erfolgt auf Basis von Cholesterol. Dieses wird extrazellulär von Vitellogeninen gebunden und über den Vitellogenin-Rezeptor RME-2 in die Zellen transportiert (Baker 1988, Matyash *et al.* 2001). Liganden besetztes DAF-12 fördert die reproduktive Entwicklung und Stressresistenz, wohingegen unbeladenes DAF-12 DAF-16-abhängig die Dauer-Differenzierung induziert (Motola *et al.* 2006).

Da sowohl DAF-16 als auch Vitellogenine in der Immunabwehr gegenüber *P. luminescens* involviert sind, könnten Vitellogenine in der Funktion als Cholesteroltransporter über den beschriebenen Steroid-Signalweg mit DAF-16-Interaktion Einflüsse hinsichtlich der Regulation von Lebensspanne und Stressresistenz vermitteln. Sowohl in der *daf-9*- als auch in der *daf-12*-Mutante konnte eine zusätzliche signifikante Lebenszeitverkürzung im Vergleich zur Kontrolle nach Applikation von *P. luminescens* gemessen werden. Diese

Ergebnisse implizieren, dass neben den Vitellogeninen und DAF-16, auch der Steroid-Signalweg mit den DAF-9- und DAF-12-Proteinen an der immunologischen Abwehr gegenüber *P. luminescens* beteiligt sind. Um letztlich zu verifizieren, dass auch die DAF-Proteine DAF-9 und DAF-12 die Immunantwort in einem gemeinsamen Signalweg mit den Vitellogeninen (und DAF-16) vermitteln, wurden neben den Vitellogeninen auch die DAF-Proteine durch RNAi in der Expression vermindert. Das Fehlen einer additiven Lebenszeitverkürzung unter *P. luminescens*-Exposition zeigt, dass neben DAF-16 auch DAF-9 und DAF-12 im gleichen Signalweg der Stressresistenz versus *P. luminescens* lokalisiert sind. Sowohl DAF-12 (Antebi *et al.* 2000) als auch DAF-16 (Ogg *et al.* 1997) sind im Intestinum lokalisiert, wo ebenfalls die Vitellogenin-Synthese stattfindet (Grant und Hirsh 1999) und *P. luminescens* akkumuliert, sodass eine lokale Immunantwort auf intestinaler Ebene als entscheidend für die Antwort auf *P. luminescens* angesehen werden kann. Der Steroid-Signalweg scheint für eine adäquate Immunantwort hierbei essentiell. Das Postulat der Steroid-vermittelten Immunabwehr in *C. elegans*, wird durch den phylogenetischen Vergleich mit den Säugetieren unterstützt. In Säugetieren katalysiert das Cytochrom P450 CYP27, welches sich als DAF-9-Homolog in *C. elegans* wiederfindet, die Oxidation von Sterolen (Motola *et al.* 2006). Entstehende Cholesterolderivate wie Oxysterole sind Liganden für die DAF-12-Homologe LXRs und VDRs und modulieren darüber die Detoxifikation und Immunfunktion (Houten *et al.* 2006). Der VDR übernimmt neben der klassischen Funktion im Knochenmetabolismus z. B. Funktionen im angeborenen und erworbenen Immunsystem, die sich im Rahmen einer Hypovitaminose D durch ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre, autoimmune und infektiöse Erkrankungen kennzeichnen (Pilz *et al.* 2009, Judd *et al.* 2009, Shoenfeld *et al.* 2009, Nnoaham und Clarke 2008). Vitamin D3 kann das angeborene Immunsystem regulieren, indem es die anti-mikrobiellen Eigenschaften von Immunzellen wie Makrophagen und Monozyten erhöht. Zum einen wird die phagozytotische Kapazität der Makrophagen erhöht (Xu *et al.* 1993). Zum anderen werden anti-mikrobielle Aktivitäten von Vitamin D3 über VDR vermittelt, welcher u. a. eine vermehrte Expression der Cathelicidin hCAP-18-Gene bedingt. Letztere kodieren für aktive Peptide, die mycobakterielles Wachstum hemmen (Martineau *et al.* 2007). Über einen Einfluss von DAF-12 in der Immunabwehr in *C. elegans* finden sich bislang in der Literatur keine Hinweise.

Jedoch ist diese Vitellogenin-, DAF-9-, DAF-12- und DAF-16-vermittelte Immunabwehr-Kaskade möglicherweise nicht auf das Intestinum begrenzt. Diffusionsfähige Signale der Pathogene oder infizierter Tiere werden durch DAF-9 exprimierende sensorische Neuronen erkannt, wodurch eine Verhaltensantwort induziert wird (Kurz und Tan 2004). Sicard *et al.* (2007) beschreiben für *C. elegans* eine Aversion gegenüber *P. luminescens* und eine reduzierte orale Aufnahme der Bakterien. Diese Kommunikation mit der Umwelt mittels sekretorischer Moleküle könnte *C. elegans* nutzen und somit möglicherweise über DAF-9 der XXX-Zellen neuronal eine immunologische Abwehrantwort über den Steroid-Signalweg vermitteln. Die DAF-9-abhängig, neuronal gebildeten DAs könnten intestinal lokalisiertes DAF-12 aktivieren, hierbei eine Interaktion mit DAF-16 eingehen, und somit eine intestinale Immunantwort gegenüber *P. luminescens* induzieren. Ein solches Kommunikationssystem, welches mit dem Immunsystem verbunden ist, wird auch für Pflanzen beschrieben. Als Antwort auf eine Wunde oder Infektion wird ein flüchtiges Signal von der verwundeten Pflanze versendet und durch benachbarte Pflanzen empfangen. Wenn diese die Signale mittels der Blätter detektieren, wird die Transkription mehrerer Genen, die für die Antwort auf Verwundung und Infektion wichtig sind, gestartet (Arimura *et al.* 2000). Da Vitellogenine vermehrt nach *P. luminescens*-Infektion exprimiert werden und essentiell in ihrer Funktion als Cholesterin-Transporter sind, könnten die Vitellogenine auch als systemische endokrine Signale zwischen verschiedenen Geweben (wie Intestinum und Neuronen) die Lebensspanne beeinflussen (Abbildung 5.1). Dieses Postulat wird durch einen Steroid-Signalweg vermittelten Einfluss auf die Lebensspanne thermosensorischer Neuronen unterstrichen. Thermosensorische AFD-Neuronen beeinflussen die Lebensspanne bei erhöhten Temperaturen, indem sie die Aktivität des Steroid-Signalwegs ändern. Bei erhöhten Temperaturen wird die *daf-9*-Expression in den AFD-Neuronen stimuliert und damit einhergehend die Lebensspanne durch die Änderung des Liganden-Gehalts über eine DAF-12-Aktivierung verlängert (Lee und Kenyon 2009).

Zusammenfassend lässt sich bisher feststellen, dass neben DAF-16, DAF-9 und DAF-12 die Vitellogenine als neuentdeckte Immunfaktoren in *C. elegans* fungieren, die systemisch interagieren könnten. Tatsächlich spricht die Translokation von DAF-16 in extra-intestinalen Gewebe dafür, dass Signale als Antwort auf eine *P. luminescens*-Infektion entstehen, die sich vom Darm aus ausbreiten.

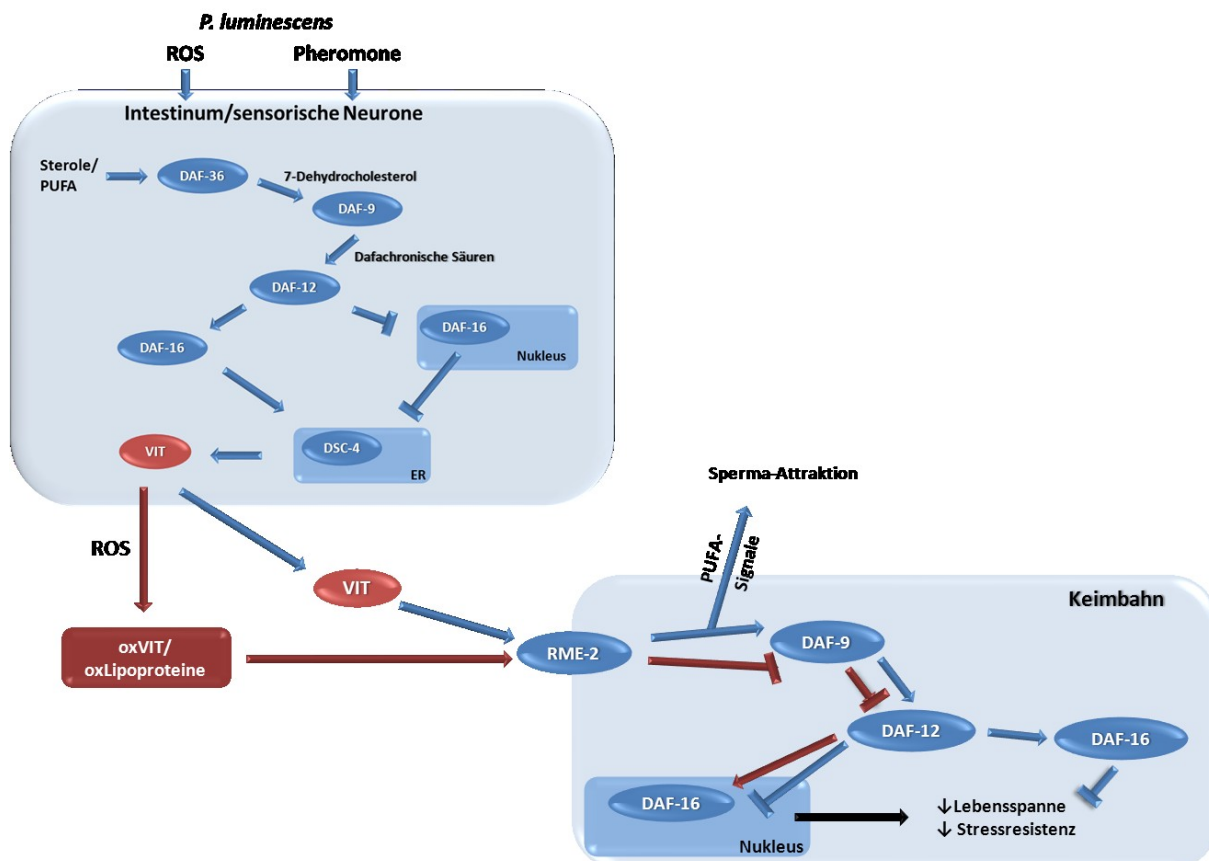


Abbildung 5.1 Lipid-Transport in *C. elegans* und die Rolle der transportierten Lipide im Intestinum, in den Neuronen und in der Keimbahn.

Cholesterole der Nahrung beeinflussen über den Steroid-Signalweg (DAF-36, DAF-9, DAF-12) mit DAF-16-Interaktion die *vit*-Expression, welche von DSC-4/MTP abhängig ist. Hierbei werden Nahrungscholesterole über DAF-36 zu 7-Dehydrocholesterol oxidiert, welches wiederum durch DAF-9 zu dafachronische Säuren (DA) oxidiert wird, die als Liganden für DAF-12 dienen. Ligandenbeladenes aktives DAF-12 bedingt eine cytosolische DAF-16-Lokalisation, welche die *vit*-Expression induziert. Steht kein Cholesterol zur Verfügung, ist diese beschriebene Steroid-Signal-Transduktion gehemmt und Vitellogenine werden folgend vermindert exprimiert. Vitellogenine transportieren Lipide zu den Oozyten und werden endozytotisch über RME-2 aufgenommen. So können Vitellogenine die Lebensspanne, Stressresistenz und Reproduktivität in *C. elegans* beeinflussen. PUFAs dienen z. B. als Vorstufe von Signalen, die die Sperma-Attraktion vermitteln. Werden Vitellogenine durch erhöhten *P. luminescens* induzierten ROS-Stress oxidiert, geht dies mit vermehrter Akkumulation oxidiert Lipoproteinaggregaten einher, die in Abhängigkeit vom Steroid-Signalweg mit DAF-16-Interaktion, die Lebensspanne und Stressresistenz vermindern. VIT, Vitellogenin; PUFA, *polyunsaturated fatty acid*; ROS, *reactive oxygen species*; ER, endoplasmatisches Retikulum; RME-2, Vit-Rezeptor; DSC-4, Homolog zum mikrosomalen Triglycerid-Transferprotein (MTP).

Beurteilung der DAF-16-Translokation als Abwehrmechanismus

DAF-16 transloziert besonders bei oxidativem Stress im dephosphorylierten Zustand in den Zellkern, um Gene zu aktivieren, die für Langlebigkeit, Stressresistenz und Diapause notwendig sind (Hartwig *et al.* 2009, Kondo *et al.* 2005). Hierzu zählen beispielsweise Gene, die für Hitzeschockproteine kodieren und solche, die für anti-oxidative Proteine wie die Superoxiddismutase (SOD) oder Katalase kodieren. In *P. luminescens* exponierten Tieren war eine nukleäre Translokation von DAF-16 in den epidermalen jedoch nicht in den intestinalen

Zellkernen zu beobachten. Auch in Nematoden, die einer *vit*-RNAi unterzogen wurden und mit *P. luminescens* inkubiert wurden, zeigte sich in den epidermalen Zellen eine überwiegende Lokalisation von DAF-16 im Zellkern. Welche dem unter *vit*-RNAi erhöhten Stress entspricht und somit eine extraintestinale Stressantwort *vit* defizienter Tiere impliziert. Im Intestinum liegt nach Infektion mit *P. luminescens* DAF-16 vorwiegend cytosolisch vor. Da eine *vit*-RNAi zu einer 100%igen nukleären Translokation auch in Intestinalzellen führt, während unter *P. luminescens*-Infektion + *vit*-RNAi nur 40 - 60 % (je nach *vit*-RNAi) nukleär vorlagen, kann von einem nukleären Export von DAF-16 im Intestinum als Antwort auf *P. luminescens* ausgegangen werden. Dieser zunächst kontraproduktiv erscheinende Befund eines nukleären DAF-16-Exports wird durch die Vermeidung einer Überexpression DAF-16-abhängiger Zielgene erklärbar.

Evans *et al.* (2008) und Singh und Aballay (2006) wiesen nach, dass DAF-16 für die protektive Pathogenantwort in *C. elegans* benötigt wird. Zwar schützt eine DAF-16-Überexpression *C. elegans* vor bakteriellen Pathogenen, eine exzessive Aktivierung zieht jedoch schädliche Konsequenzen nach sich, wie z. B. eine fehlerhafte Wasserhomöostase. Um diese zu kontrollieren, findet eine DAF-16-Relokalisierung ins Cytosol statt. So kann z. B. Hitzestress sowohl zu nukleärem Import als auch Export von DAF-16 führen (Singh und Aballay 2006). Gleiches findet sich im Zusammenhang mit einer *P. aeruginosa*-Infektion wieder. Diese induziert eine subzelluläre DAF-16-Translokation in das Cytosol in *C. elegans*, obwohl diese mit einer verminderten Expression immunresponsiver Proteine assoziiert ist (Evans *et al.* 2008).

Eine weitere Erklärung für die cytosolische DAF-16-Lokalisation unter *P. luminescens*-Infektion bietet eine Pathogen-induzierte Inhibierung von Abwehr-Signalwegen. Pathogene haben unterschiedliche Mechanismen entwickelt, durch die sie die Immunantwort der Wirte umgehen. Evans *et al.* (2008) konnten zeigen, dass *P. aeruginosa* die Expression von Immunabwehr-Genen in *C. elegans* supprimiert, indem die Bakterien DAF-2/DAF-16-ILS-Signalwege in *C. elegans* aktivieren und die hiermit einhergehende DAF-16-regulierte Transkription immun-relevanter Gene inhibieren (*thn-2*, *lys-7* und *spp-1*). *P. aeruginosa* z. B. induziert die Expression von *ins-7*, welches *downstream* von DAF-2 agiert, um den Insulin-Signalweg zu aktivieren, dies resultiert in einer Inhibierung von DAF-16 und einer verminderten Immun-Expression (Evans *et al.* 2008). Diese Beobachtungen sind

möglicherweise auf *P. luminescens* behandelte Tiere übertragbar. Hierauf basierend könnte *P. luminescens* eine cytosolische DAF-16-Lokalisation induzieren, um eine Stressantwort von *C. elegans* zu umgehen. Auf den durch *P. luminescens* induzierten DAF-16-Export aus den intestinalen Zellen könnte *C. elegans* mit einer vermehrten *vit*-Expression als mögliche Gegenregulation reagieren. In *P. luminescens* infizierten Tieren ist die *vit*-Expression nachweislich erhöht, weiterhin ist die *vit*-Expression von DAF-16 abhängig. In Insekten wird die Vitellogenese hormonell durch JH reguliert (Flatt *et al.* 2005, Tatar *et al.* 2001), in *C. elegans* scheint der intestinaler Prozess der Vitellogenese noch nicht vollständig geklärt, jedoch ist eine transkriptionale DAF-16-Abhängigkeit beschrieben. Eine nukleäre DAF-16-Aktivität unterdrückt die Vitellogenese als direkter Repressor der *vit*-Gene auf transkriptionaler und translationaler Ebene (Murphy *et al.* 2003, Halaschek-Wiener *et al.* 2005, McElwee *et al.* 2003, Dong *et al.* 2007). So bedingt eine cytosolische DAF-16-Lokalisation die *vit*-Expression, die von *C. elegans* für die Abwehr gegenüber *P. luminescens* genutzt werden könnte. Zum einen kann durch die erhöhte *vit*-Expression vermehrt Cholesterin transportiert werden, welches die Steroid-Signalkaskade aktiviert. Diese Aktivierung induziert wiederum die *vit*-Expression, wie durch Patel *et al.* (2008) bestätigt wird. Die Autoren weisen eine nukleäre DAF-16-Lokalisation aufgrund reduzierter Steroid-Signalen nach. Diese nukleäre DAF-16-Lokalisation unterdrückt die Vitellogenese (Murphy *et al.* 2003, Halaschek-Wiener *et al.* 2005, McElwee *et al.* 2003, Dong *et al.* 2007). Eine Verbindung zwischen dem Steroid-Signalweg (DAF-9, DAF-12) und der Stressresistenz mit der verbundenen Änderung der Lebensspanne in Abhängigkeit zu DAF-16 wurde einleitend beschrieben. Zum anderen bieten die erhöhten Vitellogenin-Spiegel möglicherweise aufgrund ihrer antioxidativen Kapazität einen immunologischen Schutz.

Der durch *P. luminescens* induzierte DAF-16-Export aus den intestinalen Zellen ist schlussendlich mit einer vermehrten *vit*-Expression assoziiert, der möglicherweise die Gegenreaktion von *C. elegans* gegenüber *P. luminescens* darstellt.

Verminderte *vit*-Expression reduziert die antioxidative Kapazität

Dass Vitellogenine in *C. elegans* eine Funktion als potentielle Antioxidantien übernehmen, zeigt sich anhand der erhöhten mitochondrialen ROS-Produktion, trotz gesteigerter DAF-16-Translokation in den Nukleus nach *vit*-RNAi. Diese vermehrte ROS-Produktion nach *vit*-RNAi zeigte sich ebenfalls in der durchgeführten OxyBlot-Analyse, mittels welcher vermehrte oxidative Modifikationen und hiermit korreliert vermehrt oxidativ geschädigte Proteine, nach einem *vit*-RNAi detektiert werden konnten. Weiterhin weist die verstärkte Akkumulation carbonylierter VIT-6-Proteine in älteren Nematoden auf die anti-oxidative Eigenschaft und die Bedeutung dieses Vitellogenins in Langlebigkeit-vermittelnde Prozesse hin. Der Schutz zellulärer Komponenten vor Oxidation könnte u. a. auf die Metall-bindenden Eigenschaften der Vitellogenine zurückzuführen sein (Nakamura *et al.* 1999). So könnte sowohl die anti-oxidative Kapazität der Vitellogenine als auch, wie oben diskutiert, die Funktion der Vitellogenine im Sterol-Transport den Schutz gegenüber einer *P. luminescens*-Infektion erhöhen.

***P. luminescens*-Infektion erhöht den ROS-Stress**

Aufgrund der Bedeutung der Vitellogenine für die Resistenz gegen *P. luminescens* und ihrer Wirkungsweise, war zu postulieren, dass *P. luminescens* die Lebensspanne von *C. elegans* durch eigene ROS-Produktion reduziert. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass *P. luminescens* signifikant mehr ROS bildet als die Kontrollbakterien *E. coli*-HT115. Die *P. luminescens* induzierten diffusionsfähige ROS sind kurzlebige reaktive Moleküle, die vermutlich zelluläre Komponenten wie Nukleinsäuren, Proteine und Lipide intestinal modifizieren und eine progressive Gewebedegradation bedingen. ROS führen z. B. zur progressiven Muskeldegeneration, dies resultiert in einer Abnahme der generellen Aktivität der Tiere und einer schnellen Alterung (Garigan *et al.* 2002). Bei Akkumulation dieser oxidativen Schäden sowie unzureichender Detoxifizierung von ROS führt dies zum Tod des Nematoden (Floyd *et al.* 2001).

Interessanterweise konnte nach *P. luminescens*-Applikation nahezu keine mitochondriale Fluoreszenz mehr in *C. elegans* detektiert werden. Dies beruhte offenbar darauf, dass durch Freisetzung der gesamten gebildeten ROS in das Darmlumen durch *C. elegans* versucht wird

P. luminescens abzuwehren. Eine vermehrte ROS-Produktion als Abwehrmechanismus findet sich auch in Säugetieren. In diesen generieren angeborene Immunzellen wie Makrophagen und Neutrophile ROS als anti-mikrobielle Antwort über die NADPH-Oxidase (Cross und Segal 2004). Chávez *et al.* (2007) gehen davon aus, dass intestinale Epithelzellen ROS über die NADPH-Oxidase als eine Form der anti-mikrobiellen Antwort des angeborenen Immunsystems generieren.

Die darauf folgende vermehrte *vit*-Expression nach *P. luminescens*-Exposition scheint ein zellulärer Schutzmechanismus gegen die eigens produzierten und von *P. luminescens* freigesetzten ROS zu sein. Dass die zusätzliche Lebensverkürzung in infizierten *vit* defizienten Nematoden tatsächlich auf den Verlust der antioxidativen Kapazität zurückzuführen ist, zeigt sich nach Applikation des Antioxidans Ascorbinsäure, welche die *vit*-RNAi verursachte Lebenszeitverkürzung kompensiert. Da die mit *P. luminescens* + Ascorbinsäure unter *vit*-RNAi behandelten Nematoden aber nicht länger leben als die alleine mit *P. luminescens* inkubierten, ist der Haupteffekt der Toxizität von *P. luminescens* nicht durch ROS vermittelt.

Bedeutung der Cholesterol-Verfügbarkeit in *P. luminescens* infizierten Tieren

Experimentelle Studien belegen, dass in Säugetieren Sterole nicht nur wesentliche Funktionen in der Entwicklung und Alterung einnehmen, sondern auch protektiv gegenüber ROS wirken. Ein Cholesterolemangel in den roten Blutzellen führt zu einer erhöhten Anfälligkeit dieser Zellen gegenüber Peroxidation (López-Revuelta *et al.* 2005). Hieraus lässt sich übertragen, dass eine Depletion von Sterolen die Anfälligkeit gegenüber ROS auch in *C. elegans* erhöhen könnte. Tatsächlich wiesen Cheong *et al.* (2011) einen vermehrten ROS-Stress in Cholesterol defizienten *C. elegans* aufgrund mitochondrialer Dysfunktionen nach. Inwieweit veränderte Cholesterol-Gaben einen Einfluss auf die *vit*-Expression besitzen und hiermit assoziierte Änderungen der Lebensspanne verursachen können wird folgend diskutiert.

Cholesteralmangel vermindert die Immun-Responsivität

Steht in *C. elegans* kein oder nur wenig Cholesterin zur Verfügung, wird dieses vermutlich nicht für die Reproduktion, sondern für energetisch essentielle, physiologische Signalwege eingesetzt, um das Überleben der adulten Tiere zu sichern. Da Vitellogenine als Transportproteine primär in die Distribution des Cholesterins zu den Oozyten und damit in die Reproduktion involviert sind, könnte dies erklären, warum die VIT-Expression unter Cholesteralmangel vermindert wird. Choi *et al.* (2003) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass ein Cholesteralmangel die ausbleibende Synthese steroidaler Hormone Ursache verminderter VIT- und RME-2-Expression ist. Wenn nur geringe Mengen bzw. kein Cholesterin zur Verfügung steht, können auch nur geringe Mengen Cholesterin in die Zelle transportiert werden, welche von DAF-9 zu da-fachronischen Säuren oxidiert werden. Dies bedingt verminderte hormonale Signale, um DAF-12 zu aktivieren und resultiert daher in einer nukleären DAF-16-Translokation. Letztere hat eine geringere VIT-Expression zur Folge (Murphy *et al.* 2003, Halaschek-Wiener *et al.* 2005, McElwee *et al.* 2003, Dong *et al.* 2007). Dass ein Cholesteralmangel eine nukleäre DAF-16-Translokation bedingt, welche von DAF-9 und DAF-12 abhängig ist, wird von Jeong *et al.* (2010) bestätigt. Weiterhin zeigen Patel *et al.* (2008), dass reduzierte Steroid-Signale die nukleäre DAF-16-Lokalisation induziert.

Aus diesen Befunden lässt sich das Postulat einer Modulation der intestinalen VIT-Expression durch die Cholesterin-Zufuhr ableiten. Bei einer *P. luminescens*-Infektion ist Cholesterin hierbei als wesentlich zu betrachten, da aus Cholesterin DAF-9-abhängig Liganden für DAF-12 oxidiert werden, die mit einer vermehrten VIT-Expression einhergehen und intestinalen Schutz vor oxidativen Schäden bedingt. Während in extra-intestinalen Geweben der durch eine *P. luminescens*-Infektion verursachte ROS-Stress zu einer DAF-16-Translokation in den Nukleus führt, was mit einer Transkription Stress-responsiver Gene assoziiert ist.

Choi *et al.* (2003) postulieren, dass die Gen-Expression der Vitellogenine und deren Rezeptoren (RME-2 und LRP-1) über *sterol response element binding protein-1c* (SREBP1c)-ähnliche Signalwege reguliert wird. Sie konnten nachweisen, dass sich Sterol-regulierende Elemente oder verwandte regulatorische Cholesterin-responsive Sequenzen, in der 5'-Region von nicht-translatierten *vit-2*-Genen befinden. Zusätzlich konnten sie *in vitro* zeigen, dass die transkriptionale Aktivität dieser Elemente durch Änderungen in der Sterol-Konzentration

beeinflusst wird. Daher wurde die Annahme einer transkriptionalen Aktivierung von *vit-2*-Genen *in vitro*, mittels der sich in 5'-Regionen befindenden Sterol-Response-Elemente (SRE), postuliert (Choi *et al.* 2003). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie kann das Vorhandensein von SREBP in anderen Vitellogeninen nicht ausgeschlossen werden. Die Befunde der vorliegenden Arbeit lassen jedoch nicht den Schluss zu, dass der Cholesterol-Metabolismus in *C. elegans* analog zu dem in Säugetieren (Brown und Goldstein 1997) ist, da sonst eine erhöhte VIT-Expression unter Cholesterol-Mangel zu erwarten gewesen wäre. Es sei denn, eine unterschiedliche Verteilung der Prozesse wird angenommen, die mit dem unterschiedlichen Stress-Antwortmechanismus intestinaler und extra-intestinaler Zellen hinsichtlich der DAF-16-Translokation, vergleichbar wäre. So könnte in intestinalen Zellen die VIT-Expression unter Cholesterol-Defizienz gehemmt sein, während extra-intestinales Gewebe auf Cholesterol-Mangel mit vermehrter VIT-Expression reagieren könnte.

