

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

**Einfluss HIF-regulierter RNA-bindender Proteine
sowie der H₂S-Donatoren Mesna und Kala namak
auf die Stressresistenz von *Caenorhabditis elegans***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Tim Krüger
aus Herford

promoviert am 16. November 2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2022

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Durchführung meines Promotionsvorhabens unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Reza Esmailie, der mir als hervorragender persönlicher Mentor sowohl bei der Planung und Durchführung von Experimenten als auch bei der Anfertigung der Dissertationsschrift jederzeit zur Seite stand. Seine freundliche, geduldige und stets hilfsbereite Art waren für mich eine wichtige Stütze.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Roman-Ulrich Müller für die stets umfassende und kompetente Betreuung bedanken. Als exzellenter Arzt und Wissenschaftler ist er für mich ein Vorbild für meine eigene berufliche Zukunft.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Leitung des nephrologischen Forschungslabors für die Bereitstellung der räumlichen und materiellen Ressourcen bedanken, ohne die ich mein Promotionsvorhaben nicht hätte durchführen können.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen für die emotionale Unterstützung meiner Familie und Freunde bedanken. Ihr habt mir die nötige Kraft gegeben, um auch in herausfordernden Zeiten nie den Glauben an mich selbst zu verlieren.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 7 |
| 1. ZUSAMMENFASSUNG | 9 |
| 2. EINLEITUNG | 11 |
| 2.1. Aufbau und Funktion der Niere | 11 |
| 2.2. Pathophysiologie des akuten Nierenversagens | 12 |
| 2.3. Regulation und Funktion des Hypoxie-induzierten Faktors | 13 |
| 2.4. Präkonditionierungsstrategien zur Steigerung der Nephroprotektion | 15 |
| 2.5. Potential RNA-bindender Proteine in der Nephroprotektion | 16 |
| 2.6. Potential von Schwefelwasserstoff-Donatoren in der Nephroprotektion | 18 |
| 2.7. <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus | 21 |
| 2.8. Fragestellungen und Ziel der Arbeit | 23 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 25 |
| 3.1. Material | 25 |
| 3.1.1. Chemikalien | 25 |
| 3.1.2. Verbrauchsmaterialien | 28 |
| 3.1.3. Laborgeräte | 30 |
| 3.1.4. Primer | 32 |
| 3.1.5. <i>Caenorhabditis elegans</i> Stämme | 33 |
| 3.1.6. <i>Escherichia coli</i> Stämme | 34 |
| 3.1.7. Software | 35 |
| 3.1.8. Lösungen und Puffer | 36 |
| 3.2. Methoden | 41 |
| 3.2.1. Polymerase-Kettenreaktion | 41 |
| 3.2.2. Agarose-Gelelektrophorese | 41 |
| 3.2.3. DNA-Sequenzierung | 42 |
| 3.2.4. Klonierung von RNAi-Plasmiden | 42 |
| 3.2.5. Kultivierung von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 44 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.6. | Herstellung von Agarplatten | 44 |
| 3.2.7. | Generierung von <i>Caenorhabditis elegans</i> Männchen | 45 |
| 3.2.8. | Kreuzung von <i>Caenorhabditis elegans</i> Stämmen | 45 |
| 3.2.9. | Synchronisierung von <i>Caenorhabditis elegans</i> Populationen | 45 |
| 3.2.10. | Kryokonservierung von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 46 |
| 3.2.11. | Wurmlyse in <i>Caenorhabditis elegans</i> | 46 |
| 3.2.12. | RNA-Interferenz in <i>Caenorhabditis elegans</i> | 46 |
| 3.2.13. | Bestimmung der mittleren Lebensspanne von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 46 |
| 3.2.14. | Hitzeschock in <i>Caenorhabditis elegans</i> | 46 |
| 3.2.15. | Messung der endogenen H ₂ S-Produktion in <i>Caenorhabditis elegans</i> | 47 |
| 3.2.16. | Anlegung von Bakterienflüssigkulturen | 47 |
| 3.2.17. | Kryokonservierung von Bakterien | 48 |
| 3.2.18. | Plasmidpräparation | 48 |
| 3.2.19. | Generierung von chemisch kompetenten Bakterien | 48 |
| 3.2.20. | Statistik | 49 |
| 3.2.21. | Abbildungen | 49 |
| 4. | ERGEBNISSE | 50 |
| 4.1. | Einfluss HIF-regulierter RNA-bindender Proteine auf die Stressresistenz von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 50 |
| 4.1.1. | Der Funktionsverlust HIF-regulierter RNA-bindender Proteine beeinflusst die Thermotoleranz von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 50 |
| 4.1.2. | Generierung eines <i>cysl-2</i> RNAi-Plasmids | 51 |
| 4.1.3. | Die RNA-Interferenz HIF-regulierter RNA-bindender Proteine bestätigt deren thermoregulatorische Funktion in <i>Caenorhabditis elegans</i> | 52 |
| 4.1.4. | Die Wahl des Futterbakteriums beeinflusst die Thermotoleranz von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 54 |
| 4.1.5. | Etablierung von OP50(xu363) | 55 |
| 4.1.6. | RNAi-Bakterien beeinflussen unabhängig vom Nährstoffgehalt die Thermotoleranz von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 56 |
| 4.1.7. | Effekt von OP50(xu363) RNAi-Bakterien auf die Thermotoleranz von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 57 |
| 4.1.8. | Effekt eines Funktionsverlusts HIF-regulierter RNA-bindender Proteine auf die Lebensspanne von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 58 |
| 4.2. | Einfluss der H ₂ S-Donatoren Mesna und Kala namak auf die Stressresistenz von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 62 |
| 4.2.1. | Die Exposition mit Mesna und Kala namak steigert die Thermotoleranz von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 62 |
| 4.2.2. | Generierung einer <i>daf-16(mu86);hif-1(ia4)</i> Loss-of-Function-Mutante | 63 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.2.3. | Der thermoprotektive Effekt von Mesna und Kala namak ist abhängig vom HIF-1 und/oder DAF-16 | 63 |
| 4.2.4. | Messung intrazellulärer H ₂ S-Konzentrationen in <i>Caenorhabditis elegans</i> | 65 |
| 4.2.5. | Etablierung einer Methode zur Messung der endogenen H ₂ S-Produktion in <i>Caenorhabditis elegans</i> | 66 |
| 4.2.6. | Einfluss von Mesna und Kala namak auf die endogene H ₂ S-Produktion in <i>Caenorhabditis elegans</i> | 68 |
| 5. | DISKUSSION | 70 |
| 5.1. | Einfluss HIF-regulierter RNA-bindender Proteine auf die Stressresistenz von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 70 |
| 5.1.1. | Methodische Fehlerquellen des Hitzeschocks | 70 |
| 5.1.2. | HIF-regulierte RNA-bindende Proteine beeinflussen die Thermotoleranz von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 71 |
| 5.1.3. | RNA-Interferenz als Validierungsmethode | 76 |
| 5.1.4. | OP50(xu363) als RNA-Interferenz Bakterien | 78 |
| 5.1.5. | Methodische Fehlerquellen bei der Lebensspannenbestimmung | 80 |
| 5.1.6. | Bedeutung von HIF-regulierten RNA-bindender Proteine in der Vermittlung von Langlebigkeit von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 82 |
| 5.2. | Einfluss der H ₂ S-Donatoren Mesna und Kala namak auf die Stressresistenz von <i>Caenorhabditis elegans</i> | 85 |
| 5.2.1. | Mesna und Kala namak induzieren den HIF-1 und/oder DAF-16 in <i>Caenorhabditis elegans</i> | 85 |
| 5.2.2. | Methodische Fehlerquellen konventioneller H ₂ S-Teststreifen | 86 |
| 5.2.3. | Methodische Schwachstellen bei der Messung der endogenen H ₂ S-Produktion in <i>Caenorhabditis elegans</i> | 87 |
| 5.3. | Aussicht und Limitation | 89 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 90 |
| 7. | ANHANG | 109 |
| 7.1. | Abbildungsverzeichnis | 109 |
| 7.2. | Tabellenverzeichnis | 109 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|-------------------|---|-----------|--|
| AASS | α -Amino adipinsäure-Semialdehyd-Synthase | IGF | Insulin-Wachstumsfaktor (engl. <i>insulin-like growth factor</i>) |
| ANV | akutes Nierenversagen | KDIGO | <i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i> |
| ARGK | Arginininkinase | KG | Körpergewicht |
| ATP | Adenosintriphosphat | LOF | Loss-of-Function |
| CBS | Cystathionin- β -Synthase | 3-MST | 3-Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase |
| CECAD | <i>Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases</i> | mRNA | Boten-RNA (engl. <i>messenger-RNA</i>) |
| <i>C. elegans</i> | <i>Caenorhabditis elegans</i> | n | Gruppengröße |
| CCG | <i>Cologne Center for Genomics</i> | NaHS | Natriumhydrogensulfid |
| CK | Creatin-Kinase | Nephrolab | nephrologisches Forschungslabor der Universität zu Köln |
| CO | Kohlenstoffmonoxid | Nrf2 | Nuklearfaktor (engl. <i>nuclear factor erythroid 2-related factor</i>) |
| COL | Kollagen (engl. <i>collagen</i>) | qPCR | quantitative Echtzeit-PCR |
| CSE | Cystathionin- γ -Lyase | PCR | Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>) |
| CYSL | Cysteinsynthase (engl. <i>cysteine synthase like</i>) | PLP | Pyridoxalphosphat |
| DAF | Dauerstadium-Faktor (engl. <i>dauer formation</i>) | RBP | RNA-bindendes Protein |
| dsRNA | doppelsträngige RNA | RBPom | RNA-bindendes Proteom |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> | RIC | RNA-Interaktom Erfassung (engl. <i>RNA interactome capture</i>) |
| ETHE | Ethylmalonisches-Enzephalopathie-Protein | RNA | Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>) |
| EV | Leervektor (engl. <i>empty vector</i>) | RNAi | RNA-Interferenz |
| FUDR | Floxuridin | ROS | Sauerstoffradikale (engl. <i>reactive oxygen species</i>) |
| GFR | glomeruläre Filtrationsrate | rpm | Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>) |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein | RSM | Replikat-Methode (engl. <i>replica set method</i>) |
| GST | Glutathion-S-Transferase | | |
| HCN | Cyanwasserstoff | | |
| HIF | Hypoxie-induzierter Faktor | | |
| HPGDS | hämatopoetische Prostaglandin D Synthase | | |
| HRE | Hypoxie-responsives Element | | |
| H ₂ S | Schwefelwasserstoff | | |
| HSF | Hitzeschockfaktor | | |

| | |
|------|---|
| SA | Standardabweichung |
| SKN | Skinhead-Protein |
| SQRD | Sulfid-Chinonreduktase (engl. <i>sulfide quinone oxidoreductase</i>) |
| TLM | traditionelle Longitudinalmethode (engl. <i>traditional longitudinal method</i>) |
| UPR | Reaktion auf fehlgefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum (engl. <i>unfolded protein response</i>) |
| VHL | Von-Hippel-Lindau |
| WT | Wildtyp |
| ZFP | Zinkfingerprotein |

Weiterhin wurden allgemein gebräuchliche Abkürzungen, SI- und Maßeinheiten verwendet.

1. Zusammenfassung

Das akute Nierenversagen (ANV) ist eine schwerwiegende renale Erkrankung, die mit einer erhöhten Mortalität und einer reduzierten Lebensqualität assoziiert ist. Sie tritt als Folge verschiedener Stressreize wie beispielsweise renaler Minderperfusion, tubulärer Zellschädigung oder Harnwegsobstruktion auf. Bislang konnten noch keine einheitlichen, effektiven Therapieoptionen klinisch etabliert werden. In tierexperimentellen Studien konnte aber bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1) den Krankheitsverlauf aller Formen des ANV abmildern kann. Die verantwortlichen Mechanismen sind dagegen noch unklar. Als Modellorganismus zur Erforschung renaler Stressresistenz wurde der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) verwendet, dessen Genom viele Orthologe renaler Proteine aufweist.