Die Cholesterol-Defizienz hatte nicht nur auf die VIT-Expression Auswirkungen, auch wurde die Lebensspanne beeinflusst. Eine Infektion mit *P. luminescens* führte in Cholesterol defizienten Tieren zu einer signifikanten Verkürzung der Lebensspanne. Weiterhin lebten *vit* defiziente Tiere nach *P. luminescens*-Inkubation, ebenso wie solche die unter Cholesterol-Defizienz aufwuchsen, signifikant zusätzlich kürzer als die infizierte Kontrolle. Wurde jedoch eine *vit*-RNAi unter Cholesterolmangel durchgeführt, war keine additive Lebenszeitverkürzung durch *P. luminescens* vorhanden. Hieraus lässt sich schließen, dass ein Cholesterolmangel durch die reduzierte VIT-Expression ebenso immun-suppressiv wirkt. Für die Resistenz gegenüber *P. luminescens* scheint auf intestinaler Basis die Expression der Vitellogenine relevanter als die Translokation von DAF-16. Unter *vit*-RNAi transloziert DAF-16 in den Nukleus, jedoch sterben die Nematoden hierbei früher.

Applikation erhöhter Cholesterol-Konzentrationen vermindert ebenfalls die Immun-Responsivität

Die Modifizierung der Cholesterol-Konzentration führte in dieser Arbeit zu einer Verminderung der VIT-6-Proteinmenge, unabhängig davon, ob die Standarddosierung verringert oder erhöht wurde. Ein 10-fach erhöhtes Cholesterol-Angebot induzierte eine verminderte VIT-Expression um ca. 80 %. Die verminderte Menge von VIT-6-Proteinen könnte durch eine vermehrte Expression Cholesterol-responsiver RME-2 unter erhöhter

Cholesterol-Konzentration erklärbar sein. Eine vermehrte RME-2-Expression bedingt eine erhöhte intrazelluläre Aufnahme und endolysosomal-lysosomaler Abbau von Vitellogeninen. Dies ist mit der Regulation der humanen LDL-Rezeptoren (LDL-R), welche homolog zu RME-2 sind, vergleichbar. LDL-R werden durch SREBP-2 reguliert und bei erhöhtem Cholesterol-Angebot vermehrt exprimiert, was zu einer erhöhten endozytotischen Aufnahme und einem Abbau von LDL führt (Osborne 2000, Lin *et al.* 2005).

Wird *C. elegans* unter Bedingungen erhöhter Cholesterol-Konzentrationen mit *P. luminescens* infiziert, lebten die Nematoden signifikant kürzer als in Gegenwart von 5 µg/ml Cholesterol. Somit könnte die verminderte VIT-Expression sowohl bei erhöhter als auch reduzierter Cholesterolversorgung steroidaler Abwehrmechanismen auf intestinaler Ebene reduzieren und dadurch die Stressresistenz gegenüber *P. luminescens* limitieren. Jedoch kann die verminderte VIT-Expression nach Applikation von 50 µg/ml Cholesterol nicht analog zu einer *vit*-RNAi gleichgesetzt werden, da in *vit* defizienten Nematoden eine zusätzliche Lebensspannen-Verkürzung im Vergleich zur Cholesterol-exponierten Kontrolle eintritt.

Beurteilung der Cholesterolaufnahme über RME-2

Neben RME-2 (*receptor mediated endocytosis*) spielen LRP-1 und LRP-2 eine untergeordnete Rolle als Vitellogenin-Rezeptoren (Choi *et al.* 2003, Branicky *et al.* 2010). Die Bedeutung des RME-2 für die Cholesterol-Versorgung wird dadurch ersichtlich, dass nach dessen *Knock-down* die VIT-6-Expression vermindert war, der Cholesterolmangel für die Zellen also evident erscheint.

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass sowohl nach *rme-2*-, als auch nach *vit-6*-RNAi die DHE-Aufnahme, signifikant vermindert ist. Das fluorogenem Cholesterolanalogen Dehydroergosterol (DHE) ist die präferierte Substanz, um den Transport und die Verteilung von Sterolen im Organismus nachzuvollziehen. DHE hat nahezu cholesterolidentische biologische Eigenschaften und kann ohne Nebeneffekte als alleinige Sterolquelle eingesetzt werden (Wüstner *et al.* 2010). Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zur Lebensspanne konnten belegen, dass diese durch Aufzucht mit DHE nicht beeinträchtigt wird (Daten nicht gezeigt). Wüstner *et al.* (2010) konnten durch

DHE-markierte Nematoden nachweisen, dass die Anreicherung von Sterolen nicht diffus erfolgt, sondern punktuell in Neuronen des Kopfes, in Zellen der exkretorischen Drüse, in Spermien und der Spermathecae, in Embryonen, sowie in membranassoziierten Vesikeln der Oozyten. So sind Vitellogenine und deren Rezeptoren essentiell für diese Zelltypen.

Dass die Reduktion der DHE-Aufnahme sowohl nach *rme-2*- als auch *vit-6*-RNAi nicht drastisch war, ließe sich für die *vit*-RNAi durch die Redundanz der Vitellogenine erklären. Allerdings wurde schon vielfach diskutiert, dass durch RNAi eines Vitellogenins auch die anderen Vitellogenine funktionell betroffen sind, weshalb andere Cholesterol-Transporter vermutet werden können. Hinsichtlich des Ausbleibens einer vollständigen Hemmung des DHE-Transports nach *rme-2-Knock-down* ist anzuführen, dass weitere Vitellogenin-Rezeptoren in *C. elegans* existent sind. Hinzu kommt, dass Vitellogenine nicht die einzigen Cholesteroltransporter und neben RME-2 auch noch weitere Vitellogenin-Rezeptoren wie z. B. LRP-1 und LRP-2 in *C. elegans* sind (Branicky *et al.* 2010). Außerdem wurde ein 37 kDa großes Protein als möglicher Vitellogenin-unabhängiger Transporter identifiziert, bisher ist dieser jedoch noch nicht weiter bestimmt worden (Matyash *et al.* 2001, Grant und Hirsh 1999). Weiterhin könnte eine direkte Aufnahme von Sterolen über die Kutikula die Aufnahme von DHE unter *vit-6*- bzw. *rme-2*-RNAi erklären.

Die Bedeutung von *rme-2* für die Resistenz gegenüber *P. luminescens*

Die Bedeutung einer adäquaten Cholesterolverversorgung für die Stressresistenz wird in *rme-2* defizienten Nematoden nach *P. luminescens*-Inkubation evident, die eine signifikante Lebenszeitverkürzung im Vergleich zur Kontrolle aufweisen. Wenn RME-2 nicht zur Verfügung steht, wird weniger Cholesterol in die Zelle transportiert, weshalb weniger Liganden für DAF-12 synthetisiert werden und somit, in Assoziation zu Patel *et al.* (2008), DAF-16 im Kern vorliegt. Dies induziert die geringere *vit*-Expression (Murphy *et al.* 2003, Halaschek-Wiener *et al.* 2005, McElwee *et al.* 2003, Dong *et al.* 2007). und führt letztlich zum frühzeitigen Tod. Da der lebensverkürzende *vit*-RNAi-Effekt in einer *rme-2*-Mutanten noch vorhanden ist, wird die Existenz weiterer Rezeptoren und Transporter mit welchen Cholesterol in die Zielzelle gelangt, unterstrichen. Das intrazellulär verminderte Cholesterol in *rme-2*-Mutanten reicht vermutlich für eine, wenn auch verminderte Steroid-vermittelte Stressantwort gegenüber *P. luminescens* aus. Wird jedoch zusätzlich zu einem *rme-2-Knock-*

out ein *vit-6-Knock-down* durchgeführt, kann davon ausgegangen werden, dass nur noch marginal Cholesterin in die Zelle transportiert wird. Dies führt dann nach Infektion mit *P. luminescens* zu einer drastischen Lebenszeitverkürzung im Vergleich zum infizierten Wildtyp.

Transkriptionaler Einfluss einer 17 β -Östradiol-Applikation

Der Einfluss der Vitellogenine auf die Immunantwort versus *P. luminescens* ist bedeutsam. Vitellogenine sind, wie beschrieben, durch Östrogene induzierbar, was auf dem Vorkommen von ERE-Sequenzen in den Promotorregionen der *vit*-Gene beruht. Die hochkonservierte ERE-Sequenz weist eine große Homologie zur humanen Sequenz auf und findet sich sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten (MacMorris *et al.* 1992). Aufgrund ihrer Östrogen-Responsivität wird die Vitellogenin-Expression als Biomarker für die Umweltbelastung mit natürlichen und synthetischen Östrogenen herangezogen. Der stärkste Induktor der Vitellogenin-Synthese erscheint das 17 β -Östradiol. In Leberzellen des afrikanischen Krallenfrosches konnte die Vitellogenin-Transkription um mehr als das 1000-fache durch Injektion pharmakologischer Dosen (2 mg 17 β -Östradiol) erreicht werden (Hayward *et al.* 1982, Perlman *et al.* 1985). In der Leber von Zebrafischen erzielte eine 14-tägige Kultivierung mit 1 μ g/l 17 β -Östradiol versetztem Wasser eine 1000 - 7000-fache Erhöhung der *vit-2*-Expression. Hierbei variierte die Expression der einzelnen Fische, eine Expressionssteigerung war jedoch in allen Untersuchungen zu finden (Henry *et al.* 2009). Ähnliche Studien zeigten eine um das 800 - 900-fache Erhöhung der *vit-2*-Expression, nachdem die Fische 7 Tage lang 0,5 und 1 μ g/l 17 β -Östradiol ausgesetzt waren (Yuanxing *et al.* 2009).

Die in der Literatur erzielten Ergebnisse einer starken Induzierbarkeit der *vit*-Expression mittels 17 β -Östradiol konnten in der vorliegenden Arbeit auch für *C. elegans* nachgewiesen werden. Bereits frühere Studien zeigen, dass eine 3 - 4-tägige Inkubation mit 10 μ M 17 β -Östradiol in *C. elegans* zu einer 2,68-fachen Erhöhung der *vit-2*-Expression führt (Custodia *et al.* 2001). Die mittels Western Blot und DNA Microarray ermittelten Werte sind deutlich geringer als die in dieser Arbeit mittels qRT-PCR ermittelten Daten. Eine 4-tägige Inkubation von Wildtyp-Tieren ab dem L1-Larvenstadium mit 10 μ M 17 β -Östradiol führte im Rahmen dieser Arbeit zu einer ca. 20-fachen Erhöhung der *vit-2*-Expression im Vergleich zu den Kontroll-Tieren. Diese Divergenz zwischen Western Blot, DNA Microarray und qRT-PCR lässt

sich dahingehen erklären, als dass aufgrund von posttranskriptionalen Regulationen und divergierenden *turn-over*-Raten von mRNA und Proteinen, eine schwache Korrelationen zwischen mRNA- und Protein-Expression bestehen kann (Hack 2004, Cox *et al.* 2005).

Einfluss einer vermehrten *vit*-Expression auf die immunologische Stressantwort nach *P. luminescens*-Infektion

Eine 4-tägige Inkubation mit 10 μM 17 β -Östradiol kompensierte die durch *P. luminescens*-Infektion verursachte Lebenszeitverkürzung fast vollständig. Die nahezu vollständige Resistenz *versus P. luminescens* war komplett Vitellgenin-abhängig, da *vit-6*-RNAi diese gänzlich unterdrückte. Weiterhin konnte zuvor gezeigt werden, dass die Gabe von 100 μM Ascorbinsäure die durch *vit-6*-RNAi verursachte Lebenszeitverkürzung unter *P. luminescens*-Exposition verhindern konnte. Darauf Bezug nehmend, ist davon auszugehen, dass die antioxidativen Eigenschaften der Vitellogenine nur eine Komponente ihrer anti-bakteriellen Eigenschaft darstellen. Aufgrund der vermehrten *vit*-Expression, kann ein erhöhter Transport der Sterolmetabolite in die Zelle unterstellt werden, welche mittels Aktivierung des nukleären Rezeptor DAF-12 die Immunität erhöhen (Abbildung 5.2).

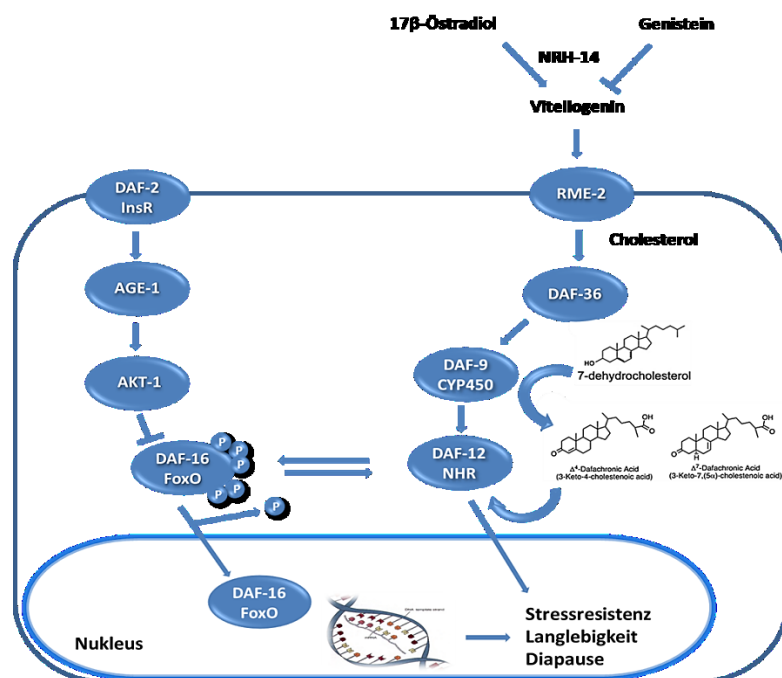


Abbildung 5.2 Transkriptionaler Einfluss des Östrogens 17 β -Östradiol und des Phytoöstrogens Genistein auf die Vitellogenin-Expression und die hiermit vermittelten Effekte.

17 β -Östradiol induziert eine vermehrte *vit*-Expression und damit einhergehend einen erhöhten RME-2-vermittelten Cholesteroltransport in die Zelle. Dies bedingt eine vermehrte DAF-36- und DAF-9-abhängige Liganden-Produktion und hiermit einhergehend eine vermehrte Aktivierung von DAF-12. Diese Aktivierung des Steroid-Signalwegs bedingt eine verstärkte Resistenz der Nematoden gegenüber *P. luminescens*.

Beurteilung des Einflusses des Östrogenrezeptors NHR-14

Noch ist wenig über Östrogenrezeptoren (ERs) in *C. elegans* bekannt. NHR-14 ist als ein ER beschrieben und wurde hinsichtlich der Vermittlung von Östrogen-Wirkungen als potentieller Rezeptor in Betracht gezogen. Laut Mimoto *et al.* (2007) ist die *vit*-Expression in *nhr-14*-Mutanten geringer als in Wildtyp-Tieren, allerdings zeigten die Autoren eine nur 20 - 30 %ige Verminderung der VIT-2- und VIT-6-Expression nach *Knock-out* von *nhr-14*. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Quantifizierung der VIT-6-Expression nach *nhr-14*-RNAi mittels Western Blot konnte dieses Ergebnis nicht bestätigen, da keine Veränderung der VIT-6-Expression auf Proteinebene erkennbar war. Festzustellen ist weiter, dass Mimoto *et al.* (2007) die *vit*-Expression auf Transkript-Ebene bewirkten und diese nicht die Effekte auf Proteinebene reflektieren muss. Die mRNA-Expression dient zwar als indirekter Marker für die Proteinexpression, jedoch können aufgrund von post-transkriptionalen Regulationen und divergierenden *Turn-over*-Raten von mRNA und Proteinen nur schwache Korrelationen zwischen mRNA- und Proteinexpression bestehen (Hack 2004, Cox *et al.* 2005). Angesichts der Tatsache, dass ca. 280 Gene in *C. elegans* Homologe zu nukleären Hormonrezeptoren kodieren (Mimoto *et al.* 2007), die allerdings funktionell größtenteils nicht charakterisiert sind, erscheint es wahrscheinlich, dass 17 β -Östradiol die VIT-Expression in *C. elegans* NHR-14 unabhängig induziert. Die Bedeutungslosigkeit von NHR-14 für die Effekte von 17 β -Östradiol unter *P. luminescens*-Exposition wurde schließlich aufgrund der unter *nhr-14*-RNAi erhaltenen Ergebnisse deutlich. Hierbei war zu beobachten, dass das Fehlen von *nhr-14* keinen Einfluss auf die für 17 β -Östradiol beschriebene Lebenszeitverlängerung hatte. So können weitere ERs in *C. elegans* diskutiert werden, welche die VIT-Expression beeinflussen. Neuere Studien implizieren eine ER α -abhängige VIT-Expression in unterschiedlichen Spezies.

In Vertebraten – ausgenommen den Säugetieren – und in Invertebraten stellt die Eidotterspeicherung in den Oozyten einen Hormon-abhängigen, Geschlechts-spezifischen Prozess dar. Gonadotropin stimuliert in den Ovarien der Eidechse *Podarcis sicula* 17 β -Östradiol, welches, aufgrund der ERE-Sequenzen in der Promotorregion der Vitellogenine, essentiell für deren Synthese in der Leber ist. Analog hierzu stimuliert 17 β -Östradiol die Expression von Vitellogeninen in Männchen, in welchen diese Gene normalerweise in silenter Form vorliegen. Die hierbei unterliegenden Funktionen der Östrogen-Rezeptoren, respektive ER α und ER β , scheinen in diesem Zusammenhang noch

nicht vollständig geklärt. In nicht brütenden Eidechsen-Weibchen und in nicht 17 β -Östradiol behandelten Männchen wird primär ER β exprimiert. Wohingegen in Weibchen in der Brutzeit (während der VIT-Expression) und in 17 β -Östradiol behandelten Männchen beide Rezeptoren exprimiert werden (Verderame und Limatola 2010). Weiterhin beeinflusst in der Regenbogen-Forelle eine Leber-spezifische ER α -Isoform die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Vitellogenese (Menuet *et al.* 2001). Analog hierzu ist eine ER α -Transkription in der Leber weiblicher, adulter iberischer Molche in der Vitellogenese involviert (Ko *et al.* 2008). Aufgrund dieser Befunde ist davon auszugehen, dass in der 17 β -Östradiol induzierten Expressionssteigerung der Vitellogenine ER α eine entscheidende Größe darstellt. Dass Vitellogenine mit einem ER α -ähnlichen Rezeptor unter Östrogen-Abhängigkeit interagieren könnten, wird durch Studien an Säugetieren unterstrichen. Das DAF-16-Homolog FOXO1 interagiert in der Anwesenheit von Östrogenen wie Östradiol mit ER α . Diese Interaktion erhöht die ER α -Transaktivierung und unterdrückt die FOXO1-Aktivierung (Schoor *et al.* 2001). So wird in der Anwesenheit von Östrogenen die FOXO1-Aktivität in Mäusen vermindert. Hiermit ist eine erhöhte Stressresistenz in Östrogen-behandelten Tieren assoziiert, welche mit der Langlebigkeit korreliert (Russell und Kahn 2007). Hierauf basierend könnte *C. elegans* die DAF-16-Aktivität ER α -abhängig unter 17 β -Östradiol-Applikation unterdrückt sein, was eine vermehrte *vit*-Expression induzieren und hiermit einhergehend die immunologische Stressresistenz erhöhen könnte. So zeigt ER α beispielsweise einen 17 β -Östradiol-vermittelten immunologischen Schutz in Säugetieren. 17 β -Östradiol wirkt im Gehirn weiblicher Mäuse neuro-protectiv, indem es die angeborene Immunantwort hinsichtlich bakterieller und viraler Pathogene vermittelt. Sowohl ER-defiziente Mäuse als auch Mäuse mit einem geringeren 17 β -Östradiol-Level sind anfälliger gegenüber Infektionen und zeigen eine unvollständige Abwehr-Reaktion gegenüber LPS im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die hierbei zu Grunde liegende inflammatorische Antwort wird über ER α reguliert, da ER α defiziente Mäuse eine verminderte angeborene Immunantwort gegenüber LPS im Vergleich zu ER β defizienten Mäusen aufweisen (Soucy *et al.* 2005). Vorangegangene generelle Untersuchungen in Stachelhäutern und Honigbienen beschreiben einen Einfluss von Vitellogeninen auf die pathogene Immunantwort (Glinski und Jarosz 2000, Amdam *et al.* 2002). Da vermutlich sowohl die Immunantwort als auch die 17 β -Östradiol induzierte *vit*-Expression über ER α vermittelt wird, wäre ein immuno-protectiver Einfluss auf transkriptionaler Ebene denkbar,

welcher über eine 17 β -Östradiol induzierte, ER α -abhängige vermehrte VIT-Expression definiert ist. Folgend könnte 17 β -Östradiol in *C. elegans* eine ER α -abhängige, vermehrte vit-Expression induzieren, welche mit einer erhöhten Immunresistenz gegenüber *P. luminescens* einhergeht. Voraussetzung hierbei ist jedoch das Vorhandensein einer homologen ER α -Isoform in *C. elegans*.

Transkriptionaler Einfluss des Phytoöstrogens Genistein

Weiterhin wurde überprüft, ob das Phytoöstrogen Genistein den Effekt von 17 β -Östradiol auf die Immunität in *C. elegans* beeinflussen kann. Genistein ist eines der Haupt-Isoflavonoide der Sojabohne (Wang und Murphy 1994), dessen relatives östrogenes Potential um das 100- bis 1000-fache geringer ist als das des 17 β -Östradiols. Genistein reguliert die Aktivität des ER, wie es auch für andere nukleäre Faktoren durch Makro-Nährstoffe wie Fettsäuren (Jansen *et al.* 2004) oder Glucose (Mitro *et al.* 2007) beschrieben ist (Rando *et al.* 2009). Der phenolische Ring und der Abstand zwischen den 4'- und 7'-Hydroxyl-Gruppen zeigen strukturelle Ähnlichkeiten zu 17 β -Östradiol. Weiterhin ist eine transkriptionelle Regulation sowohl von ER β als auch ER α durch Genistein möglich, wobei eine Präferenz gegenüber ER β besteht (Gutendorf und Westendorf 2001, Morito *et al.* 2001). Genistein kann – abhängig vom Gewebe und vom endogenen Östrogenspiegel – sowohl Östrogen-agonistische als auch -antagonistische Wirkungen aufweisen (Morito *et al.* 2001). Penttinen-Damdimopoulpu *et al.* (2009) weisen nach, dass in Mäusen eine auf Soja-basierende Nahrung anti-östrogene Effekte in der Anwesenheit von 17 β -Östradiol, in der Abwesenheit von 17 β -Östradiol jedoch östrogene Effekte vermittelt. Dieser Befund wird durch eine 20-100-fach geringere Bindungsaffinität zu ER α und ER β von Genistein im Vergleich zu 17 β -Östradiol erklärbar (Kuiper *et al.* 1997). Die Effekte von Isoflavonen auf die transkriptionale ER-Aktivität *in vivo* sind als sehr komplex zu betrachten, da es nicht nur durch verschiedene Lebenszeitpunkte der Isoflavon-Applikationen signifikante Unterschiede in der Aktivität gibt, sondern auch durch die Applikationsform. Bei isolierten Isoflavonen ist die Bioverfügbarkeit geringer als bei der Aufnahme von Isoflavonen in Form eines Lebensmittels wie Sojamilch (Rando *et al.* 2009). Die östrogene Wirkungen zeigen sich besonders deutlich in Fischen, in welchen eine Applikation von Genistein zu einer Erhöhung der Vitellogenin-Expression führte (Inudo *et al.* 2004).

In der vorliegenden Arbeit erwies sich Genistein eindeutig als Anti-Östrogen, wie anhand signifikant reduzierter VIT-Expression auf mRNA- und Proteinebene nach Behandlung mit Genistein geschlossen werden konnte. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Untersuchungen an Fischen, welche eine östrogene Wirkung von Genistein implizieren. In Anbetracht der in der Literatur diskutierten östrogenen aber auch anti-östrogenen Wirkung von Phytoöstrogenen scheint dieser Widerspruch jedoch nicht verwunderlich. Hierbei ist das Verhältnis des endogenen 17β -Östradiols und des Genisteins im Zielorgan ein determinierender Faktor (Adlercreutz *et al.* 1995). Weiterhin belegen Zellkulturstudien (humane Hepatoma HepG2-Zellen), dass Genistein die hepatische ApoB-Sekretion inhibiert, indem die Cholesterol-Synthese und -Veresterung, die Inhibierung von MTP-Aktivität und -Expression und die Expression von LDL-Rezeptoren erhöht sind. MTP, welches neben ApoB-100 ebenfalls der Vitellogenin-Familie angehört, ist ein wesentliches Transferprotein, das den Transport von Lipiden zum ApoB katalysiert (Jamil *et al.* 1995, Wetterau *et al.* 1998, Borradaile *et al.* 2002). Jedoch ist anzumerken, dass in der aktuellen Literatur keine Informationen über endogene Östrogen-Spiegel in *C. elegans* vorliegen, weshalb über eine Genistein/ 17β -Östradiol Ratio und deren Auswirkung nur spekuliert werden kann. Zu postulieren ist dementsprechend das endogene Vorliegen östrogenwirksamer Verbindungen in *C. elegans*, welche durch die hohe Genistein-Konzentration [100 μ M] vom Rezeptor (ER α -Typ) verdrängt werden.

In Mamma-Carzinom-Geweben von Menschen und Ratten kann Genistein kompetitiv die Bindung von 3 [H]-Östradiol an den ER unterdrücken (Verdeal *et al.* 1980). Unter dieser Prämisse wird das Postulat der anti-östrogen Kapazität von Genistein hinsichtlich der VIT-Expression durch die höhere Präferenz des Phytoöstrogens gegenüber dem ER β (Kuiper *et al.* 1998) erklärbar. ER α und ER β divergieren sowohl strukturell als auch in ihrer physiologischen Funktion. Weiterhin unterliegt eine gegenseitige Hemmung der Rezeptoren (Hall *et al.* 2001, Nilsson und Gustafsson 2011). Hierbei stellen die relativen Gehalte an ER α und ER β in der Zielzelle die wesentliche Determinante für östrogene bzw. anti-östrogene Effekte von 17β -Östradiol und anderer Agonisten sowie Antagonisten dar (Nilsson und Gustafsson 2011). In Mäusen zeigt sich eine um 85 % erhöhte 17β -Östradiol-induzierte Gen-Expression in Knochen in der Abwesenheit des ER β als bei Vorliegen des ER-Subtyps. Dies liegt in einer möglichen antagonisierenden Wirkung des ER β auf die ER α -vermittelte Gentranskription begründet (Lindberg *et al.* 2003). Die Subtypen ER α und ER β werden je

nach Gewebe sowohl äquivalent als auch prädominant exprimiert. Im menschlichen Gastrointestinaltrakt wird z. B. eine Dominanz des ER β angenommen (Nilsson und Gustafsson 2011). So könnte, aufgrund der im Intestinum lokalisierten Synthese der Vitellogenine, für *C. elegans* ein möglicher Mechanismus zur Erklärung der anti-östrogenen Aktivität von Genistein in der VIT-Expression unterliegen. Vorausgesetzt ist hierbei jedoch die Annahme, dass in *C. elegans* eine dem ER β -funktionell entsprechende Isoform im Intestinum existent ist. Die Präsenz von ER β könnte die VIT-Antwort modulieren, indem es ER α unterdrückt. Zum einen könnte ER β die ER α -abhängige VIT-Transkription mittels Bildung von Heterodimeren mit ER α antagonisieren. Zum anderen könnte ER β eine erhöhte proteolytische Degradation von ER α aufgrund einer Co-Expression bedingen.

Einfluss anti-östrogener Effekte von Genistein auf die immunologische Stressantwort nach *P. luminescens*-Infektion

Wurde zusätzlich zur Infektion mit *P. luminescens* Genistein [100 μ M] inkubiert, konnte eine additive Verkürzung der Lebensspanne im Vergleich zur infizierten Kontrolle gemessen werden. Dies unterstreicht die anti-östrogene Wirkung von Genistein, die über die Senkung der Vitellogenin-Expression und der damit verbundenen verminderten Pathogen-Resistenz zu einer Verkürzung der Lebensspanne bei Behandlung mit *P. luminescens* führt. Wurden *P. luminescens* und Genistein behandelte Tiere zusätzlich mit *vit*-RNAi-Bakterien gefüttert, konnte eine additive Lebensverkürzung im Vergleich zu Tieren, die ausschließlich mit *P. luminescens* und Genistein behandelt wurden, beobachtet werden. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass Genistein zwar die VIT-Expression vermindert (auf 25 % der Kontrolle), jedoch nicht so effektiv wie ein *vit*-RNAi (auf \leq 15 % der Kontrolle). Jedoch lassen diese Befunde letztlich den Schluss zu, dass Genistein immunsuppressive Effekte hinsichtlich einer *P. luminescens*-Infektion aufweist.

Marik *et al.* (2011) konnten anhand verschiedener Genistein-Derivate eine Inhibierung der ER α -mRNA-Expression und eine erhöhte ER β /ER α -Ratio in Brustkrebszelllinien (MCF-7, 21PT und T47D) nachweisen. Die immunsuppressiven Wirkungen auf die Lebensspanne von Genistein könnten also dahingehend erklärbar sein, als dass die Applikation von Genistein eine verminderte Expression eines ER α -Homologs und eine vermehrte Expression eines

ER β -Homologs induziert. Dies würde zu einer verminderten ER α -Homolog-abhängigen *vit*-Expression und einem verminderten immunprotektiven Schutz führen.

5.2 Einfluss der Vitellogenine auf einen durch *Knock-down* der Matrixmetalloprotease ZMP-2 induzierten Stress

Matrixmetalloproteasen (MMPs) sind Zink-abhängige Proteasen der Proteinfamilie Metzinkine (Bode *et al.* 1993). In Säugetieren werden MMPs wesentliche Funktionen in Ab- und Umbau der Extrazellulären Matrix (ECM) zugesprochen. Neben ihrer Fähigkeit Bestandteile der ECM zu spalten und zu modifizieren, nehmen MMPs Funktionen in biologischen Prozessen wie Embryogenese, Organogenese und Wundheilung ein (Nagase und Woessner 1999, McCawley und Matrisian 2001). Störungen in den genannten Regulierungsmechanismen oder Induzierbarkeit von MMPs führen zu Krankheiten wie Arthritis, Nephritis, Fibrose, Atherosklerose oder Krebs in Vertebraten (Visse und Nagase, 2003). Essentiell für die katalytische Aktivität von MMPs ist ein mit dem Zn²⁺-Ion interagierendes Wassermolekül in der katalytischen Domäne. Aufgrund dieser Zn²⁺-Bindung werden die Matrixmetalloproteasen in *C. elegans* als Zink-Metalloproteinasen (ZMP) bezeichnet. Zwei der sechs für ZMP kodierenden Gene in *C. elegans* - *zmp-1* und *zmp-2* – sind, wie einleitend beschrieben (1.3.3), funktionell charakterisiert. ZMP-2 spielt in *C. elegans* eine essentielle Rolle beim Wachstum und bei der Entwicklung. Wird beispielsweise eine *zmp-2*-RNAi durchgeführt, führt dies zu einer verzögerten Entwicklung von Larve zum adulten Tier und zu Häutungsdefekten. Des Weiteren ist ZMP-2 wichtig bei der Fortbewegung und der Reproduktion, da Würmer mit *zmp-2*-*Knock-down* sowohl eine verminderte Bewegung als auch eine geringe Nachkommenschaft aufweisen. Neben der geringeren Reproduktivität bei *zmp-2* defizienten Hermaphroditen, zeigen die adulten Tiere eine zur Kontrolle signifikant verkürzte Lebensspanne (Altincicek *et al.* 2010).

***zmp-2*-Defizienz verkürzt die Lebensspanne**

Die unter *zmp-2*-RNAi beobachtete verkürzte Lebensspanne der Nematoden könnte aufgrund eines ineffizienten Abbaus und der Akkumulation extrazellulärer, oxidierter Lipoproteinaggregate oder Proteine eintreten. Tatsächlich sind MMPs für die *Remodelling*-

Prozesse in der ECM unerlässlich (Sternlicht und Werb 2001). Folgen mangelnder MMP-Aktivitäten ist eine generalisierte Gewebeerstörung, beispielsweise in Form von einer Fibrose. Letztere wird durch eine übermäßige Ablagerung von extrazellulärer Matrix charakterisiert und stellt pathologisch eine häufige Folge von chronischen Entzündungen dar. Hierfür ist die massive Expansion der extrazellulären Matrix verantwortlich, welche das Ergebnis unzureichender MMP-Aktivitäten ist (Davies 1992). Zellakkumulate verursachen somit in *C. elegans* möglicherweise in Form von Zellschrott Dysfunktionen und hiermit einhergehende Alterung und Krankheiten, welche letztlich das frühzeitige Sterben induzieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellte sich zunächst die Frage, ob eine *zmp-2*-RNAi, bedingt durch die vermehrte Akkumulation oxidierter Proteine und Lipoproteine Stress auf den Organismus ausübt. Daher wurde die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in *zmp-2*-RNAi behandelten Nematoden untersucht. Sowohl der Mitochondrien-selektive Farbstoff Mito Tracker Red als auch der H₂O₂-selektive Fluoreszenzfarbstoff Amplex Ultra Red wiesen auf eine intrazellulär und extrazellulär höhere ROS-Aktivität in *zmp-2* defizienten Nematoden hin.

Um die These vermehrter oxidativer Modifikationen – bedingt durch vermehrten ROS-Stress – zu unterstreichen, wurde die Analysemethode OxyBlot gewählt. Diese ergab, dass eine 2-fach erhöhte oxidative Schädigung von zellulären Proteinen vorliegt, wenn *zmp-2* mittels RNAi vermindert exprimiert wird. Die Bedeutung der oxidierten Proteinmodifikationen für die durch *zmp-2*-RNAi induzierte Lebenszeitverkürzung wird auch daraus ersichtlich, dass die Applikation von Ascorbinsäure [100 µM, 1 mM] diese vollständig aufhob. Das Auftreten oxidierter Lipoproteine induziert in Vertebraten ebenfalls Schädigungen, die am besten im Prozess der Atherosklerose charakterisiert sind. Hierbei führt die durch ein pro-inflammatorisches Milieu mit hohen Konzentrationen an ROS verursachte Oxidation von Lipoproteinen zur Bildung von Schaumzellen, die selbst wiederum ROS produzieren und an der Apoptose der Endothelzellen beteiligt sind (Lusis 2000, Virmani *et al.* 2000).

***vit*-RNAi kompensiert die verkürzte Lebensspanne *zmp-2* defizienter Tiere**

Die *zmp-2*-RNAi induzierte Lebenszeitverkürzung führte bei zusätzlichem *Knock-down* der Vitellogenine (*vit-2* – *vit-6*) zu einer vollständigen Regeneration der Lebensspanne. Sowohl

zmp-2 defiziente als auch, wie vorangegangen beschrieben, *vit-6* defiziente Nematoden weisen einen vermehrten ROS-Stress auf. Letzterer war ebenfalls in *vit + zmp-2* defizienten Nematoden erhöht. Dieser Befund erscheint zunächst überraschend, da deren Kombination zu einem Ausbleiben der Lebenszeitverkürzung führt und folglich eine verminderte ROS-Stressantwort erwarten ließ. Erklärbar ist dieser am besten mit der Akkumulation extrazellulärer oxidiertes Lipoproteinaggregate, die in Abwesenheit von Vitellogeninen nicht mehr internalisiert werden können. Wie oben diskutiert, entsteht in *zmp-2* defizienten Tieren vermehrter ROS-Stress, welcher vermutlich eine Lipoprotein-Oxidation bedingt. Vitellogenine binden Cholesterole und Lipide und transportieren die oxidativ veränderten Lipide, analog zu der Aufnahme oxidiertes LDL in Säugetieren, in die Zelle. Wenn diese Transportfunktion jedoch aufgrund eines *vit*-RNAi ausbleibt, liegen intrazellulär keine oxidierten Lipoproteinaggregate vor und haben so keinen negativen Einfluss auf die Lebensspanne. Aufgrund der intrazellulär sinkenden Spiegel oxidiertes Lipoproteine ist die Bedeutung der Vitellogenine als Transport-vermittelnde Proteine unter den Bedingungen eines *zmp-2*-RNAis scheinbar wichtiger als ihre Bedeutung als antioxidative Proteine. Dies wird durch einen *Knock-out* des Vitellogenin-Rezeptors RME-2 bestätigt. In der *rme-2*-Mutante blieb die Lebensverkürzung durch *zmp-2*-RNAi mit und ohne *vit-6*-RNAi aus. Zwar vermindert eine *zmp-2*-RNAi auch die VIT-Expression, aber der Effekt auf die verminderte VIT-Expression ist unter *vit*-RNAi stärker. Aufgrund der intrazellulär vermittelten Verkürzung der Lebensspanne wurde ein Einfluss des Steroid-Signalwegs postuliert, da die mittels Vitellogeninen transportierten, oxidativ veränderten Lipide intrazellulär als hormonale Signalmoleküle in den Steroid-Signalweg eingreifen könnten.

Einfluss der Vitellogenine in der Lebensspanne wird über den Steroid-Signalweg mit DAF-16-Interaktion vermittelt

Anhand konfokal-mikroskopischer Untersuchungen im selbst erstellten transgenen *C. elegans*-Stamm *zmp-2::gfp* konnte eine Gewebe-spezifische Expression von *zmp-2* beobachtet werden. Das Expressionsmuster in neuronalen Strukturen im Kopfbereich, in den Spermathecae und in der Hypodermis entspricht dem von *daf-9* (Gerisch *et al.* 2001, Jia *et al.* 2002). Darüber hinaus konnten Wüstner *et al.* (2010) durch DHE-markierte Nematoden nachweisen, dass die Anreicherung von Sterolen nicht diffus erfolgt, sondern punktuell in

Neuronen des Kopfes, in Zellen der exkretorischen Drüse, in Spermien und der Spermatheca, in Embryonen, sowie in membran-assoziierten Vesikeln der Oozyten, also insgesamt in Geweben, in denen DAF-9 und ZMP-2 exprimiert werden. Diese Co-Lokalisation deutet auf eine mögliche Interaktion und somit auf einen Einfluss des Steroid-Signalwegs hin.

Bei zeitgleicher Inkubation von *vit*- und *zmp-2*-RNAi-Bakterien blieb weitergehend der *vit*-RNAi-vermittelte Ausgleich der Lebensspanne in den *daf-9*- und *daf-12*-Mutanten aus. Diese aufgrund dieser Befunde implizierte DAF-9- und DAF-12-Protektion gegenüber ROS-Stress belegt, dass trotz einer verminderten VIT-Expression eine Restaktivität des Cholesterol-Transports vorhanden sein muss, welche den Steroid-Signalweg aktiviert. Weiterhin ergaben die Untersuchungen der Lebensspanne, dass ein *Knock-down* und *-out* von *daf-16* zu einem Ausbleiben der *zmp-2*-RNAi induzierten Lebenszeitverkürzung führte. Dies spricht für die zentrale Rolle von DAF-16 bei der *zmp-2*-RNAi vermittelten Lebenszeitverkürzung, welche nachweislich mit DAF-9 und DAF-12 assoziiert ist, jedoch im Hinblick auf eine *P. luminescens*-Infektion eine konträre Wirkung besitzt. Bei einer *P. luminescens*-Infektion führt eine *daf-16*-Deletion zu einer Lebenszeitverkürzung, unter *zmp-2*-RNAi bleibt diese jedoch aus. Ist DAF-16 hingegen vorhanden, zeigte sich eine DAF-9- und DAF-12-abhängige Reduktion der Lebensspanne unter *zmp-2*-RNAi, weshalb DAF-9 und DAF-12 *down-stream* von DAF-16 agieren. Darüber hinaus wird auch unter *zmp-2*-RNAi deutlich, dass die spezifische Stressantwort der Vitellogenine eine cytosolische DAF-16-Lokalisation zu deren Expression benötigt. Dies zeigte sich aufgrund der nahezu vollständigen nukleären DAF-16-Lokalisation und zeitgleich verminderten *vit*-Expression unter *zmp-2*-Defizienz, was im Hinblick auf die steroidale Stressantwort die Lebenszeitverkürzung bedingt. Hieraus lässt sich schließen, dass zum einen DAF-16 vorhanden und zum anderen im Kern lokalisiert sein muss, um im Sinne der Lebenszeitverkürzung wirksam zu sein.

Die Befunde sind insofern bemerkenswert, als zahlreiche Studien belegen, dass eine nukleäre DAF-16-abhängige Transkription antioxidativer Gene, welche u. a. für SOD-3 kodieren, Langlebigkeit verursacht. Jedoch werden die Befunde durch die von Jeong *et al.* (2010) durchgeführten Untersuchungen unterstrichen. Hierbei zeigte sich, dass die durch Cholesterol-Defizienz induzierte Lebenszeitverkürzung eine Unabhängigkeit von der *sod-3*-Transkription besitzt und auf vermehrten mitochondrialen ROS-Stress zurückzuführen ist.

Die Bedeutung nukleärer DAF-16 für die durch *zmp-2*-RNAi verminderte Lebensspanne in *C. elegans* wird dadurch verifiziert, als dass der *Knock-down* der DAF-16-Cofaktoren, *sir-2.1*, *ftt-2* oder *par-5* ebenfalls die Lebenszeitverkürzung verhinderte. Damit ist davon auszugehen, dass die transkriptionelle Aktivität von DAF-16 unter Bedingungen eines *zmp-2*-RNAi schädigend wirkt. Auffallend ist weiterhin, dass PAR-5, FTT-2 und SIR-2.1 zusammen mit DAF-16 v. a. in Lebensspannen regulierenden Geweben wie dem Intestinum (Wolkow *et al.* 2000, Libina *et al.* 2003) und Kopfneuronen (Wang *et al.* 2006) co-exprimiert werden. Also in Geweben, die als entscheidend für den Einfluss der Vitellogenine und des Cholesterols auf die Lebensspanne unter *zmp-2*-RNAi diskutiert wurden.

Ausgehend von einer stabilisierten VIT-Expression durch cytosolisches DAF-16, bedeutet die DAF-16-Translokation unter *zmp-2*-RNAi eine typische Antwort auf zellulären Stress, allerdings auf Kosten der Präsenz von Vitellogeninen. Im Falle der *P. luminescens*-Exposition scheint dies kompensiert zu werden, sodass die cytosolische Translokation von DAF-16 final mit erhöhter Stressresistenz auf intestinaler Ebene assoziiert ist. Obwohl *zmp-2*-RNAi, genauso wie *P. luminescens*, erhöhten Stress für den Organismus bedeutet, findet bei ersteren keine Lokalisierung von DAF-16 im Cytosol statt. Für *C. elegans* ist diese Reaktion jedoch Lebenszeitverlängernd. Erklärbar wird dies durch den reduzierten Vitellogenin-abhängigen Transport, der allerdings ohne *vit*-RNAi offbar noch ausreichend ist, um die Lebensspanne zu reduzieren. Umgekehrt wird auch ein reduzierter Cholesteroltransport unter *zmp-2*-RNAi ab einer bestimmten Grenze limitierend für die Lebensspanne, da aus Cholesterol die DAF-9-Substrate gebildet werden, die Voraussetzung für die Aktivierung von DAF-12 sind. Wie graduell diese Grenzen der Cholesterol-Versorgung sein können, zeigt sich anhand der nicht wieder hergestellte Lebensspanne durch *vit*-RNAi unter *zmp-2*-RNAi, wenn vermehrt Cholesterol appliziert wird. Hier scheint der Transport oxidierter Lipoproteine die Lebensspanne dann deutlicher zu beeinflussen (Lebensspanne verkürzt), als die Aktivierung von DAF-9 und DAF-12. Dies wird nicht nur dadurch verdeutlicht, dass in *vit*- + *zmp-2*-RNAi behandelten Nematoden keine Regeneration der verkürzten Lebensspanne mehr zu detektieren ist. Im Gegenteil, die *vit* und *zmp-2* defizienten Nematoden lebten nach Exposition erhöhter Cholesterol-Konzentrationen zusätzlich kürzer als *zmp-2* defiziente Nematoden. Wie bereits zuvor diskutiert, kann bei diesen stark erhöhten Cholesterol-Konzentrationen der Vorgang einer Diffusion und damit eine Vitellogenin-unabhängige Cholesterol-Distribution nicht ausgeschlossen werden. Folglich könnten trotz fehlender

Transporter erhöhter Cholesterol-Mengen in die Zelle gelangen, welche dort möglicherweise toxische Prozesse initiieren bzw. werden vermehrt oxidierte Lipoproteine aufgenommen, die die verkürzte Lebensspanne bedingen.

Die graduelle Grenze der Cholesterol-Versorgung spiegelt sich unter Cholesterol-Defizienz wieder. Wenn kein bzw. marginal Cholesterol verfügbar ist, tritt der *vit*-RNAi induzierte Ausgleich der verkürzten Lebensspanne *zmp-2*-RNAi behandelter Nematoden ebenfalls nicht mehr ein. Entsprechend der vorangegangenen erstellten Hypothese, werden unter *vit*-RNAi genügend dafachronischer Säuren für die Aktivierung von DAF-12 gebildet, gleichzeitig werden vermindert oxidierte Lipoproteine transportiert. Jedoch scheint die Cholesterol-Anlieferung unter *vit*-RNAi und zeitgleicher Cholesterol-Depletion zur Bildung dafachronischer Säuren nicht mehr auszureichen. Dieser Befund lässt sich, analog zu den immunologischen *P. luminescens*-Untersuchungen, dahingehend erklären, dass bei geringen Cholesterolgaben zunächst essentielle physiologische Prozesse wie z. B. der Cholesterol-Einbau in die Zellmembranen vonstatten geht, bevor die Sterol-vermittelte Stressantwort ausreichend mit Liganden versorgt wird.

Beurteilung der verminderten *vit*-Expression durch *zmp-2*-Defizienz

Eine *zmp-2*-RNAi induzierte eine nukleäre DAF-16-Lokalisation, welche eine verminderte *vit*-Expression bedingt (Murphy *et al.* 2003, Halaschek-Wiener *et al.* 2005, McElwee *et al.* 2003, Dong *et al.* 2007). Letztere konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene bestätigt werden. Jedoch gilt an dieser Stelle zu beachten, dass nicht nur eine DAF-16-Translokation in den Nukleus aufgrund verminderter steroidaler Hormonen eine verminderte *vit*-Expression induziert, sondern auch möglicherweise Signale der Keimbahn die *vit*-Expression beeinflussen können. DePina *et al.* (2011) konnten belegen, dass ein Spermien-abhängiges Signal, das die Existenz Keimbahn-abhängiger hormoneller Regulatoren impliziert, die *vit*-Expression in *C. elegans* reguliert. Die Autoren postulieren eine Korrelation der Transkription der *vit*-Gene mit der reproduktiven Entwicklung (DePina *et al.* 2011). Wie in den bereits veröffentlichten Vorversuchen zu dieser Arbeit (Altincicek *et al.* 2010) konnte sowohl eine verminderte Nachkommenschaft als auch eine verzögerte Entwicklung *zmp-2* defizienter Tiere beschrieben werden. Phänotypische Analysen dieser Arbeit am *zmp-2::gfp*-Stamm verdeutlichen eine Rolle von ZMP-2 in den reproduktiven Geweben wie der Spermatheca.

DePina *et al.* (2011) wiesen anhand von Mutanten mit reproduktiven Defekten nach, dass die *vit-2*- und *vit-5*-mRNA-Expression von Signalen, die von der Spermien- jedoch nicht von der Oozyten-Produktion abhängen, reguliert wird. So waren in *fem-1*-(hc17)-Hermaphroditen, welche keine Spermien produzieren (Doniach und Hodgkin 1984), die *vit-2*- und *vit-5*-mRNA-Level signifikant reduziert. Wurden diese Mutanten mit dem Wildtyp gekreuzt, war eine Spermien-Produktion wieder möglich und die *vit-2*- und *vit-5*-mRNA-Level wieder auf dem Ausgangsniveau. Diese Zusammenhänge konnten in *fem-3*-(q20gt)-Tieren, welche Spermien produzieren aber keine Oozyten (maskuline Keimbahn), nicht gezeigt werden, weshalb von hormonellen Signalen der Keimbahn, die mit der Spermien-Produktion assoziiert sind, ausgegangen wird (DePina *et al.* 2011). Da auch in *zmp-2*-RNAi behandelten Tieren von einer defekten Befruchtung durch Spermien postuliert wird (Altincicek *et al.* 2010) und *zmp-2* in den Spermathecae exprimiert wird, könnte die verminderte *vit*-Expression auch in dieser Arbeit als abhängig von hormonellen Keimbahn-Signalen vermutet werden. Dass die Signale der Vitellogenese mit der reproduktiven Entwicklung des Nematoden assoziiert sind, wird weiterhin durch die Tatsache unterstrichen, dass Vitellogenine erst ab dem L4-Larvenstadium exprimiert werden, in welchen auch die Ausbildung der Spermathecae und Gonaden startet (Corsi 2006). Jedoch stehen diese hormonellen Signale in Abhängigkeit zu DAF-16, da in *zmp-2* defizienten Tieren DAF-16 nukleär vorliegt. So könnten die Keimbahn-Signale eine nukleäre DAF-16-Lokalisation bedingen, welche eine verminderte intestinale *vit*-Expression induziert und somit unter *zmp-2*-RNAi, aufgrund des verminderten Cholesterol-Transports und erhöhten ROS-Stresses, eine verminderte Stressresistenz und Lebensspanne assoziiert werden kann.

Weiterhin könnte auch der verminderte Transport apolarer Substanzen wie Cholesterol, Lipide oder PUFAs durch Vitellogenine eine Ursache für die reduzierte Nachkommenschaft in *zmp-2* defizienten Tieren sein. Wie wichtig der Transport von Signal-gebenden PUFAs für die Reproduktion ist, wird durch die Studie von Kubagawa *et al.* (2006) deutlich. Die Autoren konnten nachweisen, dass PUFAs in den Oozyten als Signal-Vorstufen die Spermien-Rekrutierung zur Spermatheca beeinflussen. PUFAs sind Vorstufen von Eicosanoid-Signalmolekülen, welche in Oozyten die Sperma-Motilität innerhalb des Uterus kontrollieren. So kann in *rme-2*-Mutanten die verminderte Nachkommenschaft über Defekte in der Spermien-Motilität erklärt werden (Kubagawa *et al.* 2006). In diesem Zusammenhang könnte zum einen eine *zmp-2*-RNAi Defekte in Geweben verursachen, welche mit einer

verminderten Spermien-Motilität einhergehen. Zum anderen könnte aufgrund der reduzierten *vit*-Expression der PUFA-Transport zu den Oozyten *zmp-2* defizienter Tiere beeinträchtigt sein. Beides ist jedoch in Abhängigkeit zum Steroid-Signalweg zu setzen, welcher die Lebensspanne und die Stressresistenz reguliert.

Transkriptionaler Einfluss einer 17 β -Östradiol-Applikation

Neben der Veränderung der Cholesterol-Konzentration im Medium, ist die Aufnahme oxidierter Lipoproteine natürlich auch durch die VIT-Expression modifizierbar. Die Applikation von 17 β -Östradiol erhöhte die VIT-Expression signifikant, hatte jedoch keine Lebenszeitverkürzenden Einfluss unter *zmp-2*-RNAi. Da eine *vit*-RNAi die verkürzte Lebensspanne *zmp-2* defizienter Nematoden ausgleicht, wäre hier zu erwarten gewesen, dass eine durch 17 β -Östradiol-induzierte, vermehrte *vit*-Expression die Lebensspanne entweder zusätzlich in *zmp-2*-RNAi behandelten Tieren verkürzt oder zumindest keinen Einfluss auf die Lebensspanne besitzt. Da dies nicht eintrat, liegt die Vermutung nahe, dass die Kompensation nach 17 β -Östradiol-Inkubation auf antioxidativen Wirkungen beruht. Östrogene und Östradiol-Benzoate stimulieren die Aktivität von detoxifizierenden Enzymen wie Katalase (Singh und Pandey 1998) oder Glutathionperoxidase (Tagawa *et al.* 1997, Massafra *et al.* 1996) und inhibieren die Superoxid-Anion-Bildung (Ayres *et al.* 1998) in Endothelzellen. Da 17 β -Östradiol zu einer stark erhöhten *vit*-Expression führt, könnte der antioxidative Schutz der Vitellogenine überwiegen und die Transportfunktion oxidierter Lipide eine untergeordnete Rolle spielen.

Transkriptionaler Einfluss des Phytoöstrogens Genistein

Unterstützt werden kann dieser Versuch Vitellogenine in ihrer Expression zu verändern durch Genistein, das, wie zuvor beschrieben, in *C. elegans* in einer Konzentration von 100 μ M anti-östrogene Eigenschaften aufwies. Allerdings gelang es nicht im Hinblick auf die Wiederherstellung der Lebensspanne unter *zmp-2*-RNAi so starke Effekte zu erzielen wie durch *vit*-RNAi. Diese Ergebnisse implizieren, dass Genistein vermutlich, wie bereits zuvor diskutiert, mittels Aktivierung von ER β die *vit*-Expression vermindert, womit weniger oxidierte Lipoproteinaggregate in Form von Zellschrott intrazellulär akkumulieren. Jedoch

vermindert die Genistein-Applikation die *vit*-Expression nicht so effektiv wie ein *vit*-RNAi. Dies äußert sich in dem partiellen und nicht vollständigen Ausgleich der Lebensspanne *zmp-2*-RNAi und Genistein behandelter Nematoden.

ZUSAMMENFASSUNG

Vitellogenine (VITs) sind eine Klasse Cholesterol-transportierender Eidotter-Proteine, deren Homolog im Menschen das Apolipoprotein B-100 ist und die im Zusammenhang mit der Langlebigkeit diskutiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus verwendet, um Einflüsse der Vitellogenine auf Stressresistenz und Lebensspanne zu untersuchen. Als Stressfaktoren wurden die Exposition gegenüber dem Nematoden-pathogenen Bakterium *Photorhabdus luminescens*, sowie ein *Knock-down* der Zinkmetalloprotease-2 (ZMP-2) verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Stressoren die Lebensspanne von *C. elegans* signifikant reduzierten. Eine durch RNA-Interferenz (RNAi) bewirkte verminderte Expression der VITs erhöhte hierbei die Sensitivität gegenüber *P. luminescens*. Während die meisten für die angeborene Immunität des Nematoden wichtigen Signalwege als unbedeutend für eine Resistenz gegenüber *P. luminescens* beschrieben werden konnten, erwies sich der im Insulin-IGF-Signalweg lokalisierte Transkriptionsfaktor DAF-16 und seine cytosolische Lokalisation auf intestinaler Ebene als essentiell für den Vitellogenin-vermittelten Schutz. Darüber hinaus konnte erstmals ein Einfluss des durch Cholesterolmetabolite aktivierten Steroid-Signalweges identifiziert werden, indem seine Mitglieder DAF-9 und DAF-12 als entscheidend für die Vitellogenin-verursachte Lebenszeitverlängerung in Gegenwart der pathogenen Bakterien charakterisiert wurden. Dem immun-stimulatorischen Einfluss des Steroid-Signalweges entsprechend, führte ein Cholesterol-Mangel zur Reduktion der Lebensspanne unter *P. luminescens*-Exposition. Die erhöhte Gabe von Cholesterol bedingte zwar ebenfalls eine reduzierte Lebensspanne, dies war jedoch auf die unter diesen Bedingungen deutlich verminderte Expression der VITs zurückzuführen. Aufgrund der nachgewiesenen starken Östrogen-Responsivität der VIT Expression verursachte 17 β -Östradiol eine erhöhte Resistenz gegenüber *P. luminescens*, die unter *vit*-RNAi nicht mehr beobachtet werden konnte. Eine Beteiligung des NHR-14, einem als Östrogen-Rezeptor postulierten nukleären Hormonrezeptors in *C. elegans*, an den durch 17 β -Östradiol induzierten protektiven Mechanismen konnte ausgeschlossen werden. Das Phytoöstrogen Genistein verursachte im Gegensatz zum 17 β -Östradiol eine Verkürzung der Lebensdauer in Gegenwart von *P. luminescens*, die mit reduzierter Expression der VITs in Verbindung zu bringen war und anti-östrogene Wirkungen des Genisteins in *C. elegans* belegt.