Eine Analyse von Transkriptomdaten ergab, dass der HIF-1 unter anderem die Genexpression einer Vielzahl von RNA-bindenden Proteinen (RBPs) reguliert. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde deshalb der Einfluss von insgesamt vierzehn HIF-regulierten RBPs auf die Stressresistenz von *C. elegans* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust einzelner Kandidaten die Thermotoleranz des Fadenwurms bidirektional beeinflussen kann. So waren *aass-1(ok926)* Loss-of-Function (LOF)-Mutanten anfälliger und *cysl-2(ok3516)*, *argk-1(ok2973)*, *gst-4(ok2358)* sowie *zfp-3(gk3165)* LOF-Mutanten resistenter gegenüber Hitzestress. Die Ergebnisse konnten mittels Vektor-basierter RNA-Interferenz (RNAi) erfolgreich validiert werden. Die hierfür verwendeten HT115 RNAi-Bakterien besitzen allerdings eine höhere Nährstoffdichte als das reguläre Futterbakterium OP50. Dies kann bekanntermaßen die Thermotoleranz von *C. elegans* beeinflussen und erschwert somit die Vergleichbarkeit beider Methoden. Deshalb wurde mit OP50(xu363) ein nährstoffäquivalenter RNAi-Bakterienstamm im Labor etabliert. Dessen Verfütterung hatte allerdings nicht den gleichen Effekt auf die Thermotoleranz von *C. elegans* wie die vorher untersuchten LOF-Mutationen. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass ein Funktionsverlust verschiedener Kandidaten die Thermotoleranz und Lebensspanne von *C. elegans* unterschiedlich beeinflusst. So wiesen *aass-1(ok926)*, *gst-4(ok2358)* und *col-179(ok3010)* LOF-Mutanten eine unveränderte und *cysl-2(ok3516)* LOF-Mutanten eine verminderte Lebensspanne auf.

Schwefelwasserstoff (H_2S) ist ein hochtoxisches Gas, welches auch endogen im Körper gebildet wird und dort als Gasotransmitter fungiert. Dieser ist über verschiedene Mechanismen, darunter der Aktivierung des HIF-1, an der Vermittlung renaler Stressresistenz beteiligt und kann so bekanntermaßen die Auswirkungen eines ANV abmildern. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde deshalb der Effekt von zwei vielversprechenden H_2S -Donatoren, Mesna und Kala namak, auf die Stressresistenz von *C. elegans* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Exposition mit beiden Substanzen dessen Thermotoleranz signifikant erhöht.

Der protektive Effekt war dabei abhängig vom Vorhandensein der Transkriptionsfaktoren HIF-1 und/oder Dauerstadium-Faktor 16 (DAF-16). Darüber hinaus wurde die Funktionalität konventioneller H₂S-Teststreifen in *C. elegans* evaluiert. Sie zeigten sich nicht dazu geeignet, den Einfluss von Mesna und Kala namak auf dessen intrazelluläre H₂S-Konzentration abzubilden. Dagegen konnte eine Methode zur Messung der endogenen H₂S-Produktion in *C. elegans* erfolgreich im Labor etabliert werden. Sie wurde dazu verwendet, den Einfluss von Mesna und Kala namak auf die endogene H₂S-Produktion in WT-Würmern und *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten zu untersuchen. Die Ergebnisinterpretation wurde allerdings durch die Limitationen der Messmethode erschwert, sodass am Ende keine valide Aussagen getroffen werden konnten.

Zusammenfassend konnten fünf HIF-regulierte RBPs und zwei H₂S-Donatoren identifiziert werden, die an der Vermittlung von Stressresistenz in *C. elegans* beteiligt sind. Damit stellen sie auch potenzielle Kandidaten der Nephroprotektion dar. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit könnten somit perspektivisch zur Entwicklung neuer Therapieverfahren zur Behandlung des ANV beitragen.

2. Einleitung

2.1. Aufbau und Funktion der Niere

Die Niere ist ein bohnenförmiges, paarig angelegtes Organ, das den Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt, den Blutdruck, den Knochenstoffwechsel, die Ausscheidung von Giftstoffen sowie die Erythropoese reguliert.¹ Sie liegt anatomisch unterhalb des Zwerchfells im Retroperitonealraum und wird zusammen mit der Nebenniere von einer Fettkapsel geschützt. Die versorgenden Leitungsbahnen treten am konkaven, medialen Rand gelegenen Hilum in das Nierenbecken ein. Sie leiten rund 20 % des Herzzeitvolums, umgerechnet 1 L/min Blut bzw. 0,6 L/min Plasma, in das Nierenparenchym.² Makroskopisch gliedert sich die Niere in eine außen liegende Rinde und das nach innen zum Hilum gerichtete Mark. Letzteres besteht aus zehn bis zwölf Markpyramiden, deren Spitzen, Papillen genannt, frei in den Hohlraum des Nierenbeckens reichen. Mikroskopisch besteht jede Niere aus ungefähr einer Million Funktionseinheiten, die Nephrone genannt werden (Abb. 1).

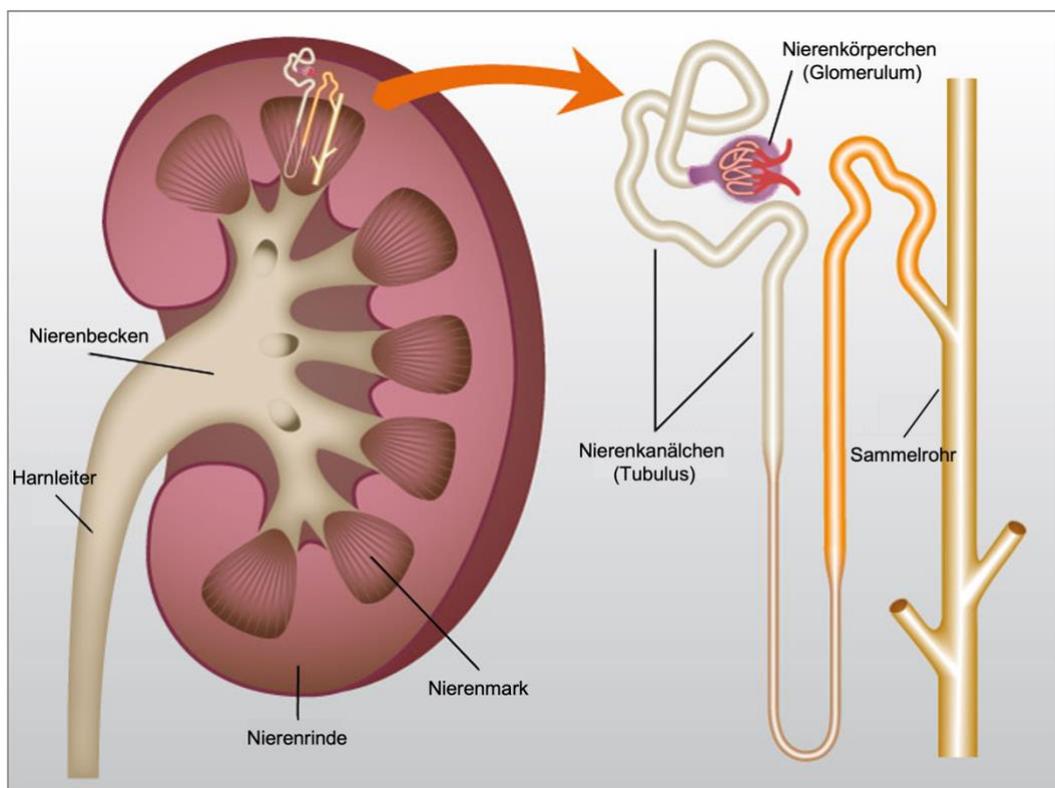


Abb. 1: Aufbau der Niere (in Anlehnung an ³⁾)

Die Niere besteht aus Funktionseinheiten, die Rinde und Mark durchziehen. Diese bestehen aus einem Nierenkörperchen mit angeschlossenem Tubulussystem. Jeweils mehrere Tubuli münden in ein Sammelrohr, das den Endharn in das Nierenbecken transportiert. Von dort aus fließt er in den am medialen Rand gelegenen Harnleiter ab.

Im Nierenkörperchen werden täglich rund 180 L Plasma an der glomerulären Filtrationsbarriere filtriert. Diese besteht aus dem großporigen Gefäßendothel, einer dreischichtigen Basalmembran und einer dünnen Schlitzmembran, die zwischen den Epithelzellen aufgespannt ist.⁴ Im angrenzenden Tubulussystem wird der Primärharn durch gezielte Sekretions- und Resorptionsvorgänge auf rund 1,5 – 2 L Endharn konzentriert. Dieser wird über gemeinsame Sammelrohre in das Nierenbecken ausgeschieden.⁵ Er enthält Abbauprodukte aus Nahrung und Medikamenten, Umweltschadstoffe, Stoffwechselprodukte (zum Beispiel Harnstoff und Kreatinin) sowie bakterielle Nebenprodukte.⁶ Neben der Urinbildung werden im Nierenparenchym auch verschiedene Hormone gebildet. Dazu gehören der Wachstumsfaktor Erythropeitin (Blutbildung), Renin (Blutdruckregulation) und Vitamin D3-Hormonvorstufen (Knochenstoffwechsel).⁷ Aufgrund der vielfältigen Aufgaben der Niere ist eine eingeschränkte Funktionalität, unabhängig von ihrer Ausprägung, mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert.⁸ Ein ANV ist dabei der häufigste Grund für ein nephrologisches Konsil im Krankenhaus.⁹

2.2. Pathophysiologie des akuten Nierenversagens

Das ANV beschreibt eine akut einsetzende Abnahme der Nierenfunktion, die meist über Tage anhält und prinzipiell reversibel ist. Bei schweren Krankheitsverläufen kann sich dagegen eine chronische Nierenerkrankung bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz entwickeln.¹⁰ Unabhängig von der Erholung der Nierenfunktion ist das ANV mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden. Im Krankenhaus sind einer von fünf erwachsenen Patienten von einem ANV betroffen. Auf Intensivstationen erkranken sogar die Hälfte aller Erwachsenen und ein Viertel aller Kinder.¹¹ Als Folge kann es zu Überwässerung, metabolischer Azidose, Elektrolytstörungen und Urämie kommen. Dies bedingt wiederum schwerwiegende Komplikationen wie Herzrhythmusstörungen, Lungen- und Gehirnödeme, Aszites, Blutungen und akutes Lungenversagen.¹² Die Mortalitätsrate hängt dabei von der Schwere des ANV ab und liegt zwischen 5 – 25 %.¹³ Die gemeinnützige Organisation *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) definiert insgesamt drei Schweregrade anhand des Anstiegs des Serum-Kreatinins und/oder der Abnahme der Urinausscheidung (Tabelle 1).¹⁴

Das ANV wird zusätzlich nach dem zugrunde liegenden Pathomechanismus in eine prärenale, intrarenale oder postrenale Form unterteilt.¹⁵ Ein prärenales Nierenversagen (~ 60 %) entsteht durch eine Minderperfusion der Niere. Fällt der arterielle Mitteldruck unter 50 mmHg versagt die autoregulative Anpassung der Gefäßwiderstände. Der effektive Filtrationsdruck reicht nicht mehr aus, um ausreichend Primärharn aus dem Blut zu filtrieren. Es kommt zu einer Retention harnpflichtiger Substanzen und einer verminderten Urinausscheidung. Durch die rechtzeitige Einleitung einer Infusionstherapie mit isotonischer Vollelektrolytlösung kann es zu einer vollständigen Erholung der Nierenfunktion kommen.¹⁶