Im Hinblick auf den durch *zmp-2*-RNAi verursachten Stress erwiesen sich die VITs interessanterweise gegenteilig wirksam als in bakteriell gestressten Nematoden. Ein *Knock-down* der VITs führte zum vollständigen Ausbleiben der durch *zmp-2*-RNAi bewirkten Lebenszeitverkürzung. Nachgewiesen werden konnte eine erhöhte Akkumulation oxidativ veränderter Proteine in *C. elegans*, die darauf schließen lässt, dass sich unter *zmp-2*-RNAi extrazellulär oxidierte Lipoproteinaggregate ansammeln, die in Abwesenheit von VITs nicht mehr internalisiert werden können. Bestätigt wurde diese Vermutung in der *rme-2*-Mutante, die einen Defekt der Rezeptor-vermittelten Endozytose von Vitellogeninen aufweist und unter *zmp-2*-Defizienz keine Lebenszeitverkürzung zeigte. Allerdings erwies sich eine marginale Cholesterolverorgung in Abhängigkeit des Steroid-Signalweges als Lebensspanne-verlängernd, was durch eine Verkürzung der Lebensspanne durch Cholesterolmangel unter *zmp-2*-RNAi belegt werden konnte. DAF-16 konnte unter *zmp-2*-Defizienz erstmals auch als ein die Lebensspanne vermindерnder Faktor identifiziert werden, dessen Wirkungen über eine Rückkopplungshemmung der die Lebensspanne erhöhenden Faktoren DAF-9 und DAF-12 erklärbar wurden. Während Genistein, über seine anti-östrogenen Wirkungen, die Lebensspanne in Nematoden mit verminderter ZMP-2 Funktion erhöhte, ließen sich die Lebenszeit-verlängernden Aktivitäten des 17 β -Östradiols unter diesen Bedingungen nicht über die beeinflusste Funktionalität der VITs erklären. Die Schutzwirkungen des Östrogens in *zmp-2*-RNAi behandelten Würmern schien vielmehr durch dessen antioxidativen Wirkungen und einer damit einhergehenden verminderten Entstehung oxidativ modifizierter Lipoproteinaggregate ableitbar.

Zusammenfassend lässt sich eine erstmals nachgewiesene, bedeutsame Rolle der VITs im Rahmen von Resistenzmechanismen gegenüber unterschiedlichen Stressoren beschreiben. Hierbei sind DAF-9 und DAF-12, Mitglieder des Steroid-Signalwegs, entscheidend für eine Lebensverlängerung, während DAF-16 in Abhängigkeit des Stressors divergente Effekte erzielt. Die Aktivierung von Schutzmechanismen gegenüber *P. luminescens* bedingen VITs, indem sie über den Steroid-Signalweg ihre eigene Synthese veranlassen und somit verstärkt antioxidativ wirksam werden können. Liegen allerdings extrazellulär vermehrt oxidierte Lipoproteinaggregate vor, wie unter funktioneller Einschränkung von ZMP-2, wirken VITs über den Transport der oxidierten Verbindungen Lebenszeit-verkürzend.

SUMMARY

Vitellogenins (VITs) are a class of cholesterol transporting yolk proteins, which are homolog to human apolipoprotein B-100, and are discussed in the context of longevity. In the present study, the nematode *Caenorhabditis elegans* was used as model organism to investigate the influence of VITs on stress resistance and lifespan, whereby exposure to nematodic bacterium *Photorhabdus luminescens* and knockdown of zinc metalloproteinase-2 (ZMP-2) were used as stress factors.

It could be shown that both stressors significantly reduce the lifespan of *C. elegans*. RNA-interference (RNAi) induced down-regulation of VIT resulted in enhanced sensitivity against *P. luminescens*. However, most key signaling pathways of the innate immunity in *C. elegans* only played a minor role regarding resistance against *P. luminescens*. Nevertheless, the transcription factor DAF-16, which is located in the insulin-IGF-signaling pathway, and its cytosolic localization in the intestine were shown to be essential for the VIT mediated protection. Furthermore, DAF-9 and DAF-12 were crucial for the VIT induced lifespan prolongation in presence of the pathogenic bacteria, presenting an influence of cholesterol metabolite activated steroid signaling for the first time. In accordance to the immunostimulatory influence of steroid signaling a depletion of cholesterol induced a reduction in lifespan during *P. luminescens* infection. However, application of elevated cholesterol dosages also caused reduced stress resistance against *P. luminescens*. This might be due to the observed reduction in VIT expression under these conditions. In concordance with the proven estrogen responsiveness of VITs, increased VIT expression by 17 β -estradiol enhanced resistance against *P. luminescens*. This increased stress resistance only occurred in presence of VIT, because it was no longer observable during *vit*-RNAi. An influence of the nuclear hormone receptor NHR-14, a postulated estrogen receptor in *C. elegans*, could be excluded in the estrogenic protective mechanisms. In contrast, phytoestrogen genistein caused a reduced lifespan in *P. luminescens* infected animals, which was associated with decreased VIT expression, thus underlining the anti-estrogenic mode of action of genistein in *C. elegans*.

Interestingly, with regard to the *zmp-2* deficiency induced stress the VITs evidenced to be contrary to the bacterial infected nematodes. Knockdown of VITs compensated for the

zmp-2-RNAi induced lifespan reduction, demonstrating a variability of the VIT functions depending on the stressor. Based on our observations, an increased accumulation of oxidative modified proteins occurred in *C. elegans*. Oxidized lipoprotein aggregates accumulate extracellular during *zmp-2*-RNAi, which are not taken up in absence of VITs. These observations were confirmed with *rme-2*-mutants, which exhibit a defect in the receptor-mediated endocytosis and did not show a lifespan reduction by *zmp-2* deficiency. However, marginal cholesterol maintenance is essential for lifespan prolongation considering steroid signalling, which was shown by a reduced lifespan of animals lacking cholesterol and *zmp-2*. For the first time DAF-16 could be identified as a lifespan reducing factor during *zmp-2*-RNAi. Its effectiveness became explainable by a feedback inhibition of the two lifespan increasing factors DAF-9 and DAF-12. Due to its anti-estrogenic effects genistein increased the lifespan in nematodes with reduced ZMP-2 functions. On the contrary, the lifespan-prolonging activities of 17 β -estradiol in *zmp-2* deficient nematodes could not be explained by functionality of VITs. The protective effect of the estrogen in *zmp-2*-RNAi fed worms seemed to be explicable by its antioxidative impact and the associated reduced incidence of oxidative modified lipoprotein aggregates.

In summary, for the first time an important role of VITs in stress resistance against different stressors could be described. In this context, members of steroid signalling - DAF-9 and DAF-12 - are of great importance in lifespan prolongation, since DAF-16 achieves divergent effects depending on the stressors. VITs are able to enhance activation of protection mechanisms against *P. luminescens* by inducing its own synthesis and therefore acting as antioxidants. However, in presence of increased extracellular oxidized lipoprotein aggregates, as during ZMP-2 deficiency, VITs induce a shortened lifespan through the transport of oxidized compounds.

6 LITERATUR

- Aballay A, Drenkard E, Hilbun LR, Ausubel FM (2003) *Caenorhabditis elegans* innate immune response triggered by Salmonella enterica requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway. *Curr Biol* **13**: 47–52.
- Adachi H, Fujiwara Y, Ishii N (1998) Effects of Oxygen on Protein Carbonyl and Aging in *Caenorhabditis elegans* Mutants With Long (age-1) and Short (mev-1) Life Spans *J. Gerontology* **53A**:B240-244.
- Albert PS, Riddle DL (1983) Developmental alterations in sensory neuroanatomy of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva. *J. Comp. Neurol.* **219**: 246 – 481.
- Adlercreutz H, Van der Wildt J, Kinzel J, Attalla H, Wähälä K, Mäkelä T, Hase T, Fotisis T (1995) Lignan and isoflavonoid conjugates in human urine. *J Steroid BiochemMolBiol* **52(1)**: 97-103.
- Alper S, McBride SJ, Lackford B, Freedman JH, Schwartz DA (2007) Specificity and complexity of the *Caenorhabditis elegans* innate immune response. *Mol Cell Biol.***27**:5544–5553.
- Altincicek B, Vilcinskas A (2008) Identification of a lepidopteran matrix metalloproteinase with dual roles in metamorphosis and innate immunity. *Dev Comp Immunol.* **32(4)**: 400-409.
- Altincicek B, Fischer M, Fischer M, Lüersen K, Boll M, Wenzel U, Vilcinskas A (2010) Role of matrix metalloproteinase ZMP-2 in pathogen resistance and development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Comp Immunol.* **34(11)**: 1160-1169.
- Altun ZF, Hall DH. Handbook of *C. elegans* Anatomy. WormAtlas (2010) <http://www.wormatlas.org/herm-aphrodite/introduction/Introframeset.html>
- Amdam GV, Norberg K, Hagen A, Omholt SW (2003) Social exploitation of vitellogenin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 1799–1802.
- Amdam GV, Hartfelder K, Norberg K, Hagen A, Omholt SW (2004) Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *J Econ Entomol.* **97(3)**: 741-747.
- Amdam GV und Omholt SW (2002) The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *J. Theor.Biol.* **216**: 209–228.
- Antebi A, Yeh WH, Tait D, Hedgecock EM, Riddle DL (2000) *daf-12* encodes a nuclear receptor that regulates the dauer diapause and developmental age in *C. elegans*. *Genes Dev.* **14**: 1512–1527.
- Arimura G, Tashiro K, Kuhara S, Nishioka T, Ozawa R, Takabayashi J (2000) Gene responses in bean leaves induced by herbivory and by herbivore-induced volatiles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**: 305–310.
- Arnberg AC, Meijlink FCPW, Mulder J, Van Bruggen EFJ, Gruber M, Ab G (1981) *Nucleic Acids Res.* **9**: 3271-3286.
- Arukwe A und Goksoyr A (2003) Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comp Hepatol* **2**: 4.
- Ayres S, Abplanalp W, Liu JH and Ravi Subblah MT (1998) Mechanisms involved in the protective effect of estradiol- 17b on lipid peroxidation and DNA damage. *American Journal of Physiology* **274**: E1002–8.

- Azadbakht L, Kimiagar M, Mehrabi Y, Esmailzadeh A, Padyab M, Hu FB, Willett WC (2007) Soy inclusion in the diet improves features of the metabolic syndrome: a randomized crossover study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **85**: 735–41.
- Baker ME (1988) Is vitellogenin an ancestor of apolipoprotein B-100 of human lowdensity lipoprotein and human lipoprotein lipase? *Biochem J*. **255(3)**: 1057-1060.
- Bakhit RM, Klein BP, Essex-Sorlie D, Ham JO, Erdman JW Jr, Potter SM (1994) Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. *J Nutr* **124**:213–22.
- Bargmann CI (2001) High-throughput reverse genetics: RNAi screens in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol*. **2(2)**: REVIEWS 1005.1-3.
- Barsyte D, Lovejoy DA, Lithgow GJ (2001) Longevity and heavy metal resistance in *daf-2* and *age-1* long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J*. **15(3)**:627-34.
- Bartolomé N, Arteta B, Martínez MJ, Chico Y, Ochoa B (2008) Kupffer cell products and interleukin 1 β directly promote VLDL secretion and apoB mRNA up-regulation in rodent hepatocytes. *Innate Immunity* **14 (4)**: 255-266.
- Basset P, Okada A, Chenard MP, Kannan R, Stoll I, Anglard P, Bellocq J-P, Rio M-C (1997) Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: Therapeutic implications. *Matrix Biol*. **15**: 535-541.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2007) Stryer Biochemie, 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Oxford, Heidelberg, Berlin.
- Berneis K (2004) Kleine LDL-Partikel: Gefahr fürs Herz? Les petites particules de LDL: un danger pour le coeur? *Med Forum* **4**:1266–1268 1266.
- Blumenthal T und Zucker-Aprison E (1987) Evolution and regulation of vitellogenin genes. In: Connor, J.D.O. (Ed.), *Molecular Biology of Invertebrate Development*. Alan R. Liss, New York, pp. 3–19.
- Blumenthal T, Squire M, Kirtland S, Cane J, Donegan J, Spieth J, Sharrock WJ (1984) *J. Mol. Biol.* **174**:1-18.
- Bode W, Gomis-Rüth FW, Stöckler W, (1993) Astacins, serralyisins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins”. *FEBS Letters*, **331**: 134-140.
- Borgonie G, Claeys M, De Waele D, Coomans A (1995) Ultrastructure of the intestine of the bacteriophagous nematodes *CAENORHABDITIS ELEGANS*, *PANAGROLAIMUS SUPERBUS* and *ACROBELOIDES MAXIMUS* (Nematoda: Rhabditida). *Fund Appl Nematol*. **18**: 123-133.
- Böse J, Gruber AD, Helming L, Schiebe S, Wegener I, Hafner M, Beales M, Köntgen F, Lengeling A (2004) The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J Biol* **3(4)**: 15.
- Borradaile NM, de Dreu LE, Wilcox LJ, Edwards JY, Huff MW (2002) Soya phytoestrogens, genistein and daidzein, decrease apolipoprotein B secretion from HepG2 cells through multiple mechanisms. *Biochem J*. **366**:531-9.
- Bossinger O, Schierenberg E (1992) Cell-cell communication in the embryo of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **151**:401-409.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**: 248-254.
- Brandt BW, Zwaan BJ, Beekman M, Westendorp RG, Slagboom PE (2005) Shuttling between species for pathways of lifespan regulation: a central role for the vitellogenin gene family? *Bioessays*. **27(3)**:339-46.

- Branicky R, Desjardins D, Liu JL, Hekimi S (2010) Lipid transport and signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn.* **239(5)**:1365-77.
- Brennan MD, Weiner AJ, Goralski TJ, Mahowald AP (1982) The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **89**: 225–236.
- Brenner S (1973) The genetics of behaviour. *Br Med Bull* **29**: 269-71.
- Brenner S (1974) The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77(1)**: 71-94.
- Brock ML, Shapiro DJ (1983) Estrogen stabilizes vitellogenin mRNA against cytoplasmic degradation. *Cell.* **34(1)**:207-14.
- Brown M und Goldstein J (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**: 331– 340.
- Brown MS und Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* **232**: 34–47.
- Burendahl S, Danciulescu C, Nilsson L (2009) Ligand unbinding from the estrogen receptor: A computational study of pathways and ligand specificity. *Proteins* **77(4)**:842-56.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263(5148)**: 802-805.
- Chávez V, Mohri-Shiomi A, Maadani A, Vega LA, Garsin D (2007) Oxidative stress enzymes are required for DAF-16-mediated immunity due to generation of reactive oxygen species by *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **176(3)**:1567-77.
- Chen JS, Cho WL, Raikhel AS (1994) Analysis of mosquito vitellogenin cDNA similarity with vertebrate phosphovitins and arthropod serum proteins. *Journal of Molecular Biology* **237**: 641–647.
- Chen JS, Sappington TW, Raikhel AS (1997) Extensive sequence conservation among insect, nematode and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry. *Journal of Molecular Evolution* **44**: 440–451.
- Chen S-H, Habib G, Yang C-Y, Gu Z-W, Lee BR, Weng S-A, Silberman SR, Cai S-J, Deslypere JP, Rosseneu M, Gorro AM, Li W-H Jr, Chan L (1987) Apolipoprotein B-48 Is the Product of a Messenger RNA with an Organ-Specific In-Frame Stop Codon. *Science* **238**: 363-366.
- Cheong MC, Na K, Kim H, Jeong SK, Joo HJ, Chitwood DJ, Paik YK (2011) A Potential Biochemical Mechanism Underlying the Influence of Sterol Deprivation Stress on *Caenorhabditis elegans* Longevity. *J Biol Chem.* **286(9)**:7248-56.
- Chitwood DJ (1999) Biochemistry and function of nematode steroids. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **34**: 273–284.
- Choi B-K, Chitwood DJ, Paik Y-K (2003) Proteomic Changes during Disturbance of Cholesterol Metabolism by Azacoprostan Treatment in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular & Cellular Proteomics* **2**:1086–1095.
- Cliche TA, Ensign JC (2003) For the Insect Pathogen *Photorhabdus luminescens*, Which End of a Nematode Is Out? *Appl Environ Microbiol.* **69(4)**: 1890-1897.
- Cladaras C, Hadzopoulou-Cladaras M, Nolte RT, Atkinson D, Zannis VI (1986) The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms. *EMBO J* **5**: 3495-3507.
- Clarke DJ (2008) *Photorhabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. *Cell Microbiol.* **10(11)**: 2159-67.
- Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69(8)**: 2110-2114.
- Corsi AK (2006) A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*. *Anal Biochem.* **359(1)**: 1-17.

- Couillault C, Pujol N, Reboul J, Sabatier L, Guichou JF, Kohara Y, Ewbank JJ (2004) TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat. Immunol.* **5**: 488–494.
- Couse JF und Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* **20**: 358–417.
- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* **295**: 2387–2392.
- Cox B, Kislinger T, Emili A (2005) Integrating gene and protein expression data: pattern analysis and profile mining. *Methods* **35(3)**: 303–14.
- Cross AR und Segal AW (2004) The NADPH oxidase of professional phagocytes: prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1657**: 1–22.
- Custodia N, Won SJ, Novillo A, Wieland M, Li C, Callard IP (2001) *Caenorhabditis elegans* as an environmental monitor using DNA microarray analysis. *Ann N Y Acad Sci.* **948**: 32–42.
- Davies M, Martin J, Thomas GJ, Lovett DH (1992) Proteinases and glomerular matrix turnover. *Kidney Int.* **41(3)**: 671–678.
- DePina AS, Iser WB, Park SS, Maudsley S, Wilson MA, Wolkow CA (2011) Regulation of *Caenorhabditis elegans* vitellogenesis by DAF-2/IIS through separable transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *BMC Physiol.* **11**: 11.
- Descovich GC, Ceredi C, Gaddi A, Benassi MS, Mannino G, Colombo L, Cattin L, Fontana G, Senin U, Mannarino E, Caruzzo C, Bertelli E, Fragiaco C, Nosedà G, Sirtori M, Sirtori CR (1980) Multicentre study of soybean protein diet for outpatient hypercholesterolaemic patients. *Lancet* **2**:709–12.
- Dhadialla TS, Hays AR, Raikhel AS (1992) Characterization of the solubilized mosquito vitellogenin receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **22**: 803–816.
- Dong MQ, Venable JD, Au N, Xu T, Park SK, Cociorva D, Johnson JR, Dillin A, Yates JR (2007) Quantitative mass spectrometry identifies insulin signaling targets in *C. elegans*. *Science* **317**:660–3.
- Dumas KJ, Guo C, Wang X, Burkhart KB, Adams EJ, Alam H, Hu PJ (2010) Functional divergence of dafachronic acid pathways in the control of *C. elegans* development and lifespan. *Dev Biol.* **340(2)**: 605–612.
- Engelmann F (1979) Insect vitellogenin: identification, biosynthesis, and the role in vitellogenesis. *Advances in Insect Physiology* **14**: 49–108.
- Engels W und Fahrenhorst H (1974) Alters- und kastenspezifische Veränderungen der Hämolymp- Protein-Spektren bei *Apis mellifica*. *Wilhelm Roux's Arch.* **174**: 285–296.
- Engels W, Kaatz H, Zillikens A, Simões ZLP, Truve A, Braun RP, Dittrich F (1990) in *Advances in Invertebrate Reproduction*, eds. Hoshi, M. & Yamashita, O. *Elsevier Science* **5**: 495–502.
- Evans EA, Kawli T, Tan MW (2008) *Pseudomonas aeruginosa* suppresses host immunity by activating the DAF-2 insulin-like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog.* **4(10)**:e1000175.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**: 85–90.
- Fares H und Greenwald I (2001) Genetic analysis of endocytosis in *Caenorhabditis elegans*: coelomocyte uptake defective mutants. *Genetics* **159**:133–45.
- Finn und Kristoffersen (2007) Vertebrate Vitellogenin Gene Duplication in Relation to the „3R Hypothesis“: Correlation to the Pelagic Egg and the Oceanic Radiation of Teleosts. *Plos one* **1**: e169.

- Fischer-Le Saux M, Viillardt V, Brunelt B, Normand P, Boemare NE (1999) Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* **49(4)**: 1645-1656.
- Flachsbar F, Caliebe A, Kleindorp R, Blanche H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, Schreiber S, Nebel A (2009) Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc. Natl Acad. Sci.* **106**: 2700–2705.
- Flatt T, Tu MP, Tatar M (2005) Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *Bioessays* **27**:999-1010.
- Floyd RA, West M, Hensley K (2001) Oxidative biochemical markers; clues to understanding aging in long-lived species. *Exp. Gerontol.* **36**: 619–640.
- Fluri P, Sabatini AG, Vecchi MA, Wille H (1981) Blood juvenile hormone, protein and vitellogenin titres in laying and non-laying queen honeybees. *J. Apic. Res.* **20**: 221-225.
- Fluri P, Lüscher M, Wille H, Gerig L (1982) Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *J. Insect Physiol.* **28**: 61–68.
- Gaddi A, Descovich GC, Nosedà G, Fragiaco C, Nicolini A, Montanari G, Vanetti G, Sirtori M, Gatti E, Sirtori CR (1987) Hypercholesterolaemia treated by soybean protein diet. *Arch Dis Child* **62**: 274–8.
- Garcia J, Munro ES, Monte MM, Fourrier MC, Whitelaw J, Smail DA, Ellis AE (2010) Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) serum vitellogenin neutralises infectivity of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish Shellfish Immunol.* **29(2)**: 293–297.
- Garsin DA, Villanueva JM, Begun J, Kim DH, Sifri CD, Calderwood SB, Ruvkun G, Ausubel FM (2003) Long-lived *C. elegans* daf-2 mutants are resistant to bacterial pathogens. *Science* **300**:1921.
- Garigan D, Hsu AL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Kenyon C (2002) Genetic analysis of tissue aging in *CAENORHABDITIS ELEGANS*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* **161**: 1101–1112.
- Gearing AJ, Thorpe SJ, Miller K, Mangan M, Varley PG, Dudgeon T, Ward G, Turner C, Thorpe R (2002) Selective cleavage of human IgG by the matrix metalloproteinases, matrilysin and stromelysin. *Immunol Lett.* **81(1)**: 41-48.
- Gems D und Riddle DL (2000) Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *CAENORHABDITISELEGANS*. *Genetics* **154**: 1597–1610.
- Gerisch B, Weitzel C, Kober-Eisermann C, Rottiers V, Antebi A (2001) A Hormonal Signaling Pathway Influencing *C. elegans* Metabolism, Reproductive Development, and Life Span. *Dev Cell* **1(6)**: 841-851.
- Giannakou ME und Partridge L (2004) The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends in Cell Biology.* **14 (8)**: 408-412.
- Gill MS, Olsen A, Sampayo JN, Lithgow GJ (2003) An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med.* **35(6)**: 558-65.
- Giorgi F, Bradley JT, Nordin JH (1999) Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos, *Micron* **30**: 579–596.
- Giorgi F, Cecchetti A, Falleni A, Masetti M, Gremigni V (1998) Vitellogenin is glycosylated in the fat body of the stick insect *Carausius morosus* and not further modified to the ovarian follicle, *Micron* **29**: 451–460.

- Gissendanner CR, Crossgrove K, Kraus KA, Maina CV, Sluder AE (2004) Expression and function of conserved nuclear receptor genes in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **266**, 399–416.
- Glinski Z, Jarosz J (2000) Immune phenomena in echinoderms. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **48**: 189–193.
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol.* **1**: 1–39.
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Bio* **74**: 111-122.
- Goto S, Nakamura A, Radak Z, Nakamoto H, Takahashi R, Yasuda K, Sakurai Y, Ishii N (1999) Carbonylated proteins in aging and exercise: immunoblot approaches. *Mech. Ageing Dev.* **107**: 245–253.
- Goodrich-Blair H, Clarke DJ (2007) Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Mol Microbiol.* **64(2)**: 260-268.
- Grant B, Hirsh D (1999) Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol Biol Cell.* **10**: 4311-4326.
- Gravato-Nobre MJ, Hodgkin J (2008) The acyltransferase gene *bus-1* exhibits conserved and specific expression in nematode rectal cells and reveals pathogen-induced cell swelling. *Dev Dyn* **237**:3762–76.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**: 134–139.
- Gross J und Lapiere CM (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. NatlAcad. Sci. USA* **47**: 1014–1022.
- GuhaThakurta D, Palomar L, Stormo GD, Tedesco P, Johnson TE, Walker DW, Lithgow G, Kim S, Link CD (2002) Identification of a Novel cis-Regulatory Element Involved in the Heat Shock Response in *Caenorhabditis elegans* Using Microarray Gene Expression and Computational Methods. *Genome Res.* **12**:701–712.
- Gumienny TL, Brugnera E, Tosello-Trampont AC, Kinchen JM, Haney LB, Nishiwaki K, Walk SF, Nemergut ME, Macara IG, Francis R, Schedl T, Qin Y, Van Aelst L, Hengartner MO, Ravichandran KS (2001) CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* **107**: 27-41.
- Gutendorf B und Westendorf J (2001) Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* **166**:79-89.
- Gutierrez-Zepeda A, Santell R, Wu Z, Brown M, Wu Y, Khan I, Link CD, Zhao B, Luo Y. (2005) Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *C. elegans*. *BMC Neurosci.* **6**: 54.
- Hack CJ (2004) Integrated transcriptome and proteome data: the challenges ahead. *Brief Funct Genomic Proteomic* **3(3)**: 212-9.
- Hagedorn HH, Maddison DR, Tu Z (1998) The evolution of vitellogenins, cyclorrhaphan yolk proteins and related molecules. *Advances in Insect Physiology* **27**: 335–384.
- Halaschek-Wiener J, Khattra JS, McKay S, Pouzyrev A, Stott JM, Yang GS, Holt RA, Jones SJ, Marra MA, Brooks-Wilson AR, Riddle DL (2005) Analysis of longlived *C. elegans* daf-2 mutants using serial analysis of gene expression. *Genome Res* **15**: 603-15.