Tabelle 1: Schweregradeinteilung des ANV (KDIGO)¹⁴

| Grad | Serumkreatinin | Urinausscheidung |
|------|--|--|
| 1 | Anstieg um $\geq 0,3$ mg/dl (26,5 μ mol/L) oder Anstieg auf das 1,5- bis 1,9-Fache des Ausgangswerts | $< 0,5$ ml/kg KG/h für 6 – 12 h |
| 2 | Anstieg auf das 2,0- bis 2,9-Fache des Ausgangswerts | $< 0,5$ ml/kg KG/h für ≥ 12 h |
| 3 | Anstieg auf das $\geq 3,0$ -Fache des Ausgangswerts oder Anstieg auf $\geq 4,0$ mg/dl (353,6 μ mol/L) oder Beginn einer Nierenersatztherapie oder bei Patienten unter 18 Jahren mit Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) auf < 35 ml/min/1,73 m ² | $< 0,3$ ml/kg KG/h für ≥ 24 h oder Anurie für ≥ 12 h |

Ein intrarenales Nierenversagen (~ 35 %) entsteht durch eine direkte Schädigung der Zellen des Nephrons. So kann es entweder nach länger andauernder renaler Minderperfusion im Rahmen schwerer Infekte, Verbrennungen und Operationen oder nach der Verabreichung nephrotoxischer Substanzen zu irreversiblen akuten Tubulusnekrosen kommen. Seltener Ursachen sind das Auftreten eines intrarenalen Nierenversagens im Rahmen einer Glomerulonephritis, interstitiellen Nephritis oder renalen kortikalen Nekrose.¹⁷

Ein postrenales Nierenversagen (~ 5 %) entsteht durch eine Obstruktion der ableitenden Harnwege. Die häufigste Ursache stellt dabei die benigne Prostatahyperplasie bei älteren Männern dar. Weitere Ursachen sind angeborene Fehlbildungen, Tumore, Harnsteine, Blutungen oder ein falsch platzierter oder verstopfter Harnblasenkatheter. Durch den Rückstau von Urin kommt es zu einer Druckerhöhung oberhalb des Abflusshindernisses und sekundär zu einer Abnahme der renalen Durchblutung. Wird die Obstruktion rechtzeitig therapiert, kommt es meistens zu einer vollständigen Erholung der Nierenfunktion.^{18,19}

Aufgrund der vielfältigen Ursachen eines ANV ist die Entwicklung einer universellen Therapie eine große Herausforderung. Tierexperimentelle Studien weisen darauf hin, dass die Aktivierung bestimmter, konservierter Signalwege die renale Stressresistenz erhöhen und dadurch die Inzidenz und den Verlauf eines ANV verbessern könnte. Als vielversprechender Ansatz gilt zurzeit die Entwicklung von Verfahren, die zur Aktivierung des HIF-1 führen.²⁰

2.3. Regulation und Funktion des Hypoxie-induzierten Faktors

Ein renaler Sauerstoffmangel ist häufig zentraler Initiationsfaktor des ANV.²¹ Dies liegt unter anderem an der besonderen Anfälligkeit der Niere für hypoxischen Stress. Das Mark besitzt bereits physiologisch einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck. Ursächlich ist dessen geringe Durchblutung, große Kapillarabstände sowie ein Sauerstoffdiffusionsshunt zwischen den ab- und aufsteigenden Schenkeln der Henle Schleife.²² Die Rinde besitzt dagegen aufgrund ihrer guten Durchblutung einen hohen Sauerstoffpartialdruck. Dieser wird aber auch benötigt, um die zahlreichen Mitochondrien mit ausreichend Sauerstoff für die Adenosintriphosphat (ATP)-

Produktion zu versorgen. ATP wird von Transportproteinen wie der membranständigen Na⁺/K⁺-ATPase für die Aufrechterhaltung eines elektrochemischen Gradienten in den Zellen des Tubulusepithels benötigt.²³ Unter hypoxischen Bedingungen wird deshalb zeitnah eine Stressantwort mit primärer Beteiligung des HIF induziert.²⁴ Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, bestehend aus einer instabilen α - und stabilen β Untereinheit. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF α durch eine Prolyl-4-Hydroxylase an zwei spezifischen Prolyl-Resten kontinuierlich hydroxyliert. HIF α wird anschließend durch das Von-Hippel-Lindau (VHL)-Protein gebunden und dadurch für die Ubiquitinierung markiert. Der VHL/HIF-Komplex wird schließlich proteosomal abgebaut. Bei Sauerstoffmangel wird dagegen die Hydroxylierung des HIF α inhibiert und die Untereinheit dadurch stabilisiert. Diese wandert daraufhin in den Zellkern und bildet mit HIF β den aktiven Transkriptionsfaktor (Abb. 2).²⁵

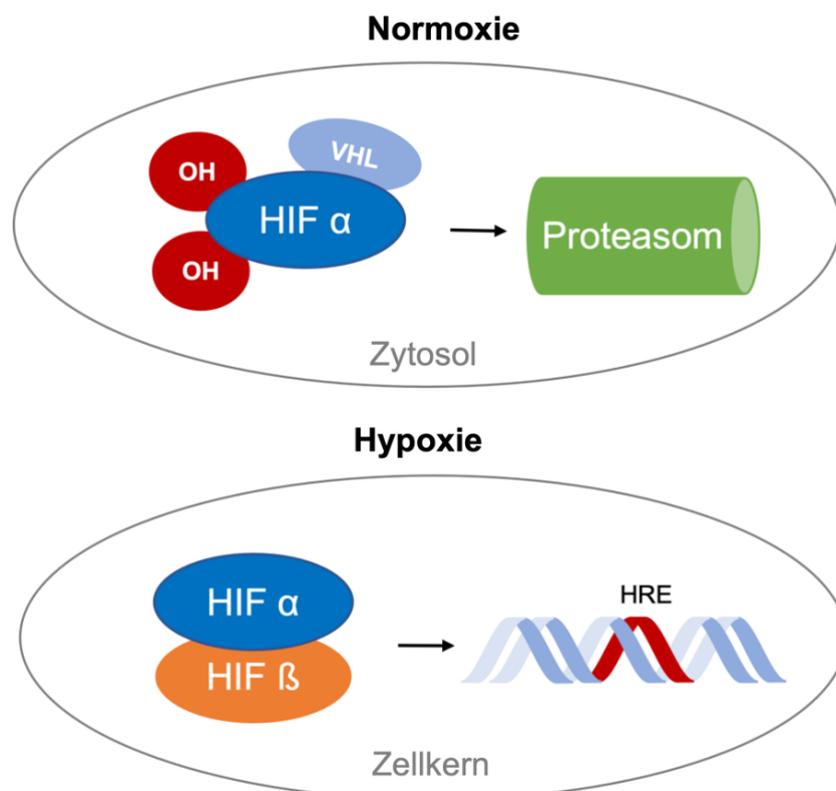


Abb. 2: Regulation der intrazellulären HIF-Aktivität

Bei ausreichendem Sauerstoffangebot wird die HIF α -Untereinheit im Zytosol an zwei Prolyl-Resten hydroxyliert und durch das VHL-Protein gebunden. Der VHL/HIF α -Komplex wird anschließend ubiquitiniert und proteosomal abgebaut. Dagegen wandert die HIF α -Untereinheit bei Sauerstoffmangel in den Zellkern und fusioniert mit der HIF β -Untereinheit zum aktiven Transkriptionsfaktor. Dieser bindet daraufhin an spezifische Gensequenzen, die sogenannten Hypoxie-responsive Elemente (HREs), und steigert dadurch die Genexpression zytoprotektiver Proteine.

Im Menschen gibt es drei HIF-Isoformen, wobei hauptsächlich HIF-1 und HIF-2 an der hypoxischen Stressantwort beteiligt sind.^{26,27} Sie besitzen unterschiedliche Kinetik, Bindungsstellen und physiologische Funktionen. So initiiert der HIF-1 vorwiegend in den ersten 72 Stunden die zelluläre Adaption an einen Sauerstoffmangel, beispielsweise durch eine Steigerung der Glykolyse. Erst bei länger anhaltender Hypoxie kommt es zur vermehrten Aktivierung des HIF-2, welcher weitere Kompensationsmechanismen initiiert. Dazu gehören beispielsweise die Steigerung der Blutbildung und der Neovaskularisation.^{28,29} Die Rolle des HIF-3 ist dagegen noch Gegenstand aktueller Forschung. Insgesamt wurden bereits über hundert Gene identifiziert, die durch mindestens eine der drei HIF-Isoformen reguliert werden. Der Transkriptionsfaktor ist somit zentral an der Nephroprotektion beteiligt und kann bei Aktivierung die Auswirkungen eines akuten Nierenversagens abmildern.³⁰

2.4. Präkonditionierungsstrategien zur Steigerung der Nephroprotektion

Unter dem Begriff Präkonditionierung versteht man die Aktivierung körpereigener Stresssignalwege durch die Applikation von moderaten Stressreizen, um den Organismus vor nachfolgenden stressbedingten Schädigungen zu bewahren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Präkonditionierungsstrategien Modellorganismen vor den Auswirkungen eines ANV schützen können.³¹ Ihre protektiven Effekte werden primär auf die Aktivierung des HIF zurückgeführt.²⁵

Bei der ischämischen Präkonditionierung wird die Blutzufuhr vom Zielorgan repetitiv für kurze Zeit unterbrochen. Es konnte bereits in Ratten gezeigt werden, dass mehrfache, kurze Obliterationen renaler Gefäße den Serum-Kreatininspiegel, die Serum-Harnstoff-Stickstoff Konzentration sowie das Auftreten histologisch renaler Schädigungen beim ANV reduzieren.³²⁻³⁴ Da die ischämische Präkonditionierung im klinischen Alltag wenig praktikabel ist, wurde das Konzept des „remote ischemic preconditioning“ entwickelt. Dieses basiert auf der Erkenntnis, dass auch die Unterbrechung der Blutzufuhr in peripheren Geweben ein Zielorgan schützen kann. So konnten die Auswirkungen eines ANV in Ratten durch die Obliteration extrarenaler Gefäße (zum Beispiel in einer Extremität oder im Darm) abgemildert werden.^{35,36} Andere Studien konnten dagegen keinen renoprotektiven Effekt feststellen.^{37,38} Auch in klinischen Studien am Menschen wurden kontroverse Ergebnisse gefunden. Allerdings unterschieden sich die Studien auch grundsätzlich in der Auswahl ihrer Patienten, eingeschlossenen Komorbiditäten und therapeutischen Methodik.^{39,40}

Bei der hypoxischen Präkonditionierung wird der Organismus einmalig oder repetitiv in einem definierten Zeitraum niedrigen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt. Dies induziert nachfolgend die HIF-abhängige Aktivierung verschiedener Adaptionprozesse.^{41,42} Es konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass ein mehrstündiger Aufenthalt in einer hypoxischen Umgebung oder die Injektion von hypoxisch-präoxygenierten Stammzellen

Ratten vor den Auswirkungen eines ANV schützen kann.^{30,43,44} Auch klinische Daten am Menschen sind vielversprechend. So zeigten beispielsweise Patienten, die während koronarchirurgischen Eingriffen ohne Herz-Lungen-Maschine zehn Minuten mit einem Luftgemisch (21-22% Sauerstoffgehalt) präoxygeniert wurden, postoperativ eine deutlich verbesserte Nierenfunktion.⁴⁵

Ein weiteres Präkonditionierungsverfahren basiert auf der Exposition von Geweben mit Kohlenstoffmonoxid (CO). Dadurch kommt es zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen (ROS), die wiederum zur Stabilisierung der HIF-1 α Untereinheit beitragen.⁴⁶ Die Inhalation niedriger Konzentrationen des ansonsten hochtoxischen Gases schützte in verschiedenen Studien sowohl Schweine als auch Ratten vor den Auswirkungen eines ANV.⁴⁷⁻⁴⁹ Erste klinische Studien am Menschen mussten allerdings aufgrund des hohen Gefährdungspotentials von CO vorzeitig beendet werden.⁵⁰

Auch das nächste Präkonditionierungsverfahren basiert auf der Stabilisierung der HIF α Untereinheit. So konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von Prolylhydroxylase-Inhibitoren (Synonym: HIF-Stabilisatoren) die Produktion des Wachstumsfaktors Erythropoetin steigert.⁵¹ In Ratten und Mäusen reduzierte die präischämische Injektion verschiedener Prolylhydroxylase-Inhibitoren die Serum-Harnstoff-Stickstoff Konzentration sowie das Auftreten histologisch renaler Schädigungen beim ANV.^{52,53} Bisher wurde mit Roxadustat (Handelsname Evrenzo™) nur ein Wirkstoff zur Behandlung renaler Anämien in der Europäischen Union zugelassen.⁵⁴ Weitere Prolylhydroxylase-Inhibitoren befinden sich allerdings bereits im Arzneimittelzulassungsverfahren.⁵⁵

Bei einem weiteren Präkonditionierungsverfahren wird die Genexpression des VHL-Proteins und damit der proteosomale Abbau der HIF α -Untereinheit unterbunden.⁵⁶ In Mäusen schützte das Ausschalten des VHL-Gens effektiv vor Reperfusionsschäden beim ANV.^{57,58} Die klinische Anwendung im Menschen steht aufgrund des Mangels eines selektiven VHL-Protein-Inhibitors oder einer gezielten Gentherapie derzeit allerdings noch aus.