- Hall DH, Winfrey VP, Blaeuer G, Hoffman LH, Furuta T, Rose KL, Hobert O, Greenstein D (1999) Ultrastructural features of the adult hermaphrodite gonad of *Caenorhabditis elegans*: relations between the germ line and soma. *Dev Biol.* **212**: 101–123.
- Hall JM, Couse JF, Korach KS (2001) The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* **276(40)**: 36869–72.
- Hartwig K, Heidler T, Moch J, Daniel H, Wenzel U (2009) Feeding a ROS-generator to *Caenorhabditis elegans* leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormesis. *Genes Nutr.* **4**: 59 – 67.
- Haskins KA, Russell JF, Gaddis N, Dressman HK, Aballay A (2008) Unfolded protein response genes regulated by CED-1 are required for *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Dev Cell* **15**:87–97.
- Hayward MA, Brock ML, Shapiro DJ (1982) Activation of vitellogenin gene transcription is a direct response to estrogen in *Xenopus laevis* liver. *Nucleic Acids Res* **10(24)**: 8273-8284.
- Hedgecock EM, Sulston JE, Thomson JN (1983) Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* **220**: 1277-9.
- Heijmans BT, Beekman M, Houwing-Duistermaat JJ, Cobain MR, Powell J, Blauw GJ, van der Ouderaa F, Westendorp RG, Slagboom PE (2006) Lipoprotein particle profiles mark familial and sporadic human longevity. *PLoS Med.* **3(12)**: e495.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA (2007) Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* **87**: 905–931.
- Henry TB, McPherson JT, Rogers ED, Heah TP, Hawkins SA, Layton, Saylor G (2009) Changes in the relative expression pattern of multiple vitellogenin genes in adult male and larval zebrafish exposed to exogenous estrogens. *Comp Biochem Physiol* **154(A)**: 119-126.
- Hertweck M, Gobel C, Baumeister R (2004) *C. elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. *Dev Cell* **6(4)**: 577-588.
- Heusden MCv., Fogarty S, Porath J, Law JH (1991) Purification of insect vitellogenin and vitellin by gel-immobilized ferric chelate. *Protein Expr.Purif.* **2**: 24–28.
- Hodgkin J, Kuwabara PE, Corneliusen B (2000) A novel bacterial pathogen, *Microbacterium nematophilum*, induces morphological change in the nematode *C. elegans*. *Curr Biol* **10**: 1615–18.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**: 1313-8.
- Honda Y und Honda S (1999) The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* **13(11)**: 1385-93.
- Houten SM, Watanabe M, Auwerx J (2006) Endocrine functions of bile acids. *EMBO J.* **25**: 1419–1425.
- Hosokawa H, Ishii N, Ishida H, Ichimori K, Nakazawa H, Suzuki K (1994) Rapid accumulation of fluorescent material with aging in an oxygen-sensitive mutant Mev-1 of *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Aging Dev.* **74**: 161-170.
- Hsin H und Kenyon C (1999) Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature* **399**: 362–366.

- Huffman DL, Abrami L, Sasik R, Corbeil J, van der Goot FG, Aroian RV Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 10995–11000.
- Hultmark D (1996) Insect lysozymes. *EXS* **75**: 87–102.
- Inudo M, Ishibashi H, Matsumura N, Matsuoka M, Mori T, Taniyama S, Kadokami K, Koga M, Shinohara R, Hutchinson TH, Iguchi T, Arizono K (2004) Effect of estrogenic activity, and phytoestrogen and organochlorine pesticide contents in an experimental fish diet on reproduction and hepatic vitellogenin production in medaka (*Oryzias latipes*). *Comp Med* **54(6)**: 673-80.
- Irazoqui JE und Ausubel FM (2010) 99th Dahlem Conference on Infection, Inflammation and Chronic Inflammatory Disorders: *Caenorhabditis elegans* as a model to study tissues involved in host immunity and microbial pathogenesis. *Clinical and Experimental Immunology* **160**: 48-57.
- Irazoqui JE, Ng A, Xavier RJ, Ausubel FM (2008) Role for beta-catenin and HOX transcription factors in *Caenorhabditis elegans* and mammalian host epithelial-pathogen interactions. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 17469–17474.
- Ishii N, Fjii M, Hartmann PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N, Ayusawa D, Suzuki K (1998) A Mutation in Succinate Dehydrogenase Cytochrome b Causes Oxidative Stress and Ageing in Nematodes. *Nature* **394**: 694-670.
- Jain C, Yun M, Politz SM, Rao RP (2009) A patho-assay using *S. cerevisiae* and *C. elegans* reveals novel roles for yeast AP-1, Yap1 and host dual oxidase, BLI-3 in fungal pathogenesis. *Eukaryot Cell* **8**: 1218–1227.
- Jamil H, Dickson Jr JK, Chu C, Lago MW, Rinehart JK, Biller SA, Gregg RE, Wetterau JR (1995) Microsomal triglyceride transfer protein: specify of lipid binding and transport. *J. Biol. Chem.* **270**: 6549-6554.
- Janeway CA Jr und Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216.
- Jansen MS, Nagel SC, Miranda PJ, Lobenhofer EK, Afshari CA, McDonnell DP (2004) Short-chain fatty acids enhance nuclear receptor activity through mitogen-activated protein kinase activation and histone deacetylase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101(18)**: 7199–7204.
- Jeong MH, Kawasaki I, Shim YH (2010) A circulatory transcriptional regulation among daf-9, daf-12, and daf-16 mediates larval development upon cholesterol starvation in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn.* **239(7)**: 1931-40.
- Jia K, Albert PS, Riddle DL (2002) DAF-9, a cytochrome P450 regulating *C. elegans* larval development and adult longevity. *Development* **129**: 221–231.
- Johnsen M, L und LR, Romer J, Almholt K, Dano K (1998) Cancer invasion and tissue remodelling: Common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol.* **10**: 667-671.
- Judd SE und Tangpricha V (2009) Vitamin D deficiency and risk for cardiovascular disease. *Am J Med Sci* **338**: 40–44.
- Kawli T, Tan MW (2008) Neuroendocrine signals modulate the innate immunity of *Caenorhabditis elegans* through insulin signaling. *Nat Immunol* **9**: 1415–1424.
- Kerry S, TeKippe M, Gaddis NC, Aballay A (2006) GATA transcription factor required for immunity to bacterial and fungal pathogens. *PLoS ONE* **1**: e77.
- Kim DH, Liberati NT, Mizuno T, Inoue H, Hisamoto N, Matsumoto K, Ausubel FM (2004) Integration of *Caenorhabditis elegans* MAPK pathways mediating immunity and

- stress resistance by MEK-1 MAPK kinase and VHP-1 MAPK phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 10990–10994.
- Kim DH, Ausubel FM (2005) Evolutionary perspectives on innate immunity from the study of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Immunol.* **17**: 4–10.
- Kim DH, Feinbaum R, Alloing G, Emerson FE, Garsin DA, Inoue H, Tanaka-Hino M, Hisamoto N, Matsumoto K, Tan MW, Ausubel FM (2002) A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science*. **297**: 623–626.
- Kimble J und Sharrock WJ (1983) Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **96**: 189–196.
- Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G (1997) daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **277(5328)**: 942–6.
- Klass M, Hirsh D (1976) Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **260**: 523 – 525.
- Kleinig H und Maier U (1999) Zellbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, pp. 122f.
- Knott TJ, Pease RJ, Powell LM, Wallis SC, Rall Jr SC, Innerarity TL, Blackhart B, Taylor WH, Marcll Y, Milne R, Johnson D, Fuller M, Lusic AJ, McCarthy BJ, Mahley RW, Levy-Wilson B, Scott J (1986) Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature* **323**: 734–738.
- Ko CL, Chesnel A, Mazerbourg S, Kuntz S, Flament S, Chardard D (2008) Female-enriched expression of ERalpha during gonad differentiation of the urodele amphibian *Pleurodeleswalti*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **156**: 234–245.
- Kojetin DJ, Burris TP, Jensen EV, Khan SA (2008) Implications of the binding of tamoxifen to the coactivator recognition site of the estrogen receptor. *Endocr Relat Cancer.* **15(4)**: 851–70.
- Kondo M, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ishii T, Hartman PS, Ishii N (2005) Effect of oxidative stress on translocation of DAF-16 in oxygen-sensitive mutants, mev-1 and gas-1 of *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* **126**: 637–641.
- Kubagawa HM, Watts JL, Corrigan C, Edmonds JW, Sztul E, Browse J, Miller MA (2006) Oocyte signals derived from polyunsaturated fatty acids control sperm recruitment in vivo. *Nat Cell Biol.* **8(10)**: 1143–1148.
- Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 5925–5930.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138(3)**: 863–870.
- Kurz CL und Tan M-W (2004) Regulation of aging and innate immunity in *C. elegans*. *Aging Cell* 185–193.
- Kurz CL und Ewbank JJ (2003) *Caenorhabditis elegans*: an emerging genetic model for the study of innate immunity. *Nat. Rev. Genet.* **4**: 380–390.
- Kurzchalia TV, Ward S (2003) Why do worms need cholesterol? *Nat. Cell Biol.* **5(8)**: 684–688.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(5259)**: 680–685.
- Langley KE, Villarejo MR, Fowler AV, Zamenhof PF, Zabin I (1975) Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. *Proc Natl. Acaad Sci* **72(4)**: 1254–1257.

- Law SW, Grant SM, Higuchi K, Hospattankar A, Lackner K, Lee N, Brewer Jr HB (1986) Human liver apolipoprotein B-100 cDNA: complete nucleic acid and derived amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 8142-8146.
- Lee JM, Nishimori Y, Hatakeyama M, Bae T-W, Oishi K (2000b) Vitellogenin of the cicada *Graptopsaltria nigrofuscata* (Homoptera): analysis of its primary structure. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**: 1–7.
- Lee RY, Hench J, Ruvkun G (2002) Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway. *Curr. Biol.* **11**: 1950-1957.
- Lee SS, Kennedy S, Tolonen AC, Ruvkun G (2003) DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science* **300**: 644-647.
- Lehner B, Tischler J, Fraser AG (2006) RNAi screens in *Caenorhabditis elegans* in a 96-well liquid format and their application to the systematic identification of genetic interactions. *Nat. Protoc.* **1**: 1617-20.
- Leippe M (1999) Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa – effector molecules of primitive phagocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **23**: 267–279.
- Leontovich AA, Zhang J, Shimokawa K, Nagase H, Sarras MP Jr. (2000) A novel hydra matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process. *Development* **127**: 907-920.
- Li Z, Zhang SC, Liu Q (2008) Vitellogenin functions as a multivalent pattern recognition receptor with an opsonic activity, *PLoS ONE* **3(4)**: e1940.
- Libina N, Berman JR, Kenyon C (2003) Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell* **115(4)**: 489–502.
- Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C (2001) Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet.* **28(2)**: 139-45.
- Liu Q, Zhang SC, Li Z, Gao CR (2009) Characterization of a pattern recognition molecule vitellogenin from carp (*Cyprinus carpio*), *Immunobiology* **214**: 257–267.
- Lindberg MK, Movérare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C (2003) Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol* **17(2)**: 203-8.
- Llano E, Pendás AM, Aza-Blanc P, Kornberg TB, López-Otín C (2000) Dm1-MMP, a matrix metalloproteinase from *Drosophila* with a potential role in extracellular matrix remodeling during neural development. *J Biol Chem.* **275(46)**: 35978-35985.
- López-Revuelta A, Sánchez-Gallego JI, Hernández-Hernández A, Sánchez-Yagüe J, Llanillo M (2005) Increase in vulnerability to oxidative damage in cholesterol-modified erythrocytes exposed to t-BuOOH. *Biochim. Biophys. Acta* **1734**: 74 – 85.
- Lucius R und Loos-Frank B (1997) Parasitologie: Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner. Spekt. Akad. Verl. pp. 213 – 261.
- Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* **407(6801)**: 233-41.
- MacMorris M und Blumenthal T (1993) In situ analysis of *C. elegans* vitellogenin fusion gene expression in integrated transgenic strains: effect of promoter mutations on RNA localization. *Gene Expr.* **3(1)**: 17-36.
- MacMorris M, Broverman S, Greenspoon S, Lea K, Madej C, Blumenthal T, Spieth J (1992) Regulation of vitellogenin gene expression in transgenic *Caenorhabditis elegans*: short sequences required for activation of the vit-2 promoter. *Mol Cell Biol.* **12(4)**: 1652-62.

- Maidement JM, Moore D, Murphy GP, Murphy G, Clark IM (1999) Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. Expression and activity. *J Biol Chem* **274**: 34706-34710.
- Mallo GV, Kurz CL, Couillault C, Pujol N, Granjeaud S, Kohara Y, Ewbank JJ (2002) Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Curr Biol* **12**: 1209–1214.
- Marik R, Allu M, Anchoori R, Steams V, Umbricht CB, Khan S (2011) Potent genistein derivatives as inhibitors of estrogen receptor alpha-positive breast cancer. *Cancer Biol Ther.* **11(10)**: 883-92.
- Martineau AR, Wilkinson KA, Newton SM, Floto RA, Norman AW, Skolimowska K, Davidson RN, Sorensen OE, Kampmann B, Griffiths CJ, Wilkinson RJ (2007) IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. *J Immunol* **178**: 7190–7198.
- Massafra C, Buonocore G, Gioia D, Sargentini I (1996) Changes in the erythrocyte antioxidant enzyme system during transdermal estradiol therapy for secondary amenorrhea. *Gynecological Endocrinology* **10(3)**: 155–8.
- Matyash V, Geier C, Henske A, Mukherjee S, Hirsh D, Thiele C, Grant B, Maxfield FR, Kurzchalia TV (2001) Distribution and transport of cholesterol in *Caenorhabditis elegans*. *MolBiol Cell.* **12(6)**: 1725-1736.
- Matyash V, Entchev EV, Mende F, Wilsch-Bräuninger M, Thiele C, Schmidt AW, Knölker HJ, Ward S, Kurzchalia TV (2004) Sterol-derived hormone(s) controls entry into diapause in *Caenorhabditis elegans* by consecutive activation of DAF-12 and DAF-16. *PLoS Biol.* **2(10)**:e280.
- Matozzo V, Gagné F, Marin MG, Ricciardi F, Blaise C (2008) Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. *Environ Int.* **34(4)**: 531-45. Review.
- Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, Koyasu S, Matsumoto K, Takeda K, Ichijo H (2005) ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat. Immunol.* **6**: 587–592.
- McCawley LJ und Matrisian LM (2001) Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current. Opinions in Cell Biology* **13**: 534-540.
- McElwee J, Bubb K, Thomas JH (2003) Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16. *Aging Cell* **2**: 111-21.
- McGhee JD (2007) The *C. ELEGANS* intestine. Wormbook. The *C. elegans* Research Community.
- Medzhitov R und Janeway CA Jr (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9(1)**: 4-9.
- Medzhitov R und Janeway C Jr (2000) Innate immunity. *N Engl J Med* **343(5)**: 338-44.
- Mellman I (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **12**: 575–625.
- Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V (1991) Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* **10**: 3959-3970.
- Menuet MN, Anglade I, Flouriot G, F. Pakdel F, Kah O (2001) Tissue-specific expression of two structurally different estrogen receptor alpha isoforms along the female reproductive axis of an oviparous species, the rainbow trout, *Biol. Reprod.* **5**: 1548–1557.

- Messina M, McCaskill-Stevens W, Lampe JW (2006) Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**: 1275–1284.
- Miller MS, Benore PM, White HB (1982) Dephosphorylation of chicken riboflavin-binding protein and phosphatidylcholine decreases their uptake by oocytes, *Journal of Biological Chemistry* **257**: 6818–6824.
- Mimoto A, Fujii M, Usami M, Shimamura M, Hirabayashi N, Kaneko T, Sasagawa N, Ishiura S (2007) Identification of an estrogenic hormone receptor in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun.* **364(4)**: 883-8.
- Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, Kreuzsch A, Saez E (2007) The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature.* **445(7124)**: 219–223.
- Mochida Y, Takeda K, Saitoh M, Nishitoh H, Amagasa T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Ichijo H (2000) ASK1 Inhibits Interleukin-1-induced NF-kappa B Activity through Disruption of TRAF6-TAK1 Interaction. *J. Biol. Chem.* **275**: 32747–32752.
- Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y (2001) Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol. Pharm. Bull.* **24**: 351-356.
- Morton DG, Shakes DC, Nugent S, Dichoso D, Wang W, Golden A, Kempfues KJ (2002) The *Caenorhabditis elegans* par-5 gene encodes a 14-3-3 protein required for cellular asymmetry in the early embryo. *Dev Biol.* **241(1)**: 47-58.
- Motola DL, Cummins CL, Rottiers V, Sharma KK, Li T, Li Y, Suino-Powell K, Xu HE, Auchus RJ, Antebi A, Mangelsdorf DJ (2006) Identification of ligands for DAF-12 that govern dauer formation and reproduction in *C. elegans*. *Cell* **124(6)**: 1209-23.
- Mukhopadhyay A, Oh SW, Tissenbaum HA (2006) Worming pathways to and from DAF-16/FOXO. *Exp Gerontol.* **41(10)**: 928-34. Review.
- Münch D und Amdam GV (2010) The curious case of aging plasticity in honey bees. *FEBS Letters* **584**: 2496-2503.
- Munoz MJ (2003) Longevity and heat stress regulation in *Caenorhabditiselegans*. *Mech Ageing Dev.* **124(1)**: 43-48
- Murakami S und Johnson TE (2001) The OLD-1 positive regulator of longevity and stress resistance is under DAF-16 regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol.* **11(19)**: 1517-23.
- Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, Li H, Kenyon C (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424(17)**: 277-284.
- Murphy PA, Farmakalidis E, Johnson LD (1982) Isoflavone content of soya-based laboratory animal diets. *Food Chem Toxicol* **20**: 315-317.
- Nagase H und Woessner JF (1999) Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem.* **274(31)**: 21491-21494.
- Nakamura A und Goto S (1996) Analysis of Protein Carbonyls with 2,4-Dinitrophenyl Hydrazine and Its Antibodies by Immunoblot in Two-Dimensional Gel Electrophoresis *J. Biochem.* **119**:768-774.
- Nakamura A, Yasuda K, Adachi H, Sakurai Y, Ishii N, Goto S (1999) Vitellogenin-6 Is a Major Carbonylated Protein in Aged Nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun.* **264**: 580-583.
- Nardelli D, Gerber-Huber S, van het Schip FD, Gruber M, Geert AB, Wahli W (1987) *Biochemistry* **26**: 6397-6402.

- Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page RE, Amdam GV (2007) The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization, *PLoS Biol.* **5** (3): e62
- Nicholas WL (1984) The biology of free living nematodes. 2nd Ed. Clarendon Press, Oxford.
- Nicholas HR und Hodgkin J (2004) The ERK MAP kinase cascade mediates tail swelling and a protective response to rectal infection in *C. elegans*. *Curr Biol.* **14**(14): 1256-61.
- Nicholas HR und Hodgkin J (2009) The *C. elegans* Hox gene *egl-5* is required for correct development of the hermaphrodite hindgut and for the response to rectal infection by *Microbacterium nematophilum*. *Dev Biol* **329**: 16–24.
- Nilsson S, Gustafsson JA (2011) Estrogen Receptors: Therapies Targeted to Receptor Subtypes. *Clin pharmacol ther* **89**(1): 44–55.
- Nnoaham KE und Clarke A (2008) Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* **37**: 113–119.
- Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun GB (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* **389**:994-9.
- Opresko LK, Wiley HS (1987) Receptor-mediated endocytosis in *Xenopus* oocytes. I. Characterization of the vitellogenin receptor system. *J Biol Chem* **262**: 4109-4115.
- Orkin SH (1990) Globin gene regulation and switching: circa 1990. *Cell* **63**(4): 665-72.
- O'Rourke D, Baban D, Demidova M, Mott R, Hodgkin J (2006) Genomic clusters, putative pathogen recognition molecules, and antimicrobial genes are induced by infection of *C. elegans* with *M. nematophilum*. *Genome Res.* **16**: 1005–1016.
- Osborne TF (2000) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBP's): Key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* **275**(42): 32379-32382.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Remodeling Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**(3): 221-233.
- Pan ML, Bell WJ, Tefler WH (1969) Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. *Science* **165**: 393-394.
- Patel DS, Fang LL, Svy DK, Ruvkun G, Li W (2008) Genetic identification of HSD-1, a conserved steroidogenic enzyme that directs larval development in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **135**: 2239-2249.
- Partridge FA, Gravato-Nobre MJ, Hodgkin J (2010) Signal transduction pathways that function in both development and innate immunity. *Dev Dyn.* **239**(5): 1330-6. Review.
- Penttinen-Damdimopoulou PE, Power KA, Hurmerinta TT, Nurmi T, van der Saag PT, Mäkelä SI (2009) Dietary sources of lignans and isoflavones modulate responses to estradiol in estrogen reporter mice. *Mol Nutr Food Res.* **53**(8): 996-1006.
- Perlman AJ, Wolffe AP, Champion J, Tata JR (1984) Regulation by estrogen receptor of vitellogenin transcription in *Xenopus* hepatocyte culture. *Mol Cell Endocrinol* **38**(2-3): 151-161.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **92**(9): 2002-2007.
- Pilz S, Tomaschitz A, Obermayer-Pietsch B, Dobnig H, Pieber TR (2009) Epidemiology of vitamin D insufficiency and cancer mortality, *Anticancer Res* **29**: 3699–3704.
- Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuk AR, Cruz, J, Simoes ZLP, Belles X (2003) The vitellogenin of the honey bee *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**: 49–465.
- Poinar GO (1983) The natural history of Nematodes. Prentice-Hall International. New Jersey. pp. 323.

- Popham JD und Webster JM (1979) Aspects of the fine structure of the dauer larva of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Can. J. Zool.* **57**: 794 – 800.
- Powell JR, Kim DH, Ausubel FM (2009) The G protein-coupled receptor FSHR-1 is required for the *Caenorhabditis elegans* innate immune response. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 2782-2787.
- Pujol N, Link EM, Liu LX, Kurz CL, Alloing G, Tan MW, Ray KP, Solari R, Johnson CD, Ewbank JJ (2001) A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **11**: 809-821.
- Pujol N, Zugasti O, Wong D, Couillault C, Kurz CL, Schulenburg H, Ewbank JJ (2008a) Anti-fungal innate immunity in *C. elegans* is enhanced by evolutionary diversification of antimicrobial peptides. *PLoS Pathog* **4**: e1000105.
- Pujol N, Cypowyj S, Ziegler K, Millet A, Astrain A, Goncharov A, Jin Y, Chisholm AD, Ewbank JJ (2008b) Distinct innate immune responses to infection and wounding in the *C. elegans* epidermis. *Curr Biol* **18**: 481–9.
- Prager EM und Jolles P (1996) Animal lysozymes c and g: an overview. *EXS* **75**: 9–31.
- Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW (2005) Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* **41**: 1211–1219.
- Raikhel AS und Dhadialla TS (1992) Accumulation of yolk proteins in insect oocytes, *Annual Review of Entomology* **37**: 217–251.
- Rando G, Ramachandran B, Rebecchi M, Ciana P, Maggi A (2009) Differential effect of pure isoflavones and soymilk on estrogen receptor activity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* **237(3)**: 288-97.
- Rhaikel AS, Brown MR, Bellés X (2004) Hormonal control of reproductive processes. In: Gilbert LI, Iatrou K und Gill SS, Editoren, *Comprehensive Molecular Insect Science* vol. 3, Elsevier pp. 433–491.
- Redshaw MR und Follett BK (1971) The Crystalline Yolk-Platelet Proteins and their Soluble Plasma Precursor in an Amphibian, *Xenopus laevis*. *Biochem J.* **124(4)**: 759-766.
- Richards MP und Steel NC (1987) Trace element metabolism in the developing avian embryo: a review. *J. Exp. Zool. Suppl.* **1**: 39–51.
- Riddle DL, Swanson MM, Albert PS (1981) Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature* **290**: 668–671.
- Roth BL, Poot M, Yue ST, Millard PJ (1997) Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(6)**: 2421-2431.
- Rottiers V, Motola DL, Gerisch B, Cummins CL, Nishiwaki K, Mangelsdorf DJ, Antebi A (2006) Hormonal control of *C. elegans* dauer formation and life span by a Rieske-like oxygenase. *Dev Cell.* **10(4)**: 473-82.
- Russell SJ und Kahn CR (2007) Endocrine regulation of ageing. *nature reviews molecular cell biology* **8**: 681.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) 'Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase'. *Science* **239**: 487-91.
- Salzet M (2001) Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol.* **22**: 285-288.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning; a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

- Sappington TW und Raikhel AS (1998) Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **8**: 277–300.
- Schierenberg E und Cassada R (1986) Der Nematode *Caenorhabditis elegans* – ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus unserer Zeit. *Biologie in unserer Zeit* **1**: 1-7.
- Schmucker DL (2002) Intestinal mucosal immunosenescence in rats. *Exp. Gerontol.* **37**: 197-203.
- Schmucker DL, Thoreux K, Owen RL (2001) Aging impairs intestinal immunity. *Mech. Aging Dev.* **122**: 1397–1411.
- Schnabel R, Hutter H, Moerman D, Schnabel H (1997) Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. *Dev Biol.* **184(2)**: 234-65.
- Schneider WJ (1996) Vitellogenin receptors: oocyte-specific members of the low-density lipoprotein receptor supergene family. *Int Rev Cytol.* **166**: 103–137.
- Schneider WJ und Nimpf J (2003) LDL receptor relatives at the crossroad of endocytosis and signalling. *Cell Mol Life Sci.* **60**: 892-903.
- Schulenburg H, Hoepfner MP, Weiner J, Bornberg-Bauer E (2007) Specificity of the innate immune system and diversity of C-type lectin domain (CTLD) proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Immunobiology* **213**: 237-250.
- Schuur ER, Loktev AV, Sharma M, Sun Z, Roth RA, Weigel RJ (2001) Ligand-dependent Interaction of Estrogen Receptor with Members of the Forkhead Transcription Factor Family. *The journal of biological chemistry* **276(36)**: 33554–33560.
- Segraves WA (1994) Steroid receptors and other transcription factors in ecdysone response, *Recent Progress in Hormone Research* **49**: 167–195.
- Sellers JA, Hou L, Schoenberg DR, Batistuzzo de Medeiros SR, Wahli W, Shelness GS (2005) Microsomal triglyceride transfer protein promotes the secretion of *Xenopus laevis* vitellogenin A1. *J Biol Chem.* **280(14)**: 13902-5.
- Shapira M, Hamlin BJ, Rong J, Chen K, Ronen M, Tan MW (2006) A conserved role for a GATA transcription factor in regulating epithelial innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 14086–14091.
- Shapiro SD (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* **10(5)**: 602-608.
- Sharrock WJ, Sutherlin ME, Leske K, Cheng TK, Kim TY (1989) Two Distinct Yolk Lipoprotein Complexes from *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry* **265(24)**: 14422-14431.
- Sharrock WJ (1984) Cleavage of two yolk proteins from a precursor in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* **174**: 419-431.
- Sharrock WJ (1983) Yolk proteins of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **96**: 182-188.
- Sherwood DR, Sternberg PW (2003) Anchor cell invasion into the vulval epithelium in *C. elegans*. *Dev Cell.* **5(1)**: 21-31.
- Sherwood DR, Butler JA, Kramer JM, Sternberg PW (2005) FOS-1 promotes basement-membrane removal during anchor-cell invasion in *C. elegans*. *Cell* **121**: 951–962.
- Shi XD, Zhang SC, Pang QX (2006) Vitellogenin is a novel player in defense reactions. *Fish Shellfish Immunol.* **20**: 769–772.
- Shim J, Im SH, Lee J (2003) Tissue-specific expression, heat inducibility, and biological roles of two hsp16 genes in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* **537**: 139–145.