Neueste Studien konnten nun zeigen, dass die Aktivität des HIF auch durch die genetische Manipulation verschiedener RBPs reguliert werden kann.⁵⁹

2.5. Potential RNA-bindender Proteine in der Nephroprotektion

Als RBPs wird eine Untergruppe von Proteinen bezeichnet, die spezifisch mit einzelnen oder mehreren Ribonukleinsäuren (RNAs) interagieren können. Primär regulieren sie deren posttranskriptionale Modifizierung, Stabilität, Lokalisation und Translationsrate.⁶⁰ Andersherum können RNAs auch die Funktion, Stabilität und Lokalisation von RBPs beeinflussen.⁶¹ Strukturell zeichnen sich RBPs durch spezifische Bindungsdomänen aus, über die sie an die Nukleotidsequenzen und Sekundärstrukturen ihrer RNA-Interaktionspartner binden (Abb. 3).⁶²

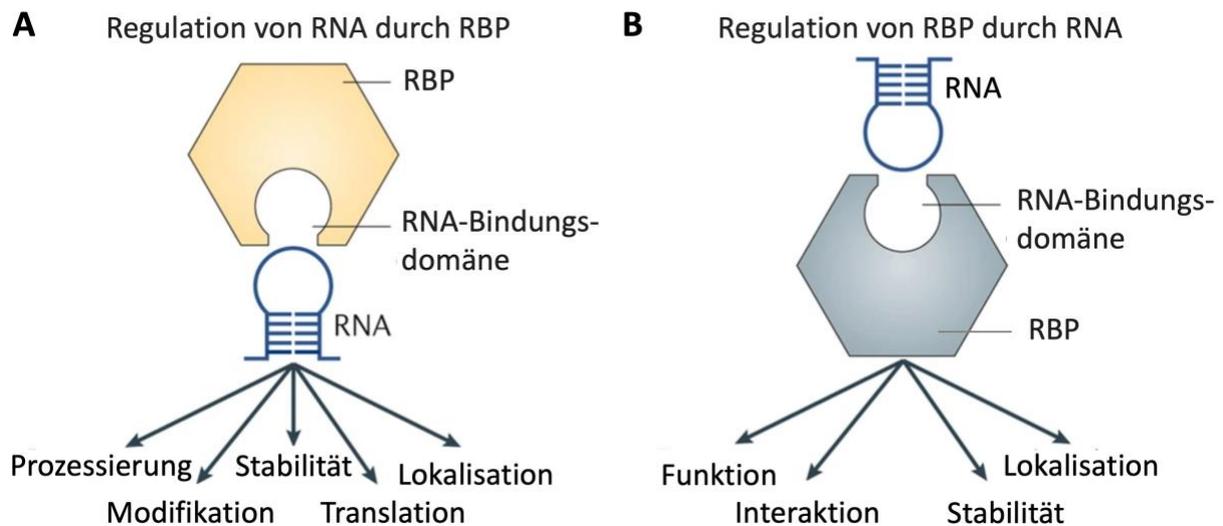


Abb. 3: Interaktionsmöglichkeiten von RNAs und RBPs (in Anlehnung an ⁶¹)

RBPs besitzen eine oder mehrere RNA-Bindungsdomänen, über die sie spezifisch an ihre RNA-Interaktionspartner binden.

A RBPs regulieren die Prozessierung, Modifikation, Stabilität, Lokalisation und Translation von RNAs.

B RNAs können ihrerseits die Funktion, Interaktion, Stabilität und Lokalisation von RBPs verändern.

Während einige RBPs kontinuierlich und ubiquitär exprimiert werden, passt sich die Aktivität der Mehrzahl dynamisch an physiologische oder umweltbedingte Veränderungen an.⁶¹ Die Plastizität des RNA-bindenden Proteoms (RBPom) wurde bereits in vielen Studien durch den Vergleich von Datensätzen gezeigt, die mittels RNA-Interaktom Erfassung (RIC) generiert wurden.⁶³⁻⁶⁶ Bei der RIC werden RNAs und RBPs zunächst durch Ultraviolettstrahlung (254 nm) miteinander quervernetzt. Nach der Zellyse werden anschließend die (vorwiegend polyadenylierten) RNA-Moleküle unter Verwendung magnetischer Oligo(dT) Kugeln isoliert. Ihre Bindungspartner werden schließlich mithilfe quantitativer Massenspektrometrie ermittelt.⁶⁷ Bisher konnten mittels der RIC bis zu 1914 verschiedene humane RBPs identifiziert werden.⁶⁸⁻⁷⁰ Die Mehrzahl von ihnen ist evolutionär hoch konserviert und besitzt, absteigend zum Verwandtschaftsgrad, ein oder mehrere Orthologe in verschiedenen Modellorganismen.^{71,72} Durch die Charakterisierung in einfach gebauten Lebewesen konnten bereits zahlreiche RBPs identifiziert werden, die in die Regulation der zellulären Stressantwort involviert sind.⁷³⁻⁷⁶ Bei hypoxischen Bedingungen, beispielsweise infolge renaler Erkrankungen wie dem ANV, phosphoryliert eine Gruppe von Kinasen die α -Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 (eIF2) und reduziert dadurch die globale Proteinsynthese.⁷⁷ Gleichzeitig binden verschiedene RBPs an die 3'- und/oder 5'-untranslatierten Bereiche von HIF-1 α und/oder HIF-2 α Boten-RNA (mRNA) und steigern dadurch deren Translationsrate.⁷⁸⁻⁸⁰ Beispielsweise regulieren die RBPs Y-Box-Bindungsprotein 1 (YB-1), Hu Antigen R (HuR), Polypyrimidintrakt-Bindungsprotein (PTB), Tristetraprolin (TTP), RNA-Bindungsmotiv-

Protein 38 (RBM38), zytoplasmatisches Polyadenylierungselement-Bindungsprotein (CPEB) und kälteinduziertes-RBP (CIRBP) primär die Translation der HIF-1 α mRNA, während Vertreter der Eisen-regulierenden Proteine (IRPs) eher an der Regulation der HIF-2 α mRNA beteiligt sind.⁸¹⁻⁹² Andere RBPs binden erst an den aktivierten Transkriptionsfaktor und steuern dessen Interaktion mit spezifischen mRNAs. So kommt es beispielsweise in humanen proximalen Tubuluszellen bei chronischer Hypoxie zur Komplexbildung des RBP 4 (RBP4), des eukaryotischen Translationsinitiations-faktors 4E Typ 2 (eIF4E2) und der α -Untereinheit des HIF-2. Der Translationskomplex bindet daraufhin an die 5'-untranslatierten Bereiche verschiedener mRNAs und steigert dadurch deren Translationsrate.⁹³ Auf diese Weise wird auch die Abundanz vieler RBPs bei Hypoxie gesteigert.⁹⁴ Es ist allerdings noch weitestgehend unerforscht, inwieweit die Aktivierung des HIF die Funktion von RBPs beeinflusst. Im nephrologischen Forschungslabor der Universität zu Köln (Nephrolab) konnten mittels RIC zahlreiche bekannte als auch bisher unbekannte RBPs im Modellorganismus *C. elegans* identifiziert werden, deren RNA-Bindung HIF-abhängig reguliert wird.⁹⁵ Das bessere Verständnis der gegenseitigen Interaktion von RBPs und HIF könnte schlussendlich zur Entwicklung neuer, nephroprotektiver Therapieverfahren beitragen.

2.6. Potential von Schwefelwasserstoff-Donatoren in der Nephroprotektion

Ein weiterer, vielversprechender Forschungsansatz in der Entwicklung nephroprotektiver Präkonditionierungsstrategien ist der Einsatz von H₂S-Donatoren. Ihr protektiver Effekt wird primär auf die Induktion des HIF-1 zurückgeführt.⁹⁶ H₂S ist ein hochtoxisches, farbloses, nach faulenden Eiern riechendes Gas, welches vor allem während verschiedener industrieller Prozesse freigesetzt wird. Schon ab einer niedrigen intrazellulären Konzentration kann es Sauerstoff-Bindungsstellen der Atmungskette blockieren und so die mitochondriale ATP-Produktion unterbinden. Als Folge kann es zu Lungenschädigung, Bewusstseinsverlust und Kardiodepression kommen.⁹⁷⁻⁹⁹ H₂S wird allerdings auch endogen bei der Metabolisierung der Aminosäuren Homocystein und Cystein durch die Enzyme Cystathionin- γ -Lyase (CSE), Cystathionin- β -Synthase (CBS) und 3-Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase (3-MST) gebildet.¹⁰⁰ Es fungiert neben Stickstoff- und Kohlenstoffmonoxid als Gasotransmitter.¹⁰¹

H₂S ist in der Niere hauptsächlich an der Regulation der GFR und der Freisetzung des Blutdruckregulators Renin beteiligt.¹⁰² Während der Gasotransmitter bei ausreichender Sauerstoffkonzentration in den Mitochondrien kontinuierlich oxidiert wird, steigt dessen Konzentration unter hypoxischen Bedingungen signifikant an (Abb. 4).¹⁰³ Dies führt schlussendlich zur Induktion verschiedener, lokaler Kompensationsmechanismen. So erhöht H₂S zum einen das Sauerstoffangebot der Niere, indem es den medullären Blutfluss steigert und die energieintensive tubuläre Elektrolytresorption reduziert. Zum anderen kann es als Elektronendonator fehlenden Sauerstoff in der Atmungskette ersetzen.¹⁰²

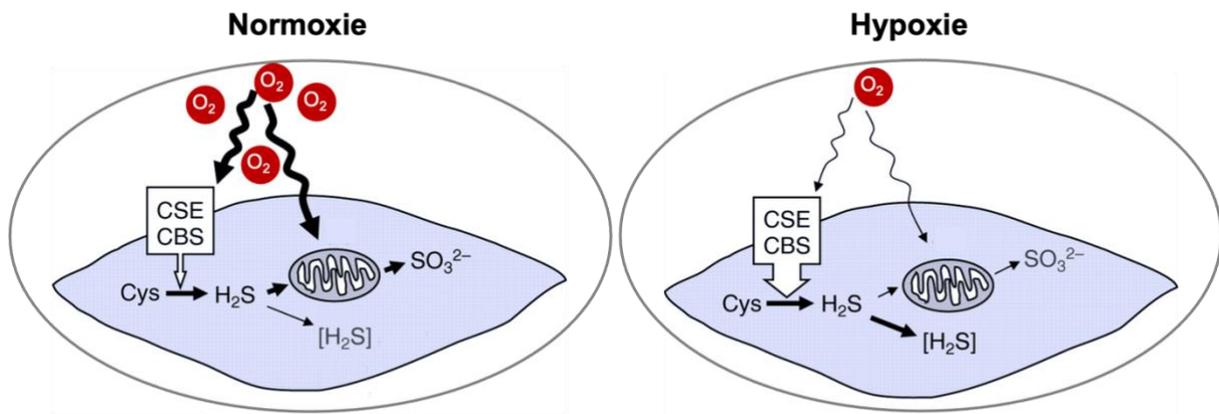


Abb. 4: Regulation der renalen H₂S-Konzentration (in Anlehnung an ¹⁰³)

H₂S wird in der Niere beim Abbau der Aminosäure L-Cystein durch die Enzyme CSE und CBS gebildet. Bei ausreichendem Sauerstoffangebot wird ein Großteil des Gasotransmitters kontinuierlich in den Mitochondrien zu Sulfat (SO₃²⁻) oxidiert. Die intrazelluläre H₂S-Konzentration bleibt niedrig. Dagegen wird bei einem Sauerstoffmangel zum einen die endogene H₂S-Produktion gesteigert, zum anderen die mitochondriale H₂S-Oxidation reduziert. Die intrazelluläre H₂S-Konzentration steigt daraufhin an.