- Shivers RP, Kooistra T, Chu SW, Pagano DJ, Kim DH (2009) Tissue specific activities of an immune signaling module regulate physiological responses to pathogenic and nutritional bacteria in *C. elegans*. *Cell Host Microbe* **6**: 321–30.
- Shoenfeld N, Amital H, Shoenfeld Y (2009) The effect of melanism and vitamin D synthesis on the incidence of autoimmune disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* **5**: 99–105.
- Sicard M, Hering S, Schulte R, Gaudriault S, Schulenburg H (2007) The effect of *Photobacterium luminescens* (Enterobacteriaceae) on the survival, development, reproduction and behaviour of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae). *Environmental Microbiology* **9** (1): 12-25.
- Sifri CD, Begun J, Ausubel FM (2005) The worm has turned – microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Microbiology* **13**: 119-127.
- Sifri CD, Begun J, Ausubel FM, Calderwood SB (2003) *Caenorhabditis elegans* as a Model Host for *Staphylococcus aureus* Pathogenesis. *Infect Immun.* **71**: 2208.
- Singh V und Aballay A (2006) Heat-shock transcription factor (HSF)-1 pathway required for *Caenorhabditiselegans* immunity. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 13092-13097.
- Singh D und Pandey RS. (1998) Changes in catalase activity and hydrogen peroxide level in rat ovary during estrous cycle and induction of catalase in rat ovary by estradiol-17 beta. *Indian Journal of Experimental Biology* **36**(4): 421–3.
- Sirtori CR, Agradi E, Conti F, Mantero O, Gatti E (1977) Soybeanprotein diet in the treatment of type-II hyperlipoproteinaemia. *Lancet* **1**: 275–7.
- Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C (1998) Reduction of serum cholesterol by soybean proteins: clinical experience and potential molecular mechanisms. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **8**: 334–40.
- Song TT, Hendrich S, Murphy PA (1999) Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. *J Agric Food Chem* **47**: 1607-1610.
- Soucy G, Boivin G, Labrie F, Rivest S (2005) Estradiol Is Required for a Proper Immune Response to Bacterial and Viral Pathogens in the Female Brain. *The Journal of Immunology* **174**: 6391– 6398.
- Spieth J und Blumenthal T (1985) The *Caenorhabditis elegans* vitellogenin gene family includes a gene encoding a distantly related protein. *Mol Cell Biol.* **5**(10): 2495-2501.
- Spieth J, Denison K, Zucker E, Blumenthal T (1985a) The nucleotide sequence of a vitellogenin gene. *Nucleic Acids Research* **13**: 7129-7138.
- Spieth J, Denison K, Kirtland S, Cane J, Blumenthal T (1985b) The *C. elegans* vitellogenin genes: short sequence repeats in the promoter regions and homology to the vertebrate genes. *Nucleic Acids Res.* **13**(14): 5283-95.
- Sternlicht MD und Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **17**: 463-516.
- Su HP, Nakada-Tsukui K, Tosello-Trampont AC, Li Y, Bu G, Henson PM, Ravichandran KS (2002) Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J Biol Chem* **277**: 11772-9.
- Sulston JE und Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineage of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **56**: 110 – 156.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**: 64-119.
- Tagawa H, Shimokawa H, Tagawa T, Kuroiwa-Matsumoto M, Hirooka Y, Tadashita A (1997) Short-term estrogen augments both nitric oxide-mediated and non-nitric oxide-

- mediated endothelium-dependent forearm vasodilation in postmenopausal women. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **30**: 481–8.
- Takahashi S (1987) Studies on the phosphorylation of ovarian proteins from the silkworm *Bombyx mori*, *Insect Biochemistry* **17**: 141–152.
- Tan MW, Mahajan-Miklos S, Ausubel FM (1999) Killing of *CAENORHABDITIS ELEGANS* by *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci*. **96**: 715.
- Tata JR (1976) The expression of the vitellogenin gene. *Cell* **9**: 1-14.
- Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS (2001) A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* **292**: 107-10.
- Tenor JL und Aballay, A (2007) A conserved Toll-like receptor is required for *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *EMBO Rep.* **9(1)**: 103-9.
- Tefler WH (1954) Immunological studies of insect metamorphosis. II The role of a sex-limited blood protein in egg formation by the *Cecropia* silkworm. *The Journal of General Physiology* **37**: 538-558.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* **282(5396)**: 2012-2018.
- Thorpe GH, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP (1985) Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem.* **31(8)**: 1335-41.
- Timmons L, Court DL, Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**: 103-112.
- Tissenbaum HA und Ruvkun G (1998) An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **148(2)**: 703-17.
- Tong A, Lynn G, Ngo V, Wong D, Moseley SL, Ewbank JJ, Goncharov A, Wu YC, Pujol N, Chisholm AD (2009) Negative regulation of *Caenorhabditis elegans* epidermal damage responses by death-associated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 1457-61.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* **76(9)**: 4350-4.
- Trenczek TA und Engels W (1986) Occurring of vitellogenin in drone honeybees. International. *Journal of Invertebrate Reproduction and Development* **10**: 307–311.
- Trewitt PM, Heilmann LJ, Degrugillier SS, Kumaran AK (1992) The boll weevil vitellogenin gene: nucleotide sequence, structure, and evolutionary relationship to nematode and vertebrate vitellogenin genes. *Journal of Molecular Evolution* **34**: 478–492.
- Tufail M und Takeda M (2008) Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology* **54**: 1447-1458.
- Tufail M und Takeda M (2009) Insect vitellogenin/lipophorin receptors: Molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *Journal of Insect Physiology* **55**: 88-104.
- Tufail M, Raikhel AS, Takeda M (2005) Biosynthesis and processing of insect vitellogenins. In: Raikhel AS und Sappington TW, Editoren, *Progress in Vitellogenesis. Reproductive Biology of Invertebrates, vol. XII. Part B*, Science Publishers, Inc., pp. 1–32.

- Vaarhorst AA, Beekman M, Suchiman EH, van Heemst D, Houwing-Duistermaat JJ, Westendorp RG, Slagboom PE, Heijmans BT (2010) Lipid metabolism in long-lived families: the Leiden Longevity Study. *Age* **33(2)**: 219-27.
- Valle D (1993) Vitellogenesis in insects and other groups—a review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **88**: 1–26. Review.
- Van Lenten BJ, Fogelman AM, Haberland ME, Edwards PA (1986) The role of lipoproteins and receptor-mediated endocytosis in the transport of bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 2704-2708.
- Verdeal K, Brown RR, Richardson T, Ryan DS (1980) Affinity of phytoestrogens for estradiol-binding proteins and effect of coumestrol on growth of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumors. *J Natl Cancer Inst* **(2)**: 285-90.
- Verderame M, Limatola E (2010) Molecular identification of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) and their differential expression during VTG synthesis in the liver of lizard *Podarciscicula*. *Gen Comp Endocrinol*. **168(2)**: 231-8.
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM (2000) Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **20**: 1262-1275.
- Visse R und Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circulation. Research* **92**: 827-839.
- Vu TH und Werb Z (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*. **14**: 2123-2133.
- Wahli W, Dawid IB, Wyler T, Weber R, Ryffel GU (1980) Comparative analysis of the structural organization of two closely related vitellogenin genes in *X. laevis*. *Cell* **20**: 107-117.
- Wang S-Y, Smith DE, Williams DL (1983) Purification of avian vitellogenin III: comparison with vitellogenins I and II. *Biochemistry* **22**: 6206-6212.
- Wang Y, Oh SW, Deplancke B, Luo J, Walhout AJ, Tissenbaum HA (2006) *C. elegans* 14-3-3 proteins regulate life span and interact with SIR-2.1 and DAF-16/FOXO. *Mech Ageing Dev*. **127(9)**: 741-7.
- Wang W und Shakes DC (1997) Expression patterns and transcript processing of *ftt-1* and *ftt-2*, two *C. elegans* 14-3-3 homologues. *J. Mol. Biol*. **268**: 619–630.
- Wang H und Murphy PA (1994) Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agr. Food Chem*. **42**: 1666-1673.
- Wetterau JR, Gregg RE, Harrity TW, Arbeeny C, Cap M, Connolly F, Chu CH, George RJ, Gordon DA, Jamil H, Jolibois KG, Kunselman LK, Lan SJ, Maccagnan TJ, Ricci B, Yan M, Young D, Chen Y, Fryszman OM, Logan JV, Musial CL, Poss MA, Robl JA, Simpkins LM, Slusarchyk WA, Sulsky R, Taunk P, Magnin DR, Tino JA, Lawrence RM, Dickson JK Jr, Biller SA (1998) An MTP inhibitor that normalizes atherogenic lipoprotein levels in WHHL rabbits. *Science* **282**: 751-754.
- Willcox BJ, Donlon TA, He Q, Chen R, Grove JS, Yano K, Masaki KH, Willcox DC, Rodriguez B, Curb JD (2008) FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc. Natl Acad. Sci*. **105**: 13987–13992.
- Willnow TE (1999) The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med*. **77(3)**: 306-315.
- Winter CE, Penha C, Blumenthal T (1996) Comparison of a Vitellogenin Gene Between Two Distantly Related Rhabditid Species. *Mol. Bio. Evol*. **13(5)**: 674-684.

- Woessner JF (2002) MMPs and TIMPs--an historical perspective. *Mol Biotechnol.* **22(1)**: 33-49.
- Wolffe AP, Bersimbaev RI, Tata JR (1985) Inhibition by estradiol of binding and mitogenic effect of epidermal growth factor in primary cultures of *Xenopus* hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol.* **40(2-3)**: 167-73.
- Wollam J, Magomedova L, Magner DB, Shen Y, Rottiers V, Motola DL, Mangelsdorf DJ, Cummins CL, Antebi A (2011) The Rieske oxygenase DAF-36 functions as a cholesterol 7-desaturase in steroidogenic pathways governing longevity. *Aging Cell.* **10(5)**: 879-884.
- Wolkow CA, Kimura KD, Lee MS, Ruvkun G (2000) Regulation of *C. elegans* life-span by insulin like signaling in the nervous system. *Science* **290(5489)**: 147-150.
- Wood WB (1988). The nematode *Caenorhabditis elegans*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wüstner D, Landt Larsen A, Faergeman NJ, Brewer JR, Sage D (2010) Selective visualization of fluorescent sterols in *Caenorhabditis elegans* by bleach-rate-based image segmentation. *Traffic.* **11(4)**: 440-454.
- Wüstner D und Sage D (2010) Multicolor bleach-rate imaging enlightens in vivo sterol transport. *Commun Integr Biol.* **3(4)**: 370-373.
- Xu H, Soruri A, Gieseler RK, Peters JH (1993) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes, *Scand J Immunol* **38**: 535-540.
- Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russell DW (1984) The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* **39**: 27-38.
- Yamawaki TM, Arantes-Oliveira N, Berman JR, Zhang P, Kenyon C (2008) Distinct activities of the germline and somatic reproductive tissues in the regulation of *Caenorhabditis elegans*' longevity. *Genetics* **178**: 513-526.
- Yang C-Y, Chen S-H, Gianturco SH, Bradley WA, Sparrow JT, Tanimura M, Li W-H, Sparrow DA, DeLoof H, Rosseneu M, Lee F-S, Gu Z-W, Gotto Jr AM, Chan L (1986) Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. *Nature* **323**: 738-742.
- Yasuda K, Adachi H, Fujiwara Y, Ishii N (1999) Protein carbonyl accumulation in aging dauer formation-defective (*daf*) mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontology* **54A**: B47-B51.
- Yochem J, Tuck S, Greenwald I, Han M (1999) A gp330/ megalin-related protein is required in the major epidermis of *Caenorhabditis elegans* for completion of molting. *Development* **126**: 597-606.
- Yuanxiang J, Chen R, Sun L, Qian H, Liu W, Fu Z (2009) Induction of estrogen-responsive gene transcription in the embryo, larval, juvenile and adult life stage of zebrafish as biomarkers of short term exposure to endocrine disrupting chemicals. *Comp Biochem Physiol* **150**: 414-420.
- Zhang J, McCracken A, Wyatt GR (1993) Properties and sequence of a female-specific juvenile hormone-induced protein from locust hemolymph. *J Biol Chem.* **268**: 3282-3288.
- Zhang Y, Lu H, Bargmann CI (2005) Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **438**: 179-184.
- Zhang S, Wang S, Li H, Li L (2011) Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector. *Int J Biochem Cell Biol.* **43(3)**: 303-5. Review.

- Zhao L, Chen Q, Diaz Brinton R (2002) Neuroprotective and neurotrophic efficacy of phytoestrogens in cultured hippocampal neurons. *Exp. Biol Med* **227**: 509-519.
- Zlábek V, Randák T, Kolárová J, Svobodová Z, Kroupová H (2008) Sex differentiation and vitellogenin and 11-ketotestosterone levels in chub, *Leuciscus cephalus* L., exposed to 17 beta-estradiol and testosterone during early development. *Bull Environ Contam Toxicol.* **82(3)**: 280-4.
- Ziegler K, Kurz CL, Cypowyj S, Couillault C, Pophillat M, Pujol N, Ewbank JJ (2009) Antifungal innate immunity in *C. elegans*: PKCdelta links G protein signaling and a conserved p38 MAPK cascade. *Cell Host Microbe* **5**: 341–52.
- Zugasti O und Ewbank JJ (2009) Neuroimmune regulation of antimicrobial peptide expression by a noncanonical TGF-beta signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* epidermis. *Nat Immunol* **10**: 249– 56.

7 APPENDIX

7.1 Appendix A - Materialien

Nematodenstämme

In den Experimenten wurden Nematoden der Gattung *C. elegans* verschiedener Stämme eingesetzt (Tabelle A 7.1), die das *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC, University of Minnesota, St. Paul, MN, USA) zur Verfügung stellte.

Tabelle A 7.1 Nematodenstämme mit Angabe der Referenz.

Stamm	Beschreibung	Referenz
N2 , variation Bristol	<i>C. elegans</i> Wildtyp	Brenner 1974
AA1 , <i>daf-12</i>	<i>daf-12</i> (rh257) X	Antebai <i>et al.</i> 1998
CF1038 , <i>daf-16</i>	<i>daf-16</i> (mu86) I	Link <i>et al.</i> 1997
DH1390 , <i>rme-2</i>	<i>rme-2</i> (b1008) IV	Grant und Hirsh 1999
DR2281 , <i>daf-9</i>	<i>daf-9</i> (m540) X	Kailiang <i>et al.</i> 2002
MT3002 , <i>ced-3</i>	<i>ced-3</i> (n1286)IV	Yuan <i>et al.</i> 1993
RB2365 , <i>vit-2</i>	<i>vit-2</i> (ok3211) X	<i>C. elegans Gene Knockout Project</i> , OMRF
RT130 , <i>vit-2::gfp</i>	<i>pwls23</i> [<i>vit-2::gfp</i>]	Grant und Hirsh 1999
TJ356 , <i>daf-16::gfp</i>	<i>zls356</i> IV [<i>daf-16p::daf-16-gfp; rol-6</i>]	Liang <i>et al.</i> 2006
<i>zmp-2(2.1)::gfp</i>	[<i>zmp-2(2.1)p::gfp; rol-6</i>], enthält das Transgen <i>zmp-2</i> -Promotor/GFP transkriptional fusioniert. Dieser transgene Stamm wurde ihm Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Vilcinskas (Giessen), PD Dr. habil. Boran Altincicek (Bonn) und Dr. Kai Lüersen (Münster) hergestellt und wird nachfolgend beschrieben (3.2.3.4).	Altincicek <i>et al.</i> 2010

Bakterienstämme

Die in den Experimenten eingesetzten Bakterienstämme wurden durch das *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC, University of Minnesota, St. Paul, MN, USA), Geneservice Ltd (Source BioScience – Lifesciences, UK) und der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) zur Verfügung gestellt und sind in der nachstehenden Tabelle A 7.2 aufgelistet.

Tabelle A 7.2 Bakterienstämme mit Angabe der Referenz.

Stamm	Beschreibung
OP50	<i>E. coli</i> -Stamm zur Kultivierung von <i>C. elegans</i> , Uracil auxotroph (Brenner 1974). Bezogen wurde OP50 vom CGC der Universität von Minnesota, USA.
<i>P. luminescens</i> (TT01)	<i>Photobacterium luminescens</i> ist ein gramnegatives Bakterium der Familie <i>Enterobacteriaceae</i> , welches stark pathogen in <i>C. elegans</i> wirkt, indem nematizide Komponenten gebildet werden, die Entwicklung, Lebensspanne und Reproduktivität beeinflussen (Sicard <i>et al.</i> 2007). Bezogen von der DSMZ.
TT01 _{gfp}	TT01 _{gfp} ist ein mit GFP transformierter <i>P. luminescens</i> -Stamm; er wurde freundlicherweise von David J Clarke (University College Cork, Ireland) zur Verfügung gestellt.
HT115(DE3)	<i>E. coli</i> -Stamm mit Tetracyclin-Resistenz zur Produktion von dsRNA, welche für die RNA-Interferenz benötigt wird. Er ist RNaseIII-defizient und enthält das leere Plasmid L4440, das eine für Ampicillin-Resistenz kodierende Sequenz besitzt. Diese Bakterien werden bei RNAi-Versuchen als Negativkontrolle eingesetzt und wurden von Geneservice Ltd bezogen. Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit in die HT115-Bakterien L4440-Plasmide mit genspezifischen Inserts transformiert. Beide DNA-Stränge, der zwischen zwei flankierenden T7-Promotoren insertierten Gensequenz, werden nach Induktion der T7-RNA-Polymerase mittels Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) transkribiert (Grishok <i>et al.</i> 2005) und somit Gen-spezifischer <i>Knock-down</i> verursacht (Milhavet <i>et al.</i> 2003, Timmons <i>et al.</i> 2003).

RNAi-Klone:	Gensequenz-Namen (Referenzperson bei WormBase)
<i>daf-9</i>	T13C5.1 <i>abnormal DAuer Formation</i> (Donald L. Riddle)
<i>daf-12</i>	F11A1.3 <i>abnormal DAuer Formation</i> (Donald L. Riddle)
<i>daf-16</i>	R13H8.1 <i>abnormal DAuer Formation</i> (Donald L. Riddle)
<i>elt-2</i>	C33D3.1 <i>Erythroid-Like Transcription factor family</i> (Thomas Blumenthal)
<i>ftt-2</i>	F52D10.3 <i>Fourteen-Three-Three family</i> (Diane Shakes)
<i>hsf-1</i>	Y53C10A.12 <i>Heat Shock Factor</i> (Cynthia Kenyon)
<i>jnk-1</i>	B0478.1 <i>Jun N-terminal Kinase</i> (Carl Johnson)
<i>lin-25</i>	F56H9.5 <i>abnormal cell LINEage</i> (Jonathan Hodgkin)
<i>nhr-14</i>	T01B10.4 <i>Nuclear Hormone Receptor family</i> (Ann Sluder)
<i>par-5</i>	M117.2 <i>abnormal embryonic PARTitioning of cytoplasm</i> (Kenneth Kemphues)
<i>pmk-1</i>	B0218.3 <i>P38 Map Kinase family</i> (Kunihiro Matsumoto)
<i>rme-2</i>	T11F8.3 <i>Receptor Mediated Endocytosis</i> (David Hirsh)
<i>sir 2.1</i>	R11A8.4 <i>yeast SIR related</i> (Leonard Guarente)
<i>trf-1</i>	F45G2.6 <i>TNF Receptor Associated Factor (TRAF) homolog</i> (Carl Johnson)
<i>vit-2</i>	C42D8.2 <i>VITellogenin structural genes (yolk protein genes)</i> Dieser RNAi-Klon wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert und wird nachfolgend beschrieben (3.2.3.1 ff).
<i>vit-3</i>	F59D8.1 <i>VITellogenin structural genes (yolk protein genes)</i> (Thomas Blumenthal)
<i>vit-5</i>	C04F6.1 <i>VITellogenin structural genes (yolk protein genes)</i> (Thomas Blumenthal)
<i>vit-6</i>	K07H8.6 <i>VITellogenin structural genes (yolk protein genes)</i> Dieser RNAi-Klon wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert und wird nachfolgend beschrieben (3.2.3.1 ff).
<i>zmp-2</i>	H19M22.3 <i>Zinc matrix Metalloproteases</i>

Chemikalien und Laborbedarf

Die in Tabelle A 7.3 genannten Chemikalien wurden von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland), Oxoid (Cambridge, England), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), New England BioLabs (Ipswich, USA), Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, Deutschland), Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) und Molecular Probes (Leiden, Niederlande) erworben. Wenn nicht anders erwähnt, wurden sie in *per analysis* (p.a.) Qualität bezogen.

Tabelle A 7.3 Chemikalien mit Angabe der Bezugsquelle.

Chemikalien	Hersteller	Artikelnummer
1,4 Dithiothreit (DTT)	Roth	6908.1
17- β -Östradiol	Sigma	107K1322
2-Methyl-1-propanol	Sigma	58460
4-Hydroxytamoxifen	Sigma	028K4083
4-Nitrophenylphosphat (4-NPP)	Roth	4165.1
Acrylamidlösung (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	Roth	3029.1
Agar Agar	Serva	11392
Agarose	Roth	T846.2
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth	9592.3
Ampicillin	Roth	K029.1
Amplex UltraRed Reagent	Invitrogen	A36006
Ascorbinsäure	Roth	3525.1
Bacto-Pepton	Merck	1.11931
BioRad Protein Assay	Biorad	500-0006
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V	Roth	8076.1
Bromphenolblau	Sigma	32768
Carbenicillin	Sigma	C1389
Caseinpepton (Trypton)	Oxoid	LP0042
Chloroform > 99,9 %	Roth	3313.1
Cholesterol	Sigma	C8667

Coomassie Brilliant Blue R	Sigma	B0149
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	4720.2
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth	P030.1
DNA-Beladungspuffer (6x)	Fermentas	B65
dNTP-Mix (10 mM)	Fermentas	R0191
Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), w/o Calcium, w/o Magnesium (10X)	Invitrogen	14200067
Ergosta-5,7,9(11),22-tetra-en-3 β -ol	Sigma	019K4107
Essigsäure	Roth	7332.1
Ethanol (>99,8 %)	Roth	5054.3
Ethanol (70 %), 1 % MEK	Roth	T913.3
Ethidiumbromid	Roth	7870.2
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth	CN06
Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus	Fermentas	SM0321
Genistein	Sigma	G6649
Glucose, wasserfrei	Roth	X997.2
Glycerin	Roth	3783.1
Glycin	Roth	3908.2
Hefeextrakt	Merck	1.11926
Isopropanol (2-Propanol)	Roth	6752.3
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma	59740
Juglone (5-Hydroxy-1,4 Naphtochinon)	Sigma	H-47003
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth	P749.2
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth	6751.1
Levamisol-Hydrochlorid	Sigma	46944
Luminol	Roth	4203.1
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth	A537.1
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Roth	P027.1
Methanol	Roth	4627.4
Milchpulver	Heirler Radolfzell	
MitoTracker Red CM-H ₂ XRos	Invitrogen	M7513
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-	Roth	9105.3

ethansulfonsäure (HEPES)		
Natriumchlorid (NaCl)	Roth	3957.1
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth	6771.1
Natriumhypochlorit (NaClO)	Roth	9062.3
Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS)	Roth	4360.2
NEB 5'α Zellen	Biolabs	C2992
N,N,N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth	2367.3
p-Coumarinsäure	Sigma	C9008
Pepton	Roth	2365.1
Perfect DNA™ 1kb Ladder	Merck	70537
Salzsäure, 37 %	Roth	9277.1
SOC-Medium	New England BioLabs	B9020S
β-Mercaptoethanol	Sigma	42273
SYBR Safe	Invitrogen	S33110
SYTOX Green nucleic acid stain in DMSO (5 mM)	Molecular Probes	S7020
Tetracyclin	Sigma	T7660
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth	4855.2
Tris-hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth	9090.3
Trizol	Fisher Scientific	AB-0303
Tween20	Sigma	P1379
Tween80	Sigma	84780
Wasserstoffperoxid, 35 % (H ₂ O ₂)	Roth	9683.1

Die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Kits mit Hersteller und Artikelnummer werden in der folgenden Tabelle A 7.4 aufgelistet.

Tabelle A 7.4 Molekularbiologische Kits mit Angabe der Bezugsquelle.

Kits	Hersteller	Artikelnummer
Brilliant II SYBR Green QRT-PCR Mastermix-Kit	Stratagene Products	600825
Eppendorf-Fast plasmid Mini	Eppendorf	2300010
Fast Plasmid MiniKit	5PRIME	2300000
NucleoSpin Extract II	Macherey Nagel	340-74060910
OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit	Millipore	S7150
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab	12-2500-00
pGEM-T-Easy Vektor-Kit	Promega	A1360
Plasmid Midi Kit (100)	Qiagen	12145
Rapid DNA Ligationskit	Fermentas	K1422
Topo TA Cloning Kit	Invitrogen	45-0641

In Tabelle A 7.5 werden die verwendeten Enzyme mit Hersteller und Artikelnummer dargestellt.

Tabelle A 7.5 verwendete Enzyme mit Angabe der Bezugsquelle.

Enzyme	Hersteller	Artikelnummer
<i>Apal</i>	Fermentas	ER1411
<i>BamHI</i>	Fermentas	ER0051
Fast Digest <i>SmaI</i>	Fermentas	FD0663
<i>HindIII</i>	Fermentas	ER0501
Horseradish Peroxidase (HRP)	Calbiochem VWR	516531
<i>Red Taq</i>	Sigma	01-1010
Reverse Transkriptase (M-MuLV)	Fermentas	EP0441
T4-DNA-Ligase	Roche	11000321
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas	EP0401
<i>XhoI</i>	Fermentas	ER0691

Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bestellt und synthetisiert:

Tabelle A 7.6 Oligonukleotide mit Angabe der Sequenz

Oligonukleotide	Sequenz
18S-Primer als Referenz für die qRT-PCR	
18S rRNA fw	5'-ATGGTTGCAAAGCTGAAACT-3'
18S rRNA rev	5'-TCCCGTGTTGAGTCAAATTA-3'
<i>vit-2</i>-Primer für qRT-PCR I	
Vit-2-fw-260	5'-AGATGCCTTCCTTGAAGCTCC-3'
Vit-2-RNAi-rev-405	5'-GTTCTTTGAGACCATTTCAGCGTC-3'
<i>vit-2</i>-Primer für qRT-PCR II	
Vit-2-fw-204	5'-CCACCTTCAACTTGTCAACATA-3'
Vit-2-RNAi-rev-405	5'-GTTCTTTGAGACCATTTCAGCGTC-3'
<i>vit-6</i>-Primer für qRT-PCR	
Vit-6-fw-4084	5'ACCCCATGCTACTCCGTTCTC'3
Vit-6-rev-4198	5'CAACCTTGACGTTCTTCCACTCC'3
<i>vit-2</i>-RNAi-Primer für RNAi-Konstrukt	
Vit-2-RNAi-fw-4411	5'-CTCAAGAACGAGGAGTGCGAA-3'
Vit-2-RNAi-rev-4861	5'-AAGTGCCGGTCTAGCTTAA-3'
<i>vit-6</i>-RNAi-Primer für RNAi-Konstrukt	
vit-6-fw-4084	5'-ACCCCATGCTACTCCGTTCTC-3'
vit-6-rev-4793	5'-GATGGGAGGCAGTAGACGGAG-3'
L4440-RNAi-Primer	
pL4440-RNAi-FOR	5'-GTTTTCCAGTCACGACGTT-3'
pL4440-RNAi-REV	5'-TGGATAACCGTATTACCGCC-3'
<i>zmp-2</i>-Primer für Erstellung des transgenen Stamms	
Neu-CeleMMP5-For1	5'-AAGCTTTGGACAAGCAACGCTGAG-3'
MMP5-rev3	5'-AAGTGTGAATAGGATAAGATAAGGTAGAT-3'
Neu-CeleMMP5-For2	5'-AAGCTTGGTGCATCGATGAAGCTGAA-3'
MMP5Pro-Rev2	5'-CATTATATACCGGATCCAGTCCTCTT-3'

Antikörper

In der nachstehenden Tabelle A 7.7 werden die Antikörper für die durchgeführten Western Blot- und Oxy Blot- Analysen aufgelistet.

Tabelle A 7.7 Antikörper und deren Bezugsquelle.

Antikörper	Hersteller	Artikelnummer
Western Blot:		
Primäre Antikörper YP88 (rat-anti-vit-6 polyklonal)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Thomas Blumenthal, Indiana University	
goat anti-rat IgG HRP-conjugated (polyklonal)	Dianova	112-035-003
Rabbit-anti-actin (polyklonal)	Sigma-Aldrich	A2066
goat-anti-rabbit-IgG, HRP-konjugiert (polyklonal)	Santa Cruz	Sc-2004
Oxy Blot:		
rabbit-anti-DNP	Millipore	90451
goat-anti-rabbit IgG (HRP-markiert)	Millipore	90452

Vektoren

Die in dieser Arbeit für die verschiedenen Klonierungen verwendeten Vektoren werden in der folgenden Tabelle A 7.8 beschrieben.

Tabelle A 7.8 Vektoren mit Angabe der Funktionen und Bezugsquelle.