Im Modellorganismus *C. elegans* induziert H₂S direkt den Transkriptionsfaktor HIF-1. Dies führt im Verlauf zur vermehrten Expression von Genen, die im Wurm mit Langlebigkeit und gesteigerter Stressresistenz assoziiert sind.^{96,104} Damit konform weist *C. elegans* unter Exposition mit H₂S eine verlängerte Lebensspanne und erhöhte Stressresistenz gegenüber verschiedenen Stressoren auf, darunter erhöhten Temperaturen und ROS.^{105,106} Der protektive Effekt von H₂S ist hoch konserviert und konnte bereits in zahlreichen Modellorganismen und Krankheitsmodellen validiert werden.¹⁰⁷ Auch der Stoffwechsel des Gasotransmitters ähnelt sich spezieübergreifend. So besitzt *C. elegans* zur endogenen Produktion von H₂S zwei CSE-Orthologe (*cth-1-2*), sechs CBS-Orthologe (*cysl-1-4*, *cbs-1-2*) und sogar sieben 3-MST-Orthologe (*mpst-1-7*).^{108,109} Die CSE und die CBS setzen H₂S im Beisein des Cofaktors Pyridoxalphosphat (PLP) beim Abbau der Aminosäure Cystein frei. Die 3-MST katalysiert dagegen den Abbau von 3-Mercaptopyruvat, einem Zwischenprodukt des Cystein-Stoffwechsels, unter Entstehung von H₂S. Der Abbau von H₂S findet im Wurm vorwiegend über zwei Signalwege statt. Zunächst kommt es durch die Inhibierung des Elektronentransports der Atmungskette zur Aktivierung des HIF-1. Der Transkriptionsfaktor induziert im H₂S-Oxidationssignalweg die Expression der Sulfid-Chinonreduktase 1 (SQRD-1), die H₂S zunächst zu Polysulfid umbaut. Der Metabolit wird anschließend zusammen mit Sauerstoff durch das Ethylmalonische-Enzephalopathie-Protein 1 (ETHE-1) zu Sulfat und Thiosulfat konvertiert. Im HCN-Assimilationssignalweg induziert der HIF-1 die Expression der Cysteinsynthase 2 (CYSL-2), die Cyanwasserstoff (HCN), der beispielsweise beim Verzehr von Bakterien anfällt, unter Entstehung von H₂S detoxifiziert. H₂S wird

anschließend durch die Cysteinsynthase 1 (CYSL-1) zu Cystein und Acetat abgebaut (Abb. 5).¹⁰⁶

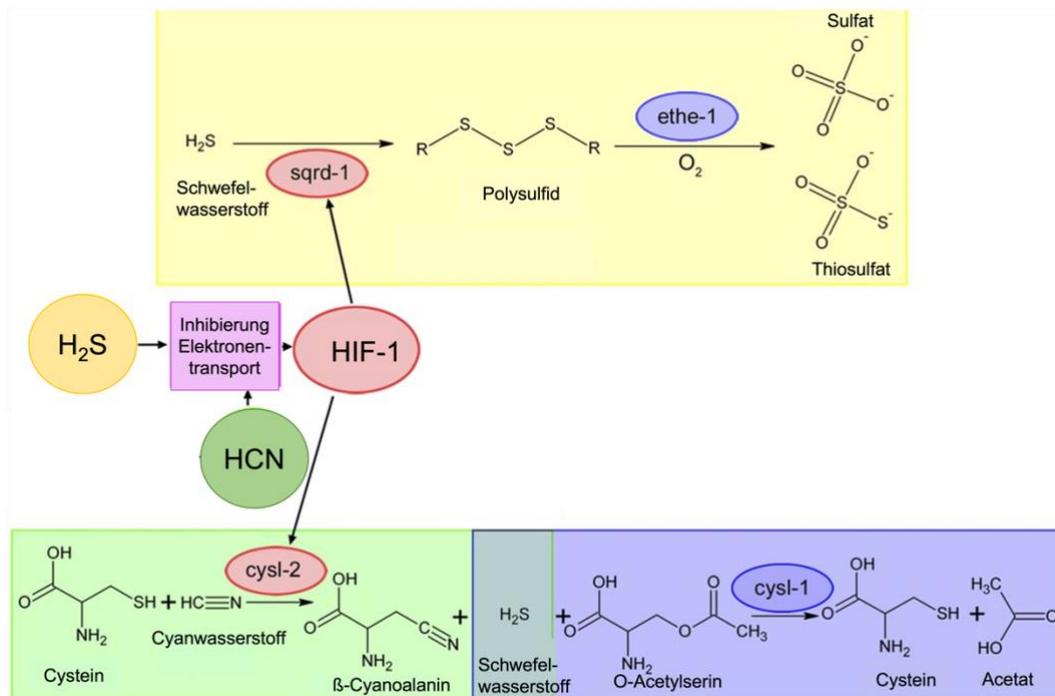


Abb. 5: H₂S-Stoffwechsel in *C. elegans* (in Anlehnung an ¹⁰⁶)

Sowohl H₂S als auch HCN inhibieren den Elektronentransport der Atmungskette und induzieren dadurch den HIF-1. Der Transkriptionsfaktor steigert daraufhin die Genexpression von der SQRD-1 und der CYSL-2. Die SQRD-1 katalysiert im H₂S-Oxidationssignalweg zusammen mit dem ETHE-1 die Konversion von H₂S zu Sulfat und Thiosulfat. Die CYSL-2 katalysiert im HCN-Assimilationssignalweg dagegen die Detoxifikation von HCN unter Entstehung von H₂S. Dieser wird anschließend durch die CYSL-1 zu Cystein und Acetat abgebaut.

Da die direkte Inhalation von H₂S erhebliche Gesundheitsrisiken birgt, werden in Studien häufig H₂S-Donatoren eingesetzt. Definitionsgemäß handelt es sich dabei um Substanzen, die kontinuierlich oder auf einen spezifischen Reiz hin geringe Mengen an H₂S freisetzen.¹¹⁰ Die am besten untersuchten H₂S-Donatoren sind die Schwefelsalze Natriumhydrogensulfid (NaHS) und Natriumsulfid (Na₂S). In zahlreichen Studien wurde ihr nephroprotektiver Effekt unter anderem bereits in Maus, Ratte und Schwein nachgewiesen.¹¹¹⁻¹¹⁹ Allerdings erfüllen sie nicht die Anforderung an eine klinische Anwendung (dazu gehören gute biologische Verträglichkeit, konstante H₂S Freisetzungsrates, hohe Wasserlöslichkeit und hohe orale Bioverfügbarkeit).¹²⁰ Die Charakterisierung weiterer H₂S-Donatoren ist deshalb für die Etablierung eines H₂S-basierten Therapieverfahrens zur Behandlung des ANV notwendig. Ein vielversprechender Kandidat stellt das zytoprotektive Medikament 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium, kurz Mesna (Handelsname Uromitexan®), dar. Es ist klinisch als supportive

Therapie zur Reduzierung der Harnwegstoxizität beim Einsatz von Oxazaphosphorin-Chemotherapeutika (Ifosfamid, Cyclophosphamid, Trofosfamid) zugelassen.¹²¹ Diese werden in der Leber nichtenzymatisch in den antineoplastischen Wirkstoff sowie verschiedene Metaboliten wie ROS und Acrolein gespalten. Acrolein führt in der Niere zu Urothelschädigungen und schlussendlich zur Ausbildung einer hämorrhagischen Zystitis. Mesna kann mit seiner freien Thiolgruppe sowohl Acrolein als auch ROS binden und anschließend renal co-eliminieren.¹²² Es konnte bereits in mehreren tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass die präischämische Gabe von Mesna Ratten auch vor den Auswirkungen eines ANV schützen kann.¹²³⁻¹²⁵ Dies wird bisher vor allem auf dessen antioxidative Eigenschaft zurückgeführt, da beim ANV bekanntlich vermehrt ROS anfallen.¹²⁶ Eine weitere Ursache könnte aber auch in der Freisetzung von H₂S liegen, das beispielsweise bei der Reduktion der schwefelhaltigen Aminosäure L-Cystein durch Mesna's freie Thiolgruppe gebildet wird.¹²⁷ Zum einen ist H₂S selbst ein potentes Reduktionsmittel und trägt so zur Detoxifikation von ROS bei.¹²⁸ Zum anderen ist bekannt, dass der Gasotransmitter die Aktivierung der hypoxischen Stressantwort über die Induktion des HIF-1 fördert.^{96,129} Ein weiterer Kandidat ist das Gewürzmittel Kala namak. Der Begriff stammt aus dem Hindi und bedeutet wörtlich übersetzt etwa „schwarzes Salz“. Es wird vor allem in der indischen Küche zur Verfeinerung von Speisen verwendet. Es besteht aus einer Mischung von Natriumchlorid, Natriumsulfat, Natriumhydrogensulfat und Eisen(III)-sulfat, die mit Holzkohle reduziert wird.¹³⁰ Bisher existieren zwar keine Studien, die einen nephroprotektiven Effekt von Kala namak belegen, es lassen sich allerdings mehrere Gemeinsamkeiten mit Mesna feststellen. Zum einen konnte bereits nachgewiesen werden, dass das Gewürzsalz antioxidative Eigenschaften besitzt.¹³⁰ Zum anderen deutet der typische Eigengeruch nach faulen Eiern auf eine kontinuierliche Freisetzung von H₂S hin. Die orale Bioverfügbarkeit von H₂S aus Kala namak ist bisher nicht bekannt. Das Gewürzmittel wird hauptsächlich im Darm resorbiert, in der Leber metabolisiert und schließlich renal ausgeschieden. Eine Akkumulation von H₂S über den toxikologisch relevanten Grenzwert hinaus ist deshalb laut Bundesinstitut für Risikobewertung sehr unwahrscheinlich.¹³¹ Zusammengefasst weisen beide Substanzen sowohl eine gute Verträglichkeit als auch ein hohes nephroprotektives Potential auf. Damit sind sie vielversprechende Kandidaten für die Etablierung eines H₂S-basierten Therapieverfahrens zur Behandlung des ANV.