Vektor	Funktion	Hersteller
pCR2.1	Aufgrund der terminalen Transferasen-Aktivität von Taq-Polymerasen besonders geeignet als Klonierungsvektor (TA-Cloning); Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz; T7-Promotor; <i>lacZ</i> -Gen für ein Blau-Weiß-Screening; 3,9kb groß	Invitrogen
L4440	Vektor zur Transkription von dsRNA in <i>E. coli</i> HT115, zwei T7-Promotoren flankieren die MCS; <i>lacZ</i> -Promotor, der	Geneservice

	für die Induktion der T7-Polymerase durch IPTG benötigt wird; Ampicillin-Resistenz; 2,8 kb groß
pPD95_75	Expressionsvektor, dessen Klonierungsstelle die GFP- Addgene cDNA nachgeschaltet ist; Ampicillinresistenz; 4,5 kb groß
pGEM-T <i>easy</i>	Klonierungsvektor, Ampicillinresistenz; T3- und T7- Promega Promotor; 3 kb groß
pRF-4	Markerplasmid mit <i>rol-6</i> (SU1006); <i>loss-of-function</i> CGC Mutation im <i>rol-6</i> Kollagen-Gen. Dies resultiert phänotypisch in einer Verdrehung der Kutikula und so in einer Bewegung um die zentrale Achse der transgenen Nematoden (Roller-Phänotyp)

Lösungen und Puffer

Stammlösungen:

Tabelle A 7.9 zeigt die Konzentrationen der in dieser Arbeit verwendeten Stammlösungen. Die Stammlösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit H₂O bidest. hergestellt und anschließend autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C. Antibiotika wurden in 50 % Ethanol gelöst und bei -20 °C gelagert. SYTOX Green und MitoTracker Red CM-H₂XRos werden bei -20°C gelagert, wohingegen die Juglon-Lösung immer frisch angesetzt werden musste. Cholesterin, 17β-Östradiol, Genistein und 4-Hydroxytamoxifen wurden in absolutem Ethanol gelöst und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Tabelle A 7.9 Konzentrationen der Stammlösungen.

Stammlösung	Konzentrationen
<i>C. elegans</i>-Kultivierung	
Ampicillin	100 mg/ml (Ethanol 50%)
CaCl ₂	0,1 M, 1 M
Carbenicillin	25 mg/ml, gelöst in Ethanol 50 %
Cholesterin	5 mg/ml, 50 mg/ml gelöst in Ethanol
IPTG	1 M

KH ₂ PO ₄ (pH 6,0)	1 M
H ₂ KPO ₄	50 mM
HK ₂ PO ₄	50 mM
KOH	5 M
MgSO ₄	0,1 M
Na ₃ PO ₄	0,25 M
Nystatin	10.000 U/ml
C. elegans-Effektoren	
17-β-Östradiol ¹	10 mM in EtOH
Ascorbinsäure (AA)	10 mM in M9
Dehydroergosterol (DHE)	10 mM in EtOH/Tween20
Genistein ¹	10 mM in EtOH
Juglonelösung ²	10 mM in EtOH/Tween80
Agarose-Gelelektrophorese	
50 x TAE Puffer ³	242 g Tris-Base, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), ad 1 L H ₂ O bidest. (pH 7,6)
6 x DNA-Gelauftragungspuffer	50 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol in 1 x TAE

¹Für die jeweiligen Versuche wurden die Stammlösungen des Östrogens (17β-Östradiol) bzw. Phytoöstrogens (Genistein) entsprechend mit Ethanol und M9-Puffer verdünnt, um in der Arbeitslösung eine 10 %ige Ethanolkonzentration zu erzielen. ²Für die jeweiligen Versuche wird die Juglon-Stammlösung entsprechend der Endkonzentration mit M9-Puffer/Tween80 verdünnt. ³ Der 50xTAE Puffer hat einen pH Wert 7,6, wird bei Raumtemperatur gelagert und für die unterschiedlichen Verwendungen entsprechend verdünnt.

Puffer und Lösungen:

Alle Versuche mit *C. elegans* wurden in einem Flüssigmedium nach Lehner *et. al* (2006) durchgeführt. Im Folgenden sind die Bestandteile für 10 ml des *Nematode Growth Mediums* (NGM) aufgelistet.

Tabelle A 7.10 NGM-Flüssigmedium.

NGM-Flüssigmedium	
NaCl-Pepton-Lösung	9,72 ml
Cholesterol (5 mg/100 ml)	10 µl
CaCl ₂ (0,1 M)	10 µl
MgSO ₄ (1 M)	10 µl
KH ₂ PO ₄ (1 M, pH 6)	250 µl

Das NGM-Flüssigmedium wurde frisch angesetzt. Zur Verwendung für RNAi-Versuche wurden zusätzlich 10 µl 1 M IPTG-Lösung zugesetzt.

Tabelle A 7.11 NaCl-Pepton-Lösung.

NaCl-Pepton-Lösung	
NaCl	3 g
Bacto-Pepton	2,5 g
H ₂ O bidest.	ad 1 l

Die Lösung wurde 15 min bei 121 °C autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Kultivierung von *C. elegans* wurden NGM-Agar-Platten verwendet, deren Herstellung im Folgenden beschrieben wird.

Tabelle A 7.12 NGM-Agar.

NGM-Agar	
NaCl	3 g
Bacto-Pepton	2,5 g
Agar	17 g
H ₂ O bidest.	947 ml

Nach dem Autoklavieren bei 121 °C und Abkühlen auf 55 °C (ca. 1 h), wurden folgende Stammlösungen unter sterilen Bedingungen zugesetzt:

NGM-Agar	
KH ₂ PO ₄ (1 M, pH 6)	25 ml
MgSO ₄ (0,1 M)	1 ml
CaCl ₂ (0,1 M)	1 ml
Cholesterol-Lösung (5 mg/ 100 ml)	1 ml
Nystatin-Lösung (10.000 U/ml)	10 ml

Etwa 9 ml des 55 °C warmen NGM-Agars wurden in Petrischalen mit einem Durchmesser von 92 mm gegeben. Die Platten blieben leicht geöffnet 1 h unter der Sterilbank stehen, bis der Agar ausgehärtet war. Die Platten wurden anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

Die Bakterienkulturen wurden in 2xYT-Medium herangezüchtet, welches sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzt:

Tabelle A 7.13 2xYT-Medium.

2xYT-Medium	
Bacto-Pepton	16 g
Bacto-Yeast-Extract	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O bidest.	ad 1 l

Der pH wurde mit 5 N NaOH auf 7,0 eingestellt, anschließend wurden die Bestandteile für 1 h bei 121 °C autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Bei der Kultivierung von RNAi-Klonen, wurden dem 2xYT-Medium Ampicillin (Endkonzentration von 100 µg/ml) und Tetracyclin (Endkonzentration 25 µg/ml) zugesetzt.

2xYT-Agar

Für die Kultivierung von *C. elegans* dienen OP50 Bakterien als Nahrungsquelle, welche auf 2xYT-Agar-Platten gezüchtet wurden. Hierfür wurden den Inhaltsstoffen des 2xYT-Mediums 15 g Agar hinzugefügt.

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 55 °C wurden die Platten unter sterilen Bedingungen gegossen. Um RNAi-Klone zu kultivieren, wurden dem Agar Ampicillin

(Endkonzentration von 100 µg/ml) und Tetracyclin (Endkonzentration 25 µg/ml) hinzugegeben.

Zur Herstellung des M9-Puffers wurden die im Folgenden aufgelisteten Bestandteile benötigt:

Tabelle A 7.14 M9-Puffer

M9-Puffer	
KH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
NaCl	5 g
H ₂ O bidest	ad 1 l

Die gelösten Bestandteile wurden für 1 h bei 121°C autoklaviert. Nach anschließendem Abkühlen auf 60 °C wurde 1 ml MgSO₄-Lösung (1 M) hinzu pipettiert. Der M9-Puffer hat einen pH Wert von 7,0 und wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Tabelle A 7.15 Wurmlyse-Puffer.

Wurmlyse-Puffer	
TRIS-Base (1 M, pH 8,0)	10 ml
NaCl (1 M)	20 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	200 µl
Glycerin (100 %)	8 ml

H₂O bidest. ad 100 ml, Lagerung bei 4 °C

Für eine Langzeitlagerung von *C. elegans* bei -80°C wurde der folgend aufgelistete Puffer benötigt.

Tabelle A 7.16 Einfrier-Puffer.

Einfrier-Puffer A	
64,5 ml	K ₂ HPO ₄ (50 mM)
435,5 ml	KH ₂ PO ₄ (50 mM)
2,925 g	NaCl
H ₂ O bidest.	ad 500 ml

Nach Einstellen des pH-Wertes auf 6,0 wurde der Puffer 1 h bei 121°C autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Einfrier-Puffer B	
300 ml	Glycerin
700 ml	Einfrier-Puffer A

Der Einfrier-Puffer B wurde nach Sterilfiltrieren bei 4°C gelagert.

Zum Ansetzen von Arbeitslösungen und zum Waschen der Würmer wurde ein erweiterter M9-Puffer verwendet, welcher 1 % Tween 20 bzw. Tween 80 (v/v) enthält.

Tabelle A 7.17 M9-Puffer/Tween20 bzw. Tween80.

M9-Puffer/Tween20 bzw. Tween 80	
M9-Puffer	50 ml
Tween20 bzw. Tween80	500 µl

Die Aufbewahrung erfolgte bei Raumtemperatur.

Zur Synchronisierung der Würmer wurde die sogenannte *Bleaching*-Methode angewandt, wofür die folgende Bleichlösung benötigt wurde:

Tabelle A 7.18 Bleichlösung.

Bleichlösung	
NaClO (12 % Cl)	3 ml
KOH (5 N)	2,5 ml
H ₂ O bidest.	19,5 ml

Die Bleichlösung wurde für den jeweiligen Versuch frisch angesetzt.

Um die Würmer für mikroskopische Aufnahmen zu betäuben wurde eine 2 mM Levamisol-Lösung verwendet:

Tabelle A 7.19 Levamisol.

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

Die Levamisol-Lösung wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Damit HT115-Bakterien chemisch kompetent wurden, wurde neben einer 0,1 M CaCl₂-Stammlösung (Tabelle A 7.20) auch eine Magnesium-Calciumchlorid-Lösung benötigt:

Tabelle A 7.20 MgCl₂/CaCl₂-Lösung.

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

Die MgCl₂/CaCl₂-Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle A 7.21 Amplex UltraRed-Reagenz.

Amplex UltraRed-Reagenz	
Amplex UltraRed (10 mM)	50 µl
HRP (10 U/ml)	100 µl
5 x Reaktionspuffer (0,25 M, Na ₂ HPO ₄)	4,85 ml

Diese Lösung wurde für den jeweiligen Versuch frisch angesetzt.

Puffer und Lösungen – Biochemische Methoden:

Tabelle A 7.22 Blotpuffer nach Towbin.

Blotpuffer nach Towbin	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 % (v/v)

Ad H₂O bidest., pH 8,6 mit HCl eingestellt, Lagerung bei RT

Tabelle A 7.23 Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Lösung.

Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Lösung	
Lösung A	
Tris 0,1 M (pH 8,6)	5 ml
p-Coumarinsäure 90 mM	100 µM
Luminol 250 mM	250 µM
H ₂ O bidest.	45 ml

Lösung B

H ₂ O ₂ (35%)	100 µl
H ₂ O bidest.	900 µl

Für die Detektionslösung wurde 1 ml der Lösung A mit 3 µl der Lösung B gemischt. Die ECL-Lösungen A und B können jeweils 2 – 3 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden. 90 mM p-Coumarinsäure und 250 mM Luminol werden in DMSO gelöst und bei -20 °C gelagert.

Tabelle A 7.24 Lämmli-Puffer (3x)**Lämmli-Puffer (3x)**

SDS	5 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
Tris (pH 6,8)	150 mM
Glycerin	30 % (v/v)
Bromphenolblau	Spatelspitze

Ad H₂O bidest., Lagerung bei -20 °C

Tabelle A 7.25 Laufpuffer.**Laufpuffer**

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)

Ad H₂O bidest., Lagerung bei RT

Tabelle A 7.26 Strippuffer.**Strippuffer**

Tris (pH 6,8)	62 mM
SDS	2 % (w/v)
DTT	100 mM

Ad H₂O bidest., Lagerung bei RT, DTT wurde jeweils frisch zugegeben.

Tabelle A 7.27 TBS-Puffer (Tris buffered saline).

TBS-Puffer (Tris buffered saline)	
NaCl	150 mM
Tris	50 mM

Ad H₂O bidest., pH-Wert 7,5, Lagerung bei RT

Tabelle A 7.28 TBS-T-Puffer (Tris buffered saline with Tween).

TBS-T-Puffer (Tris buffered saline with Tween)	
NaCl	150 mM
Tris	50 mM
Tween20	0,05 % (v/v)

Ad H₂O bidest., pH-Wert 7,5, Lagerung bei RT

Tabelle A 7.29 Milchpulverlösung.

Milchpulverlösung	
Milchpulver	1 % (w/v)

Gelöst in TBS-T, Lagerung bei RT

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die in den Versuchen verwendeten Geräte und Labor-Hilfsmittel werden mit Angabe der Bezugsquelle in Tabelle A 7.30 aufgelistet, die benötigten Verbrauchsmaterialien in Tabelle A 7.31.

Tabelle A 7.30 Verwendete Geräte und Laborhilfsmittel.

Gerät	Hersteller (Ort, Land)
Analysenwaage	Kern & Sohn (Balingen, D)
Autoklav Systec DB23	Systec (Wettenberg, D)
CFX TM Real-Time PCR Detection System	Biorad (Hercules, USA)
Elektrophorese Komplettsystem Mini Protean 3 Cell	Biorad (München, D)

Elektrophoresekammer (horizontal)	Peqlab (Erlangen, D)
Fluoreszenzmikroskop, Axioskop 2	Zeiss (Jena, D)
Fluoroskan Ascent FL	Labsystems (Bornheim, D)
Freezing Container	Sigma Aldrich (Steinberg, D)
Handdispenser	Gilson (Bad Camberg, D)
Homogenisator Typ RW 18	Janke & Kunkel KG (Staufen in Breislau, D)
Inkubator	Binder (Tuttlingen, D)
Kühlzentrifuge Universal 320 R	Hettich (Tuttlingen, D)
Leica Confocal Microscope Scanner (LCMS)	Leica Mikrosysteme GmbH (Wetzlar, D)
Mehrkanalpipette	Brand (Wertheim, D)
Mikroskop Leica DMIL	Leica Mikroskopie GmbH (Wetzlar, D)
Mikrowelle	Cinex (Ascheberg, D)
Moticam 2500 USB 2.0	Beyersdörfer (Saarbrücken-Eschringen, D)
Nano-Drop Spektrophotometer	Peqlab (Erlangen, D)
Optimax X-Ray Film Processor	Protec Medizintechnik (Oberstenfeld, D)
pH-Meter	Schott Instruments (Mainz, D)
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, D)
Röntgenfilmkassette	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Schüttler	Eppendorf (Hamburg, D)
Schüttler Unimax 1010 mit Inkubator	Heidolph Instruments (Schwabach, D)
Semi-Dry Blotter Modell HEP 1	Owl (Portsmouth, USA)
Seriendosierer DISTRIMAN	Gilson (Bad Camberg, D)
Spektralphotometer (Ultrospec II)	Amersham Pharmacia (Nümbrecht, D)
Stereomikroskop mit Kaltlichtquelle	Breukhoven Mikroscope Systems (Capelle a/d IJssel, NL)
Sterilwerkbank (HS12/2)	Heraeus (Hanau, D)
Sterilisator	WTB Binder (Tuttlingen, D)
Thermocycler (Primus25)	PeqLab (Erlangen, D)
Thermostatschrank	Lovibond (Dortmund, D)
Tischzentrifuge Universal 320R	Hettich (Tuttlingen, D)
Trockenschrank	Heraeus instruments (Hanau, D)

Überkopfschüttler (intelli-mixer)	neoLab (Heidelberg, D)
Ultraschallbad	Bandelin electronics (Berlin, D)
UV-Transilluminator	Fröbel (Chemnitz, D)
Vakuum-Folienschweißer FS 6171-07	Siemssen Product Service GmbH (Münster, D)
Vakuumpumpe Laboport	neoLab (Heidelberg, D)
Variopipetten 2, 10, 20, 100, 200 und 1000 µl	Gilson (Bad Camberg, D)
Vortex Mixer	Heidolph Instruments (Schwabach, D)
Wasseraufbereitungssystem Synergy	Millipore (Schwalbach, D)
Wasserbad	LAUDA (Königshofen, D)
Zentrifuge Mikro 120	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, D)

Tabelle A 7.31 verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Aluminiumfolie	Roth (Karlsruhe, D)
Bechergläser	Duran (Wertheim, D)
Deckgläser (24x50 mm)	Roth (Karlsruhe, D)
Edelstahlskalpell	Roth (Karlsruhe, D)
Einmalküvetten Halbmikro (1,5 ml)	Brand (Wertheim, D)
Erlenmeyer-Kolben (50, 100 und 500 ml)	Duran (Wertheim, D)
Gefrier- und Kochfolie	Roth (Karlsruhe, D)
Impföse	Roth (Karlsruhe, D)
Laborflaschen mit Schraubverschluss (50, 250, 500 und 1000 ml)	Duran (Wertheim, D)
Lager-Pappboxen (148x148x128 und 136x136x59 mm)	Roth (Karlsruhe, D)
Messpipetten (2, 5, 10 und 25 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Messzylinder	Brand (Wertheim, D)
Mirkotiterplatten (48, 96 und 384 Well)	Greiner Bio One (Frickenhäusen, D)
Mikrotiterplatten-Verschlussfilm	Roth (Karlsruhe, D)

Multi-Well-Platten (6/24/48/96)	Greiner Bio One (Frickenhausen, D)
Objektträger Super Frost Ultra Plus (25x75 mm)	Gerhard Menzel (Braunschweig, D)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
Pasterupipetten	Brand (Wertheim, D)
Petrischalen (35, 60, 92 mm)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Polyvinylidenfluorid (PVDF-) Membran	Millipore (Schwalbach, D)
Reaktionsgefäß (1,5 und 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Whatman-Papier (20 x 20 cm, 3 mm)	Roth (Karlsruhe, D)
Zahnstocher	Roth (Karlsruhe, D)
Zellkulturröhrchen (14 ml)	Greiner Bio One (Frickenhausen, D)
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, D)

Software

In der nachstehenden Tabelle A 7.32 wird die zur graphischen Darstellung der Experimente und zur statistischen Auswertung verwendete Software mit Angabe des Herstellers aufgelistet.

Tabelle A 7.32 verwendete Software.

Software	Hersteller
Ascent Software for Fluoroskan Version 2.6	Thermo Labsystems (Vantaa, FI)
CFX Manager Software	BioRad (Hercules, USA)
GraphPad Prism Version 5.0	GraphPad Software (San Diego, USA)
ImageJ Version 1.43	NIH Image, National Institute of Health (Bethesda, USA)
Microsoft Office Excel 2010	Microsoft (Redmond, USA)
Motic Images Plus 2.0 ML	Beyersdörfer (Saarbrücken-Eschringen, D)

7.2 Appendix B Ergebnisse – *P. luminescens*

Tabelle B 7.1 Mittlere Lebensspannen von *C. elegans* unter Hitzestress nach Inkubation mit *P. luminescens*.

Stamm	<i>P. luminescens</i>	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	-	10,1 ± 1,4	100,0	141	
	+	5,1 ± 1,6	50,5	117	***
	+ (Hitze inaktiviert)	10,3 ± 1,2	102,0	46	ns
	+ GFP-transgen	5,3 ± 1,4	52,5	45	***

N: Anzahl der Würmer, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * zeigt signifikante Unterschiede vs. Kontrolle an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.2 Mittlere Lebensspannen von *C. elegans* unter Hitzestress nach *P. luminescens*-Inkubation und *vit*-RNAi.

Stamm	PL	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	-	Kontrolle	10,4 ± 1,5	100,0	178	
	-	<i>vit-2</i>	9,9 ± 0,9	95,1	55	ns
	-	<i>vit-3</i>	9,7 ± 1,7	93,7	79	ns
	-	<i>vit-5</i>	9,8 ± 1,1	94,2	69	ns
	-	<i>vit-6</i>	10,7 ± 1,0	103,1	79	ns
	+	Kontrolle	6,3 ± 1,9	60,3	76	***
	+	<i>vit-2</i>	3,5 ± 1,3	33,4	55	⋈⋈⋈
	+	<i>vit-3</i>	4,8 ± 2,0	46,7	73	⋈⋈⋈
	+	<i>vit-5</i>	4,5 ± 1,9	43,3	55	⋈⋈⋈
	+	<i>vit-6</i>	5,0 ± 0,3	48,7	63	⋈⋈⋈
<i>vit-2</i> (RB2365)	-	Kontrolle	8,9 ± 1,6	85,5	104	***
	+	Kontrolle	4,0 ± 1,1	39,0	79	⋈⋈⋈

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. ⋈ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. Kontrolle + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.3 Mittlere Lebensspannen *P. luminescens* infizierter Wildtyp-Tiere und Deletionsmutanten unter Hitzestress und deren Beeinflussung durch genspezifische RNAi.

Stamm	PL	RNAi	MLS \pm SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	-	Kontrolle	9,9 \pm 1,4	100,0	178	
	-	<i>jnk-1</i>	10,2 \pm 1,2	102,5	88	ns
	-	<i>trf-1</i>	10,6 \pm 1,2	106,5	102	ns
	-	<i>pmk-1</i>	9,4 \pm 1,7	95,2	90	ns
	-	<i>elt-2</i>	10,2 \pm 1,1	102,5	54	ns
	-	<i>hsf-1</i>	9,5 \pm 1,6	95,5	84	ns
	-	<i>lin-25</i>	10,6 \pm 1,2	107,0	86	ns
	-	<i>daf-16</i>	9,7 \pm 1,2	97,6	71	ns
<i>ced-3</i> (MT3002)	-	Kontrolle	9,8 \pm 1,5	98,9	53	ns
<i>daf-16</i> (CF1038)	-	Kontrolle	9,5 \pm 1,0	96,1	62	ns
Wildtyp N2	+	Kontrolle	6,4 \pm 1,6	64,6	117	***
	+	<i>jnk-1</i>	6,3 \pm 1,9	63,6	103	***
	+	<i>trf-1</i>	7,6 \pm 1,8	76,8	102	***
	+	<i>pmk-1</i>	6,0 \pm 2,4	60,6	98	***
	+	<i>elt-2</i>	7,4 \pm 2,2	74,7	61	***
	+	<i>hsf-1</i>	6,5 \pm 2,6	65,7	89	***
	+	<i>lin-25</i>	7,4 \pm 1,9	74,7	96	***
	+	<i>daf-16</i>	3,6 \pm 0,9	36,4	84	***, $\mu\mu\mu$
<i>ced-3</i> (MT3002)	+	Kontrolle	5,9 \pm 2,4	59,6	54	***
<i>daf-16</i> (CF1038)	+	Kontrolle	4,0 \pm 0,9	40,4	56	***, $\mu\mu\mu$

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **MLS \pm SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. μ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. Kontrolle + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$).

Tabelle B 7.4 Mittlere Lebensspannen *P. luminescens* infizierter Wildtyp-Tiere und Deletionsmutanten unter Hitzestress.

Stamm	PL	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	-	10,4 ± 1,5	100,0	178	
<i>daf-9</i> (DR2281)	-	9,6 ± 1,7	92,3	54	
<i>daf-12</i> (AA1)	-	9,3 ± 1,9	89,7	126	
<i>daf-16</i> (CF1038)	-	9,5 ± 1,0	91,9	62	
Wildtyp N2	+	6,3 ± 1,9	60,3	76	***
<i>daf-9</i> (DR2281)	+	4,6 ± 1,6	44,3	71	⚡⚡⚡
<i>daf-12</i> (AA1)	+	5,0 ± 1,8	47,8	132	⚡⚡⚡
<i>daf-16</i> (CF1038)	+	4,2 ± 1,2	40,4	59	⚡⚡⚡

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. ⚡ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. Kontrolle + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.5 Mittlere Lebensspannen unterschiedlicher *daf*-Deletionsmutanten unter Hitzestress nach *P. luminescens*-Exposition und *vit*-RNAi.

Stamm	PL	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
<i>daf-9</i> (DR2281)	-	Kontrolle	9,6 ± 1,7	100,0	54	
	-	<i>vit-3</i>	9,2 ± 2,2	96,0	38	ns
	-	<i>vit-5</i>	9,4 ± 1,6	98,6	40	ns
	+	Kontrolle	4,6 ± 1,6	48,0	71	***
	+	<i>vit-3</i>	4,1 ± 1,5	43,1	32	***, ns
	+	<i>vit-5</i>	4,6 ± 2,3	47,7	40	***, ns
<i>daf-12</i> (AA1)	-	Kontrolle	9,3 ± 1,9	100,0	126	
	-	<i>vit-3</i>	10,4 ± 2,1	112,3	51	***
	-	<i>vit-5</i>	10,0 ± 2,0	108,1	70	**
	+	Kontrolle	5,0 ± 1,8	53,3	132	***
	+	<i>vit-3</i>	4,8 ± 1,4	51,2	58	***, ns
	+	<i>vit-5</i>	4,3 ± 1,6	45,9	78	***, ns
<i>daf-16</i> (CF1038)	-	Kontrolle	9,5 ± 1,0	100,0	62	
	-	<i>vit-3</i>	10,0 ± 1,1	105,5	41	ns
	-	<i>vit-5</i>	9,6 ± 0,7	101,1	42	ns
	+	Kontrolle	4,2 ± 1,2	44,0	59	***
	+	<i>vit-3</i>	4,7 ± 1,1	49,1	38	***, ns
	+	<i>vit-5</i>	4,1 ± 1,7	43,2	40	***, ns

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * und ⚡ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. Kontrolle + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.6 Mittlere Lebensspannen der *vit-2*-Deletionsmutante unter Hitzestress nach *P. luminescens*-Exposition und *daf*-RNAi.

Stamm	PL	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
<i>vit-2</i> (RB2365)	-	Kontrolle	8,9 ± 1,6	100,0	104	
	-	<i>daf-9</i>	8,7 ± 1,0	98,2	40	ns
	-	<i>daf-12</i>	9,3 ± 1,7	104,4	61	ns
	-	<i>daf-16</i>	8,6 ± 0,7	96,8	42	ns
	+	Kontrolle	4,0 ± 1,1	45,6	79	***
	+	<i>daf-9</i>	4,2 ± 1,5	47,2	39	***, ns
	+	<i>daf-12</i>	4,8 ± 1,4	54,1	38	***, ♂♂♂
	+	<i>daf-16</i>	5,3 ± 1,6	59,9	37	***, ♂♂♂

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * und ♂ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. Kontrolle + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.7 Mittlere Lebensspannen des Wildtyps unter Hitzestress bei *P. luminescens* Exposition, *vit-6*-RNAi und Applikation von Ascorbinsäure (AA).

Stamm	Exposition	PL	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp (N2)	AA [100 µM]	-	Kontrolle	9,3 ± 1,8	100,0	40	
	AA [100 µM]	-	<i>vit-6</i>	9,5 ± 2,0	105,6	37	
	AA [100 µM]	+	Kontrolle	4,6 ± 1,8	51,1	73	***
	AA [100 µM]	+	<i>vit-6</i>	4,4 ± 1,8	48,9	40	***, ns

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **AA:** Ascorbinsäure, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * und ♂ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. Kontrolle + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.8 Mittlere Lebensspannen der Wildtyp-Tiere nach Cholesterol-Depletion unter Hitzestress.