2.7. *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

C. elegans ist ein potenter Modellorganismus, um die für die Nephroprotektion so maßgebliche Stressresistenz zu erforschen. Der Fadenwurm besitzt zwar kein mit der menschlichen Niere vergleichbares exkretorisches System, dafür aber viele orthologe Gene, die im Menschen an der Entstehung renaler Erkrankungen beteiligt sind.^{132,133} Von den rund 20 000 codierenden

Genen sind rund 38 % im Menschen konserviert.¹³⁴ Dagegen besitzen 60 – 80 % des humanen Genoms mindestens ein Ortholog im Fadenwurm.¹³⁵ Daneben weist die Verwendung von *C. elegans* gegenüber höheren Modellorganismen einige Vorteile auf. Zunächst einmal ist seine Haltung unkompliziert und kostengünstig. Dazu kommt seine kurze Generationszeit. So erreichen die Larven bei 20 °C Umgebungstemperatur bereits nach zweieinhalb Tagen das adulte Stadium (Abb. 6).¹³⁶

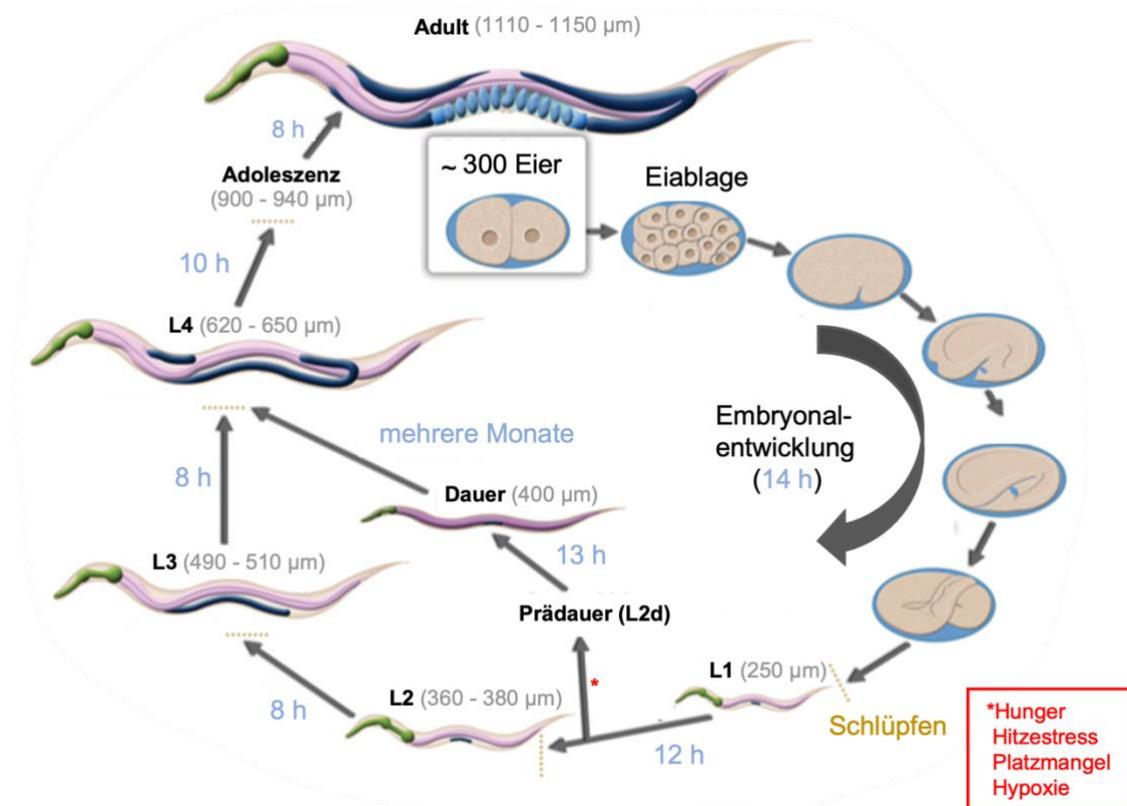


Abb. 6: Entwicklungszyklus von *C. elegans* bei 20 °C. (in Anlehnung an ^{137,138})

Adulte Würmer legen jeweils rund 300 Eier, aus denen nach vierzehn Stunden L1-Larven schlüpfen. Bei Abwesenheit von Stressoren wachsen sie nach zwölf Stunden zu L2-, nach weiteren acht Stunden zu L3- und nach weiteren acht Stunden zu L4-Larven heran. Diese entwickeln sich schließlich innerhalb von achtzehn Stunden zu adulten Würmern weiter. Bei Hunger, hohen Temperaturen, Platz-, oder Sauerstoffmangel treten L1-Larven dagegen nach rund dreizehn Stunden in ein Dauerstadium ein, in dem sie mehrere Monate unter widrigsten Bedingungen überleben können. Anschließend können sie zu ihrem normalen Entwicklungszyklus zurückkehren.

Da sich *C. elegans* autogam fortpflanzt, sind seine Nachkommen genetisch weitestgehend identisch.¹³⁹ Nach Stressexposition treten dagegen vermehrt rein männliche Tiere auf. Die Kreuzung eines mutierten Männchens mit einem Hermaphroditen erlaubt die unkomplizierte Generierung neuer Wurmstämme.¹⁴⁰ Darüber hinaus sind für die Manipulation des Wurmgenoms bereits verschiedene Methoden etabliert worden. Ursprünglich wurde der

Fadenwurm mit mutagenen Substanzen wie Ethylmethansulfonat behandelt, um zufällige DNA-Läsionen zu verursachen.¹⁴¹ Heutzutage sind Wurmstämme mit einem spezifischen Genverlust durch eine Kooperation des „*Caenorhabditis elegans* Deletion Mutant Consortium“ und des „Japan National Bioresource Project“ sogar kommerziell erhältlich.¹⁴² RNAi ist dagegen eine Methode, bei der entweder mittels der Injektion doppelsträngiger RNA (dsRNA) oder der Verfütterung von Bakterien, die RNAi-Plasmide exprimieren, die Expressionsrate spezifischer Gene im Wurm reduziert wird.¹⁴³ Mithilfe kommerziell erhältlicher RNAi Bibliotheken lassen sich auf diese Weise aktuell bis zu 89 % des Wurmgenoms beeinflussen.^{144,145} Durch Mikroinjektion von Genen mit einer zusätzlichen Gensequenz zur Expression von grün fluoreszierenden Protein (GFP) kann die Genexpressionsrate sowie die Protein-, und Zellmobilität im lebenden Wurm per Mikroskop untersucht werden.¹⁴⁶ Spezifische Mutationen können ebenfalls durch den Einsatz von Zinkfinger-nukleasen, sequenz-spezifischen Restriktionsenzymen (TALEN) oder der RNA-gesteuerten CRISPR/Cas-Methode in das Wurmgenom eingebracht werden.¹⁴⁷ Zuletzt erlaubt die kurze Lebensspanne von *C. elegans* die zeitsparende Durchführung von genetischen Screenings. So konnte bereits gezeigt werden, dass zahlreiche Genmutationen die Lebensspanne des Wurms beeinflussen können. Besonders häufig trifft dies für Gene zu, die an Stresssignalwegen beteiligt sind.¹⁴⁸⁻¹⁵¹

2.8. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Zentrales Ziel dieser Doktorarbeit ist es, vielversprechende Kandidaten der Nephroprotektion im Modellorganismus *C. elegans* zu identifizieren. Dafür wird im ersten Abschnitt untersucht, inwieweit vierzehn HIF-1-regulierte RBPs an der Vermittlung von Stressresistenz im Fadenwurm beteiligt sind. Folgende Fragestellungen werden bearbeitet:

- 1) Beeinflusst der Gen-Knockout einzelner Kandidaten die Thermotoleranz von *C. elegans*?
- 2) Lassen sich die Ergebnisse mittels RNAi validieren?
- 3) Welche Vorteile hat die Verwendung von OP50(xu363) RNAi-Bakterien gegenüber HT115 RNAi-Bakterien?
- 4) Beeinflusst der Gen-Knockout einzelner Kandidaten die Lebensspanne von *C. elegans* gleichsam zur Thermotoleranz?

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wird untersucht, ob und auf welche Weise die H₂S-Donatoren Mesna und Kala namak die Stressresistenz von *C. elegans* beeinflussen. Folgende Fragestellungen werden bearbeitet:

- 1) Beeinflusst die Exposition mit Mesna und Kala namak die Thermotoleranz von *C. elegans*?
- 2) Ist ihr Effekt auf die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren HIF-1 und/oder DAF-16 zurückzuführen?

- 3) Inwieweit verändert die Exposition mit Mesna und Kala namak die intrazelluläre H₂S-Konzentration in *C. elegans*?
- 4) Inwieweit moduliert die Exposition mit Mesna und Kala namak die endogene H₂S-Produktion in *C. elegans*?

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

| Bezeichnung | CAS- Nummer | Hersteller | Katalog- nummer |
|--|----------------|--------------------------|--------------------|
| Agar | 9002-18-0 | SERVA Electrophoresis | 11396.03 |
| Agarose | 9012-36-6 | Sigma-Aldrich | A9539-500G |
| Albumin Fraktion V (pH 7.0) | - | AppliChem | A6588 |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈] | 7727-54-0 | AppliChem | A1142,0250 |
| Ampuwa® Wasser | - | Fresenius Kabi | 7610894 |
| BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5x Sequenzierungspuffer | - | Thermo Fisher Scientific | 4339997 |
| Blei(II)-Acetat [Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂] | 51404-69-4 | Sigma-Aldrich | 32306-1KG |
| Bromphenolblau [C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S] | 115-39-9 | AppliChem | A2331, 0005 |
| Carbenicillin Dinatriumsalz [C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₆ SNa ₂] | 4800-94-6 | Carl Roth | 6344.2 |
| Cholesterol [C ₂₇ H ₄₆ O] | 57-88-5 | Sigma-Aldrich | C8667-5G |
| Desoxyribonukleosidtriphosphate (NTPs) | - | Thermo Fisher Scientific | #R0182 |
| Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat- Dihydrat (EDTA-Na ₂) [C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O] | 6381-92-6 | Sigma-Aldrich | E5134-250G |
| Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat (Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O) | 7782-85-6 | Carl Roth | X987.2 |
| 1,4-Dithioerythritol (DTT) [C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂] | 03-12-83 | AppliChem | A1101,0100 |
| Essigsäure [C ₂ H ₄ O ₂] | 64-19-7 | Carl Roth | 7332.1 |
| Ethanol [C ₂ H ₆ O] | 64-17-5 | Carl Roth | 9065.3 |
| 1% Ethidiumbromidlösung | 1239-45-8 | Carl Roth | 2218.2 |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) [C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈] | 60-00-4 | Sigma-Aldrich | E9884-1KG |
| Floxuridin (FUDR) [C ₉ H ₁₁ FN ₂ O ₅] | 50-91-9 | abcr GmbH | AB103901 |
| GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder | - | Thermo Fisher Scientific | SM0311 |
| GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder | - | Thermo Fisher Scientific | SM0372 |
| Glucose [C ₆ H ₁₂ O ₆] | 50-99-7 | Sigma-Aldrich | G7021-1KG |

| | | | |
|---|----------------------|---------------------|----------------------|
| Glycerin [C ₃ H ₈ O ₃] | 56-81-5 | Th. Geyer | 2039-1L |
| Glycin [C ₂ H ₅ NO ₂] | 56-40-6 | Carl Roth | 3908.3 |
| GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase | - | Promega | M7801 |
| Hefeextrakt | 8013-01-2 | Becton Dickinson | 212750 |
| Incidin™ Plus | 122-99-6 112-34-5 | Ecolab Deutschland | 069 525 75 |
| Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranosid (IPTG) [C ₉ H ₁₈ O ₅ S] | 367-93-1 | VWR | AC121 |
| Kaliumacetat [CH ₃ CO ₂ K] | 127-08-2 | Merck Millipore | 1048201000 |
| Kaliumchlorid [KCl] | 7447-40-7 | Carl Roth | 6781.3 |
| Kaliumdihydrogenphosphat [KH ₂ PO ₄] | 7778-77-0 | Carl Roth | 3904.1 |
| Kaliumhydroxid [KOH] | 1310-58-3 | Carl Roth | 6751.1 |
| Kalziumchlorid Dihydrat [CaCl ₂ · 2H ₂ O] | 10035-04-8 | Carl Roth | HN04.2 |
| LB-Medium | - | Carl Roth | X964.2 |
| L-Cystein [C ₃ H ₇ NO ₂ S] | 52-90-4 | Carl Roth | 1693.1 |
| Lithiumchlorid [LiCl] | 7447-41-8 | Sigma-Aldrich | L9650-500G |
| Lithiumdodecylsulfat (LDS) [C ₁₂ H ₂₅ LiO ₄ S] | 2044-56-6 | Sigma-Aldrich | L9781-50G |
| Magnesiumchlorid Heptahydrat [MgCl ₂ · 6H ₂ O] | 7791-18-6 | Carl Roth | 2189.2 |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat [MgSO ₄ · 8H ₂ O] | 10034-99-8 | Merck Millipore | 1058860500 |
| Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat [MnCl ₂ · 4H ₂ O] | 13446-34-9 | Carl Roth | T881.3 |
| 2-Mercaptoethan-sulfonat-Natrium (Mesna) [C ₂ H ₅ NaO ₃ S ₂] | 19767-45-4 | Sigma-Aldrich | 310.18 |
| Methanol [CH ₄ O] | 67-56-1 | Carl Roth | 4627.5 |
| Mlu I, 10 000 units/ml | - | New England Biolabs | R0198S |
| 3-(N-Morpholino)propan-sulfonsäure (MOPS) [C ₇ H ₁₅ NO ₄ S] | 1132-61-2 | Carl Roth | 6979.3 |
| Natriumchlorid [NaCl] | 7647-15-5 | Th. Geyer | 1367-1KG 1367-5KG |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) [NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄] | 151-21-3 | Carl Roth | CN30.3 |
| Natriumhydrogensulfid [NaHS] | 207683-19-0 | Sigma-Aldrich | 161527-100G |
| Natriumhydroxid [2 mol/l Maßlösung] [NaOH] | 1310-73-2 | Carl Roth | T135.1 |
| Natriumhydroxid [5 mol/l Maßlösung] [NaOH] | 1310-73-2 | Carl Roth | KK71.1 |