Stamm	Exposition	PL	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	Kontrolle	-	9,7 ± 1,6	100,0	117	
	ohne Cholesterol	-	8,1 ± 1,5	83,4	89	***
	Kontrolle	+	5,0 ± 1,7	51,5	51	***
	ohne Cholesterol	+	3,1 ± 1,4	32,0	58	***, ♂♂♂

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * und ♂ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. Kontrolle + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.9 Mittlere Lebensspannen der Wildtyp-Tiere ohne Cholesterolgabe unter Hitzestress bei zeitgleicher *vit-6*-RNAi und *P. luminescens*-Inkubation.

Stamm	Exposition	PL	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	ohne Cholesterol	-	Kontrolle	8,1 ± 1,5	100,0	89	
	ohne Cholesterol	-	<i>vit-6</i>	8,0 ± 1,2	98,8	108	ns
	ohne Cholesterol	+	Kontrolle	3,1 ± 1,4	38,3	58	***
	ohne Cholesterol	+	<i>vit-6</i>	3,3 ± 1,3	40,7	47	***, ns

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * und x zeigen signifikante Unterschiede bei Cholesterolmangel vs. Kontrolle bzw. Kontrolle + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.10 Mittlere Lebensspannen der Wildtyp-Tiere bei Applikation unterschiedlicher Cholesterol-Konzentrationen unter Hitzestress.

Stamm	Exposition	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	Cholesterol [5 µg/ml]	8,8 ± 0,8	100,0	45	
	ohne Cholesterol	6,7 ± 1,0	76,1	64	***
	Cholesterol [1,5 µg/ml]	8,2 ± 0,9	93,2	47	**
	Cholesterol [2,5 µg/ml]	8,7 ± 1,0	98,9	65	ns
	Cholesterol [3,5 µg/ml]	8,7 ± 0,8	98,9	58	ns

N: Anzahl der Würmer, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * zeigt signifikante Unterschiede vs. Kontrolle an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.11 Mittlere Lebensspannen *vit-6* defizienter Wildtyp-Tiere nach *P. luminescens*-Inkubation und verminderter Cholesterol-Applikation unter Hitzestress.

Stamm	Exposition	PL	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	Cholesterol [2,5 µg/ml]	-	Kontrolle	9,8 ± 0,9	100,0	66	
	Cholesterol [2,5 µg/ml]	-	<i>vit-6</i>	9,9 ± 0,8	101,0	68	ns
	Cholesterol [2,5 µg/ml]	+	Kontrolle	7,5 ± 1,5	76,5	71	***
	Cholesterol [2,5 µg/ml]	+	<i>vit-6</i>	7,8 ± 1,2	79,6	72	***, ns

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * und x zeigen signifikante Unterschiede vs. Cholesterol [2,5 µg/ml] bzw. Cholesterol [2,5 µg/ml] + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.12 Mittlere Lebensspannen bei erhöhter Cholesterol-Exposition in Wildtyp-Tieren unter Hitzestress.

Stamm	Exposition	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	Cholesterol [5 µg/ml]	9,7 ± 1,6	100,0	117	
	Cholesterol [50 µg/ml]	9,5 ± 1,4	97,9	83	ns
	Cholesterol [250 µg/ml]	9,3 ± 1,6	95,9	73	ns
	Cholesterol [500 µg/ml]	9,7 ± 1,1	100,1	72	ns

N: Anzahl der Würmer, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * zeigt signifikante Unterschiede vs. Kontrolle an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.13 Mittlere Lebensspannen bei Inkubation mit erhöhter Cholesterolkonzentration und zeitgleicher vit-6-RNAi und P. luminescens-Infektion in C. elegans unter Hitzestress.

Stamm	PL	Cholesterol	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp(N2)	-	5 [µg/ml]	K	9,7 ± 1,6	100,0	117	
	-	250 [µg/ml]	K	8,9 ± 2,0	92,3	77	*
	-	500 [µg/ml]	K	9,7 ± 1,1	100,1	72	ns
	+	5 [µg/ml]	K	5,0 ± 1,7	51,3	51	***
	+	250 [µg/ml]	K	5,9 ± 1,7	60,7	59	***α
	+	500 [µg/ml]	K	6,1 ± 2,0	63,4	58	***αα
	+	5 [µg/ml]	vit-6	3,4 ± 1,4	34,9	34	***ααα
	+	250 [µg/ml]	vit-6	6,8 ± 1,4	70,6	55	***ααα
	+	500 [µg/ml]	vit-6	6,4 ± 2,2	65,8	37	***ααα

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **K:** Kontrolle, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. α zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. Kontrolle + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.14 Mittlere Lebensspannen von C. elegans N2 nach vit-6-RNAi, zeitgleicher Cholesterol-Applikation [50 µg/ml] und P. luminescens-Infektion unter Hitzestress.

Stamm	PL	Cholesterol	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp (N2)	-	5 [µg/ml]	K	9,1 ± 1,3	100,0	34	
	-	5 [µg/ml]	vit-6	9,3 ± 1,2	102,1	38	ns
	+	5 [µg/ml]	K	7,5 ± 1,3	82,4	36	***
	+	5 [µg/ml]	vit-6	4,5 ± 1,1	49,5	42	***ααα
	-	50 [µg/ml]	K	9,0 ± 1,4	100,0	98	
	-	50 [µg/ml]	vit-6	9,1 ± 0,8	101,1	76	***
	+	50 [µg/ml]	K	5,7 ± 1,5	63,3	42	***
	+	50 [µg/ml]	vit-6	3,8 ± 1,1	42,2	82	***ααα

N: Anzahl der Würmer, **K:** Kontrolle, **PL:** *P. luminescens*, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. α zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. Kontrolle + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.15 Mittlere Lebensspannen der *rme-2*-Deletionsmutante und des Wildtyps unter Hitzestress bei *P. luminescens*-Exposition.

Stamm	Exposition	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	-	9,4 ± 0,9	100,0	65	
	<i>P. luminescens</i>	5,4 ± 2,1	57,4	53	***
<i>rme-2</i> (DH1390)	-	9,6 ± 0,8	102,1	76	ns
	<i>P. luminescens</i>	3,4 ± 1,1	36,2	54	***,⚡⚡⚡

N: Anzahl der Würmer, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * und ⚡ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. Kontrolle + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.16 Mittlere Lebensspannen der *rme-2*-Deletionsmutante unter Hitzestress nach *P. luminescens*-Exposition und *vit-6*-RNAi.

Stamm	Exposition	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
<i>rme-2</i> (DH1390)	-	Kontrolle	9,6 ± 0,8	100,0	76	
	-	<i>vit-6</i>	9,5 ± 0,9	99,0	54	ns
	<i>P. luminescens</i>	Kontrolle	3,4 ± 1,1	35,4	73	***
	<i>P. luminescens</i>	<i>vit-6</i>	2,7 ± 0,5	28,1	46	***,⚡⚡⚡

N: Anzahl der Würmer, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * und ⚡ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. Kontrolle + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.17 Mittlere Lebensspannen von N2 unter Hitzestress nach 24 h bzw. 4 Tagen Inkubation mit 17β-Östradiol.

Stamm	Exposition	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2		11,3 ± 0,7	100,0	70	
	17β-Östradiol 0,1 μM	11,0 ± 0,8	97,3	39	ns
	17β-Östradiol 1 μM	11,3 ± 0,9	100,0	33	ns
	17β-Östradiol 10 μM	11,3 ± 1,0	100,0	38	ns
	17β-Östradiol 10 μM, 4 Tage	10,9 ± 0,9	96,5	69	ns

N: Anzahl der Würmer, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * zeigt signifikante Unterschiede vs. Kontrolle an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.18 Mittlere Lebensspannen von *C. elegans* N2 unter Hitzestress nach Inkubation mit 17 β -Östradiol [10 μ M] und *P. luminescens*.

Stamm	Exposition	PL	MLS \pm SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp	-	-	9,7 \pm 1,2	100,0	74	
	-	+	4,6 \pm 2,4	47,4	43	***
	17 β -Östradiol	+	8,1 \pm 2,6	83,5	58	*** $\mu\mu\mu$

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **MLS \pm SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. μ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. Kontrolle + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.19 Mittlere Lebensspannen von N2 Nematoden unter Hitzestress nach *vit-2*-RNAi sowie 17 β -Östradiol- [10 μ M] und 24 h *P. luminescens*-Inkubation.

Stamm	Exposition	PL	RNAi	MLS \pm SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	-	-	Kontrolle	10,2 \pm 1,1	100,0	77	
	-	+	Kontrolle	5,9 \pm 2,0	57,8	74	***
	-	+	<i>vit-2</i>	4,8 \pm 1,8	47,1	69	***
	17 β -Östradiol	+	<i>vit-2</i>	4,9 \pm 1,6	48,0	75	***

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **MLS \pm SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * zeigt signifikante Unterschiede vs. Kontrolle an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.20 Mittlere Lebensspannen von *C. elegans* unter Hitzestress nach *nhr-14*-RNAi und *P. luminescens*-Inkubation sowie nach Kombination.

Stamm	Exposition	RNAi	MLS \pm SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	-	Kontrolle	9,6 \pm 0,9	100,0	77	
	-	<i>nhr-14</i>	10,3 \pm 0,9	107,3	68	**
	<i>P. luminescens</i>	Kontrolle	4,7 \pm 1,5	49,0	65	***
	<i>P. luminescens</i>	<i>nhr-14</i>	4,4 \pm 1,9	45,8	70	***

N: Anzahl der Würmer, **MLS \pm SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. μ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. Kontrolle + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.21 Mittlere Lebensspannen von *C. elegans* N2 nach *nhr-14*-RNAi und 17 β -Östradiol-Applikation nach *P. luminescens*-Infektion unter Hitzestress.

Stamm	Exposition	PL	RNAi	MLS \pm SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	-	-	<i>nhr-14</i>	11,7 \pm 0,9	100,0	37	
	17 β -Östradiol	-	<i>nhr-14</i>	11,0 \pm 1,0	94,2	70	ns
	-	+	<i>nhr-14</i>	8,4 \pm 1,4	71,6	25	***
	17 β -Östradiol	+	<i>nhr-14</i>	10,6 \pm 2,3	90,2	33	** $\mu\mu\mu$

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **MLS \pm SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zu *nhr-14*-RNAi, * bzw. μ zeigen signifikante Unterschiede vs. *nhr-14*-RNAi bzw. *nhr-14*-RNAi + *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.22 Mittlere Lebensspannen von *C. elegans* unter Hitzestress nach *P. luminescens*-Behandlung und Applikation von Genistein [100 μ M].

Stamm	Exposition	PL	MLS \pm SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	-	-	11,3 \pm 1,2	100,0	77	
	Genistein	-	11,8 \pm 1,1	104,6	80	ns
	-	+	6,4 \pm 1,9	56,9	90	***
	Genistein	+	5,6 \pm 1,3	49,7	60	*** μ

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **MLS \pm SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * und μ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. *P. luminescens* an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle B 7.23 Mittlere Lebensspannen von *C. elegans* unter Hitzestress nach Genistein [100 μ M] Behandlung, Applikation von *P. luminescens* und *vit-6*-RNAi.

Stamm	Exposition	PL	RNAi	MLS \pm SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	-	+	Kontrolle	6,4 \pm 1,9	100	90	
	Genistein	+	Kontrolle	5,6 \pm 1,3	87,5	60	*
	-	+	<i>vit-6</i>	5,4 \pm 1,6	84,4	31	*
	Genistein	+	<i>vit-6</i>	3,9 \pm 1,0	60,9	30	*** $\mu\mu\mu$

N: Anzahl der Würmer, **PL:** *P. luminescens*, **MLS \pm SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zu *P. luminescens*, * und μ zeigen signifikante Unterschiede vs. *P. luminescens* bzw. *P. luminescens* + Genistein an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

7.3 Appendix C Ergebnisse - *zmp-2*-RNAi

Tabelle C 7.1 Mittlere Lebensspannen nach *zmp-2*-RNAi in *C. elegans* unter Hitzestress.

Stamm	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	Kontrolle	10,1 ± 1,4	100,0	178	
	<i>zmp-2</i>	7,0 ± 2,3	68,8	97	***
	Kontrolle + <i>zmp-2</i>	8,9 ± 1,6	88,3	81	***, ꜠꜠꜠

N: Anzahl der Würmer, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. ꜠ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. *zmp-2*-RNAi an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle C 7.2 Mittlere Lebensspannen von *C. elegans* unter Hitzestress bei *zmp-2*-RNAi und zusätzlicher *vit*-RNAi.

Stamm	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	Kontrolle	10,4 ± 1,5	100	178	
	<i>zmp-2</i> + K	7,0 ± 2,3	68,8	97	***
	<i>vit-3</i> + K	9,7 ± 1,7	93,7	79	*
	<i>vit-3</i> + <i>zmp-2</i>	9,9 ± 2,0	97,3	113	꜠꜠꜠
	<i>vit-5</i> + K	10,9 ± 1,1	107,5	105	***
	<i>vit-5</i> + <i>zmp-2</i>	9,6 ± 2,6	94,9	70	꜠꜠꜠
	<i>vit-6</i> + K	10,7 ± 1,0	103,1	79	ns
	<i>vit-6</i> + <i>zmp-2</i>	11,6 ± 1,2	114,1	81	***, ꜠꜠꜠
<i>vit-2</i> (RB2365)	Kontrolle	8,9 ± 1,6	85,5	104	
	<i>zmp-2</i>	8,7 ± 1,8	83,7	44	ns

N: Anzahl der Würmer, **K:** Kontrolle, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. ꜠ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. *zmp-2*-RNAi an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle C 7.3 Mittlere Lebensspannen nach *zmp-2*-RNAi in Wildtyp-Tieren und Deletionsmutanten unter Hitzestress.

Stamm	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	Kontrolle	10,1 ± 1,4	100,0	178	
	<i>zmp-2</i>	7,0 ± 2,3	68,8	97	***
<i>daf-9</i> (DR2281)	Kontrolle	9,5 ± 1,8	93,6	55	*
	<i>zmp-2</i>	5,9 ± 2,2	58,5	74	***,⊘⊘⊘
<i>daf-12</i> (AA1)	Kontrolle	9,3 ± 1,9	91,8	126	**
	<i>zmp-2</i>	6,0 ± 2,4	59,5	58	***,⊘
<i>daf-16</i> (CF1038)	Kontrolle	9,5 ± 1,0	94,1	62	***
	<i>zmp-2</i>	9,5 ± 1,3	94,2	41	***,⊘⊘⊘
Wildtyp N2	<i>daf-16</i> + Kontrolle	10,3 ± 1,0	101,9	39	ns
	<i>daf-16</i> + <i>zmp-2</i>	10,0 ± 1,1	98,9	35	ns

N: Anzahl der Würmer, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. ⊘ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. *zmp-2*-RNAi im Wildtyp an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle C 7.4 Mittlere Lebensspannen nach RNAi von *zmp-2* und 14-3-3-Proteinen im Wildtyp unter Hitzestress.

Stamm	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	Kontrolle	9,8 ± 1,3	100,0	35	
	<i>zmp-2</i> + K	7,2 ± 2,3	73,1	38	***
	<i>ftt-2</i> + K	9,3 ± 1,4	95,1	75	
	<i>ftt-2</i> + <i>zmp-2</i>	9,1 ± 1,1	93,1	71	⊘⊘⊘
	<i>par-5</i> + K	8,9 ± 1,0	91,0	76	**
	<i>par-5</i> + <i>zmp-2</i>	8,9 ± 1,1	90,8	77	⊘⊘⊘
	<i>sir-2.1</i> + K	9,0 ± 2,0	91,2	76	**
	<i>sir-2.1</i> + <i>zmp-2</i>	9,4 ± 1,9	95,9	73	⊘⊘⊘

N: Anzahl der Würmer, **K:** Kontrolle, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. ⊘ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. *zmp-2*-RNAi an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle C 7.5 Mittlere Lebensspannen nach *zmp-2*- und zeitgleicher *daf-16*-RNAi in Deletionsmutanten unter Hitzestress.

Stamm	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
<i>daf-9</i> (DR2281)	Kontrolle	10,0 ± 1,6	100,0	66	
	<i>zmp-2</i> + K	5,2 ± 1,4	53,0	66	***
	<i>daf-16</i> + K	9,1 ± 1,3	91,8	69	***
	<i>daf-16</i> + <i>zmp-2</i>	5,3 ± 1,2	53,8	42	***
<i>daf-12</i> (AA1)	Kontrolle	9,3 ± 1,9	100,0	126	
	<i>zmp-2</i> + K	4,4 ± 1,4	51,5	110	***
	<i>daf-16</i> + K	8,9 ± 1,8	105,1	107	***
	<i>daf-16</i> + <i>zmp-2</i>	5,4 ± 1,8	63,0	113	***,⍺⍺⍺

N: Anzahl der Würmer, **K:** Kontrolle, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. ⍺ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. *zmp-2*-RNAi an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle C 7.6 Mittlere Lebensspannen unterschiedlicher *daf*-Deletionsmutanten unter Hitzestress bei *zmp-2*-RNAi und gleichzeitiger *vit*-RNAi.

Stamm	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
<i>daf-9</i> (DR2281)	Kontrolle	9,6 ± 1,7	100,0	54	
	<i>zmp-2</i> + K	5,9 ± 2,2	62,5	74	***
	<i>vit-3</i> + K	9,2 ± 2,2	96,0	38	ns
	<i>vit-3</i> + <i>zmp-2</i>	5,2 ± 2,4	54,5	76	***
	<i>vit-5</i> + K	9,4 ± 1,6	98,6	40	ns
	<i>vit-5</i> + <i>zmp-2</i>	7,6 ± 2,4	80,5	39	***,⍺⍺⍺
<i>daf-12</i> (AA1)	Kontrolle	9,3 ± 1,9	100,0	126	
	<i>zmp-2</i> + K	6,0 ± 2,4	64,8	58	***
	<i>vit-3</i> + K	10,4 ± 2,1	112,3	54	***
	<i>vit-3</i> + <i>zmp-2</i>	5,1 ± 1,5	54,9	61	***,⍺⍺
	<i>vit-5</i> + K	10,0 ± 2,0	108,1	70	**
	<i>vit-5</i> + <i>zmp-2</i>	5,25 ± 1,74	56,5	52	***,⍺
<i>daf-16</i> (CF1038)	Kontrolle	9,52 ± 0,99	100,0	62	
	<i>zmp-2</i> + K	9,54 ± 1,25	100,1	41	ns
	<i>vit-3</i> + K	10,04 ± 1,13	105,5	41	*
	<i>vit-3</i> + <i>zmp-2</i>	9,00 ± 1,78	94,5	39	ns
	<i>vit-5</i> + K	9,62 ± 0,69	101,1	42	ns
	<i>vit-5</i> + <i>zmp-2</i>	9,79 ± 1,38	102,8	35	ns

N: Anzahl der Würmer, **K:** Kontrolle, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. ⍺ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. *zmp-2*-RNAi an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle C 7.7 Mittlere Lebensspannen von *C. elegans* unter Hitzestress bei *zmp-2*-RNAi und gleichzeitiger Ascorbinsäure-Applikation.

Stamm	RNAi	Ascorbinsäure	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	Kontrolle	-	9,8 ± 1,2	100,0	26	
	Kontrolle	AA 100 µM	9,0 ± 1,8	92,1	40	ns
	Kontrolle	AA 1 mM	9,6 ± 1,1	98,7	38	ns
<i>zmp-2</i>	<i>zmp-2</i>	-	8,2 ± 1,5	84,4	38	***
	<i>zmp-2</i>	AA 100 µM	9,9 ± 1,2	101,3	35	ns, ♂♂♂
	<i>zmp-2</i>	AA 1 mM	9,0 ± 1,9	92,2	38	ns, ♂♂

N: Anzahl der Würmer, **AA:** Ascorbinsäure, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. ♂ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. *zmp-2*-RNAi an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle C 7.8 Mittlere Lebensspannen der Wildtyp-Tiere unter Hitzestress nach *vit-6*- und *zmp-2*-RNAi bei geringer Cholesterolgabe.

Stamm	Exposition	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	Cholesterol [2,5 µg/ml]	Kontrolle	9,8 ± 0,8	100,0	97	
	Cholesterol [2,5 µg/ml]	<i>zmp-2</i> + K	8,4 ± 0,9	85,7	101	***
	Cholesterol [2,5 µg/ml]	<i>vit-6</i> + K	9,9 ± 1,2	101,0	98	
	Cholesterol [2,5 µg/ml]	<i>zmp-2</i> + <i>vit-6</i>	8,5 ± 0,8	86,7	97	***

N: Anzahl der Würmer, **K:** Kontrolle, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. ♂ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. *zmp-2*-RNAi an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle C 7.9 Mittlere Lebensspannen von *C. elegans* N2 unter Hitzestress bei *zmp-2*-RNAi, gleichzeitiger *vit-6*-RNAi und erhöhter Cholesterolgabe [250, 500µg/ml].

Stamm	Cholesterol [µg/ml]	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp (N2)	5	Kontrolle	9,7 ± 1,6	100,0	117	
	250	Kontrolle	8,9 ± 2,0	92,3	77	*
	500	Kontrolle	9,7 ± 1,1	100,1	72	ns
	5	<i>vit-6</i> + K	9,7 ± 1,3	100,4	103	ns
	250	<i>vit-6</i> + K	8,2 ± 2,0	85,4	112	***
	500	<i>vit-6</i> + K	7,9 ± 1,8	82,0	89	***
	5	<i>zmp-2</i> + K	7,8 ± 1,8	80,5	30	***
	250	<i>zmp-2</i> + K	8,5 ± 1,4	87,7	43	***
	500	<i>zmp-2</i> + K	7,6 ± 1,5	78,5	49	***
	5	<i>vit-6</i> + <i>zmp-2</i>	11,0 ± 1,6	114,2	101	***
	250	<i>vit-6</i> + <i>zmp-2</i>	5,6 ± 2,3	58,4	59	***, ♂♂♂
	500	<i>vit-6</i> + <i>zmp-2</i>	5,1 ± 2,0	52,7	120	***, ♂♂♂

N: Anzahl der Würmer, **K:** Kontrolle, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. ♂ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. *zmp-2*-RNAi an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle C 7.10 Mittlere Lebensspannen von *C. elegans* N2 unter Hitzestress nach erhöhter Cholesterolgabe [50 µg/ml] und *zmp-2*-RNAi und/oder *vit-6*-RNAi.

Stamm	Cholesterol	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp (N2)	50 [µg/ml]	K	9,0 ± 1,4	100,0	98	
	50 [µg/ml]	<i>zmp-2</i> + K	7,6 ± 2,3	84,4	46	***
	50 [µg/ml]	<i>vit-6</i> + K	8,5 ± 1,1	94,4	38	***
	50 [µg/ml]	<i>zmp-2</i> + <i>vit-6</i>	7,1 ± 1,9	78,9	35	***

N: Anzahl der Würmer, **K:** Kontrolle, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. ♂ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. *zmp-2*-RNAi an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle C 7.11 Mittlere Lebensspannen der *rme-2*-Deletionsmutante unter Hitzestress bei *zmp-2*-RNAi und zeitgleicher *vit-6*-RNAi.

Stamm	RNAi	MLS ± SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
<i>rme-2</i> (DH1390)	Kontrolle	9,6 ± 0,7	100,0	76	
	<i>zmp-2</i> + K	9,6 ± 0,8	100,0	76	ns
	<i>vit-6</i> + K	9,5 ± 0,9	99,0	73	ns
	<i>zmp-2</i> + <i>vit-6</i>	9,5 ± 0,8	99,0	72	ns

N: Anzahl der Würmer, **K:** Kontrolle, **MLS ± SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * zeigt signifikante Unterschiede vs. Kontrolle an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle C 7.12 Mittlere Lebensspannen von *C. elegans* N2 unter Hitzestress nach *zmp-2*-RNAi und 4-tägiger 17 β -Östradiol-Inkubation.

Stamm	Exposition	RNAi	MLS \pm SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	-	Kontrolle	10,2 \pm 1,0	100,0	92	
	-	<i>zmp-2</i>	6,3 \pm 2,8	61,8	51	***
	17 β -Östradiol [10 μ M]	<i>zmp-2</i>	8,9 \pm 1,9	87,3	54	***, $\mu\mu\mu$
	-	<i>zmp-2</i> + K	8,9 \pm 1,6	87,3	81	***
	17 β -Östradiol [10 μ M]	<i>zmp-2</i> + K	8,9 \pm 1,9	87,3	54	***

N: Anzahl der Würmer, **K:** Kontrolle, **MLS \pm SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * bzw. μ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. *zmp-2*-RNAi an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Tabelle C 7.13 Mittlere Lebensspannen von *C. elegans* unter Hitzestress nach Genistein-Applikation [100 μ M] bei zeitgleicher *zmp-2*-RNAi.

Stamm	Exposition	RNAi	MLS \pm SD [h]	MLS [%]	N	Signifikanz
Wildtyp N2	-	Kontrolle	11,3 \pm 1,2	100,0	77	
	Genistein	Kontrolle	11,8 \pm 1,1	104,6	80	ns
	-	<i>zmp-2</i>	8,6 \pm 2,0	76,3	52	***
	Genistein	<i>zmp-2</i>	9,8 \pm 1,5	86,7	77	***, $\mu\mu\mu$

N: Anzahl der Würmer, **MLS \pm SD [h]:** Mittlere Lebensspanne mit Standardabweichung, **MLS [%]:** prozentuale Änderung der mittleren Lebensspanne zur Kontrolle, * und μ zeigen signifikante Unterschiede vs. Kontrolle bzw. *zmp-2*-RNAi an ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlichen bedanken, die durch ihre vielfältige Unterstützung zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Uwe Wenzel für die Ermöglichung der Promotion, die Übertragung des interessanten Themas und die Bereitstellung der ausgezeichneten Forschungsmöglichkeiten. Seine konstruktive Unterstützung, die jederzeit fachliche Auseinandersetzung mit der Thematik und die hieraus resultierenden unzähligen fruchtbaren Gespräche und Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

An zweiter Stelle, aber nicht weniger herzlich, möchte ich mich bei Herrn Dr. Michael Boll als geschätzten Ansprechpartner für die konstruktiven Gespräche und Anregungen bedanken. Sein fachliches Know-how im Rahmen der experimentellen Untersuchungen und die bereitwillige intensive Unterstützung tragen einen großen Anteil am Erfolg dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Wilke möchte ich für das Übernehmen des Koreferats danken, sowie Frau Prof. Dr. Sylvia Schnell als auch Herrn Prof. Dr. Andreas Vilcinskas für den Einsatz als Prüfer.

Elena Löffler möchte ich herzlichst für die kritische Durchsicht meiner Manuskripte und die außerordentliche Hilfsbereitschaft danken. Sie stand ebenso wie Marco Schuhmacher und Charlotte Regitz immer in freundschaftlicher Weise mit Rat und Tat zur Seite. Mein Dank geht ebenfalls an die fleißige und immer hilfsbereite Eva Czynski sowie Alexandra Neeb. Weiterhin bedanke ich mich bei meinen ehemaligen aber nicht minder fleißigen Masterstudenten Charlotte Regitz, Mareike Kahl, Rebecca Kull und Michael Werthebach. Darüber hinaus ein ganz großes Dankeschön an allen Mitarbeiter und Masterstudenten des Lehrstuhls für Molekulare Ernährungsforschung für die stets angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre, die sehr gute Zusammenarbeit und die vielen schönen gemeinsame Momente, welche mir nicht nur die Abende und Wochenenden im Labor erleichterten. Weiterhin danke und drücke ich Janina Preuß für ihre ständige Hilfsbereitschaft, aber eigentlich für so viel mehr!

Bei den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Friedt und Prof. Dr. Vilcinskas möchte ich mich für die freundliche und unkomplizierte Unterstützung und Zusammenarbeit bedanken. Der früheren Arbeitsgruppe von PD Dr. Ralf Pätzold danke ich für die kulinarischen Meilensteine und gemeinsamen unterhaltsamen Aktivitäten.

Der größte Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und besonders Peter Krause für das entgegengebrachte Verständnis, den Rückhalt und die uneingeschränkte moralische Unterstützung.

ERKLÄRUNG

Erklärung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis

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

Gießen, 30.09.2011

Unterschrift: _____