| | | | |
|--|-------------|--------------------------|--------------|
| Natriumhypochlorit Lösung (10 – 15 % Chlor) [NaClO + H ₂ O] | 7681-52-9 | Sigma-Aldrich | 425044-250ML |
| Natriumthiosulfat [Na ₂ S ₂ O ₃] | 7772-98-7 | Sigma-Aldrich | 217263-250G |
| NEBuffer™ 3.1 | - | New England Biolabs | B7203S |
| Not I, 10 000 units/ml | - | New England Biolabs | R0189S |
| Nystantin-Suspension | 1400-61-9 | Sigma-Aldrich | N1638-100ML |
| PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa | - | Thermo Fisher Scientific | 26619 |
| Passiver Lysierpuffer, 5X | - | Promega | E1941 |
| Pepton | 73049-73-7 | Becton Dickinson | 211820 |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) [C ₇ H ₇ FO ₂ S] | 329-98-6 | Sigma-Aldrich | P7626-250MG |
| Polysorbat 20 [C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆] | 9005-64-5 | Caesar & Loretz | 3472 |
| cComplete™ Protaseinhibitor Tablette, EDTA frei | - | Sigma-Aldrich | 11873580001 |
| Pyridoxalphosphat (PLP) [C ₈ H ₁₀ NO ₆ P] | 853645-22-4 | Sigma-Aldrich | P9255-1G |
| Rubidiumchlorid [RbCl] | 7791-11-9 | Carl Roth | 4471.3 |
| SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate | - | Thermo Fisher Scientific | 34095 |
| T4 DNA Ligase, 400 000 units/ml | - | New England Biolabs | M0202S |
| T4 DNA Ligase Reaktionspuffer (10X) | - | New England Biolabs | B0202S |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) [C ₆ H ₁₆ N ₂] | 110-18-9 | Sigma-Aldrich | 2367.3 |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) [C ₄ H ₁₁ NO ₃] | 77-86-1 | Sigma-Aldrich | T1503-1KG |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid (TRIS HCl) [C ₄ H ₁₁ NO ₃ HCl] | 1185-53-1 | Carl Roth | 9090.3 |
| Trypton | 91079-40-2 | MP Biomedicals | 1010817 |
| wässrige 40 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung (37,5:1) | - | Carl Roth | T802.1 |

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Hersteller | Katalognummer |
|---|--------------------------|------------------|
| Blotting-Papier Typ BF4 | Sartorius | FT-2-521-580600G |
| CryoPure Gefäß, 1,0 ml | Sarstedt | 72.377 |
| Einmal-Wägeschale, 100 ml | Carl Roth | 2150.1 |
| Einmal-Wägeschale, 330 ml | Carl Roth | 2159.2 |
| Elektroporationsküvette, 1,0 mm | Biozym Scientific | 748010 |
| Gefrierbeutel, 3 L | Lidl | 20414375 |
| Gelkasette, 1,0 mm | Thermo Fisher Scientific | NC2010 |
| Gelkassettenkamm, 1,0 mm, 10 Laufsäulen | Thermo Fisher Scientific | NC3010 |
| 96-Kammer Reaktionsplatte | Thermo Fisher Scientific | 4346907 |
| Kryo-Box für Mikrozentrifugenröhrchen | Thermo Fisher Scientific | 5055-5005 |
| Kryo-Box aus Karton, 133 x 133 mm | Ratiolab | 5131001 |
| Mikroinjektionsnadel, 0,5 µm ø | Eppendorf | 930000035 |
| Nitril Einmalhandschuhe, Gr. L, puderfrei | Abena | 3926 |
| Nitril Einmalschutzhandschuhe, Gr. L | B. Braun Melsungen | 9205934 |
| Objektträger, ca. 76 x 26 mm | Engelbrecht | 11101 |
| Parafilm® M Laborfilm | Bemis Corporate | #PM998 |
| Pasteurpipette, 150 mm | VWR | 612-1701 |
| PCR-Gefäß, 8er-reihe | Sarstedt | 72.985.002 |
| PCR-Deckelkette, 8er reihe | Sarstedt | 65.989.002 |
| Petrishale, 60 x 15 mm mit Entlüftungsnocken | Sarstedt | 82.1194.500 |
| Petrishale, 92 x 16 mm mit Entlüftungsnocken | Sarstedt | 82.1473.001 |
| Polypropylen Mikrozentrifugenröhrchen, 1,5 ml | Sarstedt | 72.690.001 |
| Polypropylen Zentrifugenflasche, 250 ml, 62 x 120 mm | Beckman Coulter | 356011 |
| Polypropylen Zentrifugenflasche, 1 L, 95 x 191 mm | Beckman Coulter | A98814 |
| Pipettenspitze, 0,1 – 20 µl, steril | STARLAB | S1110-3810 |
| Pipettenspitze, 1 – 200 µl, steril | STARLAB | S1111-1816 |
| Pipettenspitze, 100 – 1000 µl, steril | STARLAB | S11116811 |
| Pipettenspitze für Multipipette, 25 ml | Eppendorf | 0030089472 |
| Platindraht, 0,2 mm ø | chemPUR | 900543 |
| Polypropylen Röhrchen, 15 ml | Greiner Bio-One | 188 261 |

| | | |
|--|--------------------------------|------------|
| Polypropylen Röhrenchen, 50 ml | Greiner Bio-One | 227 261 |
| Polypropylen SafeSeal Mikrozentrifugenröhrenchen, 1,5 ml | Sarstedt | 72.706.001 |
| PVDF-Transfermembran | Merck Millipore | IPVH00005 |
| Rastereinsatz für Kryo-Box, 133 x 133 mm | Ratiolab | 5120174 |
| Saugball für Pipetten, 57 mm | VWR | 612-2693 |
| Sterilisations-Klebeband mit Indikator | Vereinigte Papierwarenfabriken | 13662 |
| Serologische Pipette, 5 ml | Corning | #4051 |
| Serologische Pipette, 10 ml | Corning | #4101 |
| Serologische Pipette, 25 ml | Corning | #4251 |
| Serologische Pipette, 50ml | Corning | #4500 |
| Steriler Vakuumfilter, 45 mm Aufsatz | Corning | 431174 |

3.1.3. Laborgeräte

Tabelle 4: Laborgeräte

| Bezeichnung | Hersteller | Modellnummer |
|---|--------------------------------|-------------------------|
| Beleuchtungseinrichtung | Carl Zeiss Microscopy | HXP 200C (D) |
| Blockheizler | Bibby Scientific | SHT100D |
| Digitaler schwarz-weiß Drucker | Mitsubishi | P95 |
| Elektrophorese Netzgeräte | Consort bvba | E425 |
| | Consort bvba | E835 |
| | Pharmacia Biotech | EPS 301 |
| | Pharmacia Biotech | EPS 601 |
| | Bio-Rad Laboratories | 164-5052 |
| | Bio-Rad Laboratories | 165-5052 |
| | Bio-Rad Laboratories | 165-5057 |
| Elektroporationssystem | Bio-Rad Laboratories | 1652660 |
| Fluoreszenz-Stereo Zoom-Mikroskop | Carl Zeiss Microscopy | Axio Zoom.V16 |
| Geldokumentationssystem | Thermo Fisher Scientific | FUSION-SL 3500-WL |
| Halogene Kaltlichtquelle | Leica Microsystems | KL 1500 LCD |
| Heizbad | IKA®-Werke | HBR 4 control |
| Horizontale Gelelektrophoresesysteme | Thermo Fisher Scientific | A1 |
| | Thermo Fisher Scientific | A2 |
| | Thermo Fisher Scientific | B1A |
| | Thermo Fisher Scientific | B2 |
| | VWR | Maxi S plus |
| Injektionsspritze, luftdicht, 250 µl | Hamilton Company | 1725 AD SYR, M8 Threads |
| 12-Kanal Multipipette (10 – 100 µl) | Eppendorf | 3122000043 |
| Kühlinkubator | Panasonic Biomedical | MIR-154-PE |
| Kühlzentrifuge | Heraeus | 4 KR |
| Labor-pH-Meter | Knick Elektronische Messgeräte | 765 |
| Mikrobiologischer Brutschrank | Heraeus | B12/UB12 |
| Mikrobiologischer Brutschrank Schüttler | Infors | Multitron Pro |
| Mikrobiologische Sicherheitswerkband (Klasse 2) | LaboGene | Mars |
| Magnetrührer | IKA®-Werke | RET basic |
| Mikromanipulator mit dynamischer Bewegungs-steuerung, 100 – 240 V | Eppendorf | 5192000019 |
| Mikroskop für Mikromanipulationssysteme | Carl Zeiss MicroImaging | Axio Observer A1 |

| | | |
|--|--------------------------|----------------------------|
| Mikroskopadapter für Mikromanipulationssysteme | Eppendorf | 5192311006 5192312002 |
| Mikrowelle | LG Electronics | MH6388P |
| Mikrozentrifuge | Eppendorf | 5415 R |
| | VWR | MiniStar silverline |
| 3-in-1-Mischer | Eppendorf | 5353000014 |
| Modulares Routine-Stereomikroskop | Leica Microsystems | M80 |
| | Bio-Rad Laboratories | S1000™ |
| | Bio-Rad Laboratories | PTC-1148 |
| PCR-Thermozycler | MJ Research | PTC-200 |
| | INTEGRA Biosciences | MEDIAJET |
| Petrischalenabfüller | INTEGRA Biosciences | MEDIAJET |
| Pipette 0,2 – 2 µl | Gilson | P2 |
| Pipette 1 – 10 µl | Gilson | P10 |
| Pipette 2 – 20 µl | Gilson | P20 |
| Pipette 50 – 200 µl | Gilson | P200 |
| Pipette 200 – 1000 µl | Gilson | P1000 |
| Pipettierhelfer | INTEGRA Biosciences | 155016 |
| Präzisionswaage | KERN & SOHN | PCB 1000-2 |
| Präzisionswaage mit Abdeckhaube | OHAUS | AS-313 |
| Programmierbarer Mikroinjektor | Eppendorf | 5253000017 |
| Reagenzglasschüttler | Heidolph Instruments | Reax top |
| Rollenmischer mit 6 Rollen | Bibby Scientific | SRT6 |
| Sicherheitsbunsenbrenner | INTEGRA Biosciences | 144000 |
| Thermoschüttler | Eppendorf | 5355 000.011 |
| | Analytik | TS1 |
| Ultraschall-Homogenisator | BANDELIN electronic | SONOPULS mini20 |
| UV/VIS-Spektrophotometer | Biochrom | Biowave S2100 |
| Vertikaler Standautoklav | Systemec | V-150 |
| Wärme- und Trockenschrank | Heraeus | T 6030 |
| Wasserbad | Memmert | WNB 22 |
| vertikales Gelelektrophoresesystem | Thermo Fisher Scientific | XCell Sure Lock® Mini-Cell |
| Zentrifuge | Eppendorf | 5810 R |

3.1.4. Primer

Alle Primer wurden vom Hersteller Integrated DNA Technologies bezogen. Sie wurden vor der Erstbenutzung mit Ampuwa® Wasser auf 10 µmol/L (Genotypisierung und Klonierung) bzw. 100 µmol/L (Sequenzierung) verdünnt.

Tabelle 5: Primer zur Genotypisierung

| Sequenz 5' → 3' | Funktion |
|-------------------------|---|
| ttcaactctgtgtcttgcca | <i>argk-1(ok2973)</i> Vorwärtsprimer |
| ccgcattattcgtaagggt | <i>argk-1(ok2973)</i> Rückwärtsprimer |
| gattgagtccatcctccga | <i>zfp-3(gk3165)</i> Vorwärtsprimer |
| gagaaatcgttcaacgggaa | <i>zfp-3(gk3165)</i> Rückwärtsprimer |
| tctcgaacatcgaaacaca | <i>gst-4(ok2358)</i> Vorwärtsprimer |
| aaggatgatcaactcatcggc | <i>gst-4(ok2358)</i> Rückwärtsprimer |
| ggatggacctgaagaggtg | <i>nex-1(gk148)</i> Vorwärtsprimer |
| ggaacgagtgacgatgacacg | <i>nex-1(gk148)</i> Rückwärtsprimer |
| ggttgcaaagtgattgcaga | <i>col-179(ok3010)</i> Vorwärtsprimer |
| tgtaagaaacgttcacgca | <i>col-179(ok3010)</i> Rückwärtsprimer |
| cccatgaaagccctacattt | <i>cysl-2(ok3516)</i> Vorwärtsprimer |
| cgcttttgttgaaaagttcg | <i>cysl-2(ok3516)</i> Rückwärtsprimer |
| cagatgtctgccgtgtaac | <i>aass-1(ok926)</i> Vorwärtsprimer |
| ttcaacacaaccaaaccga | <i>aass-1(ok926)</i> Rückwärtsprimer |
| atggctcgaaacaacaaaa | <i>hif-1(ia4)</i> Vorwärtsprimer |
| aatcaaaaaatgctgcacaagc | <i>hif-1(ia4)</i> Intermediärprimer |
| agaagatgacccaagttgc | <i>hif-1(ia4)</i> Rückwärtsprimer |
| ccgttcaagctgctcctcactct | <i>daf-16(mu86)</i> Vorwärtsprimer (1/2) |
| gccttgtctctatcgccacca | <i>daf-16(mu86)</i> Vorwärtsprimer (2/2) |
| cagcatcttctcaggaattgttc | <i>daf-16(mu86)</i> Rückwärtsprimer (1/2) |
| cggaagatgatggaacgtt | <i>daf-16(mu86)</i> Rückwärtsprimer (2/2) |

Tabelle 6: Primer zur Klonierung

| Sequenz 5' → 3' | Funktion |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| ataagaatgcgccgctcctctgccaatcaactcatc | <i>cysl-2(ok3516)</i> Vorwärtsprimer |
| ttgtctgtgtccacctccacgcgtcg | <i>cysl-2(ok3516)</i> Rückwärtsprimer |

Tabelle 7: Primer zur Sequenzierung

| Sequenz 5' → 3' | Funktion |
|--------------------|------------------------------|
| cagtgagcgaggaagcaa | <i>L4440</i> Vorwärtsprimer |
| aaaacgacggccagtgag | <i>L4440</i> Rückwärtsprimer |

3.1.5. *Caenorhabditis elegans* Stämme

Tabelle 8: *Caenorhabditis elegans* Stämme

| Stammname | Genotyp | Ursprung |
|--------------------------------|--|--|
| CB130 | <i>dpy-8(e130)</i> X. | CGC ^{*1} |
| CB1370 | <i>daf-2(e1370)</i> III. | CGC |
| CF1038 | <i>daf-16 (mu86)</i> I. | CGC |
| <i>daf-16(mu86);hif-1(ia4)</i> | <i>hif-1(ia4)</i> V. & <i>daf-16 (mu86)</i> I. | Nephrolab |
| DH1201 | <i>rme-1(b1045)</i> V. | CGC |
| WT | WT | CGC |
| NW1255 | <i>seu-1(ev572)</i> IV. | CGC |
| RB1005 | <i>aass-1(ok926)</i> IV. | CGC |
| RB1456 | <i>T26C11.4(ok1663)</i> X. | CGC |
| RB1823 | <i>gst-4</i> & <i>msp-38(ok2358)</i> IV. | CGC |
| RB2193 | <i>argk-1 (ok2973)</i> V. | CGC |
| RB2225 | <i>col-179 (ok3010)</i> X. | CGC |
| RB2375 | <i>Imp-1(ok3228)</i> X. | CGC |
| RB2535 | <i>cysl-2 (ok3516)</i> II. | CGC |
| <i>sur-5::GFP</i> | <i>sur-5::GFP</i> | Labor Prof. Dr. Schumacher ^{*2} |
| VC1222 | <i>mbf-1(gk562)</i> IV. | CGC |
| VC240 | <i>nex-1 (gk148)</i> III. | CGC |
| VC3250 | <i>zfp-3(gk3165)</i> X. | CGC |
| VS24 | <i>kat-1(tm1037)</i> II. | CGC |
| ZG31 | <i>hif-1(ia4)</i> V. | CGC |

^{*1} *Caenorhabditis* Genetics Center an der University of Minnesota

^{*2} Forschungsgruppe im Exzellenzcluster CECAD an der Universität zu Köln

3.1.6. *Escherichia coli* Stämme

Tabelle 9: OP50 Bakterien

| Stammname | Funktion | Ursprung |
|-----------|----------------|-----------|
| OP50 | Standardfutter | Nephrolab |

Tabelle 10: HT115 Bakterien

| Stammname | Funktion | Ursprung |
|------------------------|---|--------------------------|
| HT115 (chemokompetent) | Aufnahme von <i>L4440</i> Plasmiden | Nephrolab |
| HT115 <i>col-179</i> | <i>col-179 (ok3010)</i> X. Gen-Knockout | Labor Prof. Dr. Vilchez* |
| HT115 <i>cysl-2</i> | <i>cysl-2 (ok3516)</i> II. Gen-Knockout | Nephrolab |
| HT115 <i>daf-2</i> | <i>daf-2(e1370)</i> III. Gen-Knockout | Labor Prof. Dr. Vilchez |
| HT115 <i>EV</i> | RNAi Negativkontrolle | Labor Prof. Dr. Vilchez |
| HT115 <i>argk-1</i> | <i>argk-1 (ok2973)</i> V. Gen-Knockout | Labor Prof. Dr. Vilchez |
| HT115 GFP | GFP Gen-Knockout | Labor Prof. Dr. Vilchez |
| HT115 <i>gst-4</i> | <i>gst-4(ok2358)</i> IV. Gen-Knockout | Labor Prof. Dr. Vilchez |
| HT115 <i>nex-1</i> | <i>nex-1 (gk148)</i> III. Gen-Knockout | Labor Prof. Dr. Vilchez |
| HT115 <i>aass-1</i> | <i>aass-1(ok926)</i> IV. Gen-Knockout | Labor Prof. Dr. Vilchez |

* Forschungsgruppe im Exzellenzcluster CECAD an der Universität zu Köln

Tabelle 11: DH10 Bakterien

| Stammname | Funktion | Ursprung |
|-----------------------|-------------------------------------|-----------|
| DH10 (chemokompetent) | Aufnahme von <i>L4440</i> Plasmiden | Nephrolab |

Tabelle 12: OP50(xu363) Bakterien

| Stammname | Funktion | Ursprung |
|---------------------------|--|-----------|
| OP50(xu363) <i>daf-2</i> | <i>daf-2(e1370)</i> III. Gen-Knockout | Nephrolab |
| OP50(xu363) <i>EV</i> | RNAi Negativkontrolle | Nephrolab |
| OP50(xu363) <i>argk-1</i> | <i>argk-1 (ok2973)</i> V. Gen-Knockout | Nephrolab |
| OP50(xu363) GFP | GFP Gen-Knockout | Nephrolab |
| OP50(xu363) <i>gst-4</i> | <i>gst-4(ok2358)</i> IV. Gen-Knockout | Nephrolab |
| OP50(xu363) <i>nex-1</i> | <i>nex-1 (gk148)</i> III. Gen-Knockout | Nephrolab |

3.1.7. Software

Tabelle 13: Computerprogramme

| Bezeichnung | Herausgeber | Versionsnummer |
|------------------------------------|-----------------------|----------------|
| Adobe Acrobat Reader DC | Adobe Systems | 18.011.20038 |
| Brother P-touch Editor 5.1 | Brother Industries, | 5.1.0311 |
| FinchTV | Geospiza | 1.4.0 |
| GraphPad Prism 5 | GraphPad | 5.04 |
| Mozilla Firefox 59.0.2 (x64 en-US) | Mozilla | 59.0.2 |
| Zen 2.1/ZEN 2 | Carl Zeiss Microscopy | 2.0 |

Tabelle 14: Online-Tools

| Bezeichnung | Weblink |
|----------------------------------|---|
| Benchling | https://www.benchling.com |
| CCG Sequence Service | http://gremberg.ccg.uni-koeln.de/sequence/ |
| <i>C. elegans</i> RBPome | http://shiny.cecad.uni-koeln.de:3838/celegans_rbpome/ |
| NCBI BLAST (Proteine/Nukleotide) | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi |
| NCBI PubMed | https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov |
| Primer3 | https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/ |
| Reverse Complement | https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html |
| WormBase | https://wormbase.org/#012-34-5 |
| WormBook | http://www.wormbook.org |

3.1.8. Lösungen und Puffer

Tabelle 15: Basislösung, pH 12

| Bezeichnung | Konzentration |
|----------------|---------------|
| NaOH [5 mol/l] | 25,0 mmol/L |
| EDTA | 200,0 µmol/L |

Tabelle 16: Gefrierlösung

| Bezeichnung | Konzentration |
|--|---------------|
| NaCl | 100,3 mmol/L |
| KH ₂ PO ₄ | 50,0 mmol/L |
| Glycerin | 3,3 mol/L |
| NaOH [2 mol/l] | 5,6 mmol/L |
| Autoklavieren bei 121 °C für 20 min. Nachfolgende Substanzen möglichst steril zufügen. | |
| MgSO ₄ 8H ₂ O | 300,0 µmol/L |

Tabelle 17: Lämmli-Probenpuffer

| Bezeichnung | Konzentration |
|---|---------------|
| TRIS, pH 6,8 | 62.5 mmol/L |
| Glycerol | 10 % |
| SDS | 2 % |
| Unter Rühren erhitzen, bis sich alle Substanzen gelöst haben. Nachfolgende Substanzen möglichst steril zufügen. | |
| Bromphenolblau | 0.025 % |
| DTT | 20 mmol/L |

Tabelle 18: Laufpuffer

| Bezeichnung | Konzentration |
|-------------|---------------|
| Glycin | 192 mmol/L |
| SDS | 0.1 % |
| TRIS | 25 mmol/L |

Tabelle 19: Lysierpuffer

| Bezeichnung | Konzentration |
|--|---------------|
| TRIS, pH 7,5 | 100 mmol/L |
| LiCl | 500 mmol/L |
| EDTA, pH 8 | 10 mmol/L |
| LDS | 1 % |
| Folgende Substanzen bei jeder Verwendung frisch hinzufügen und Probe anschließend mit RNA freiem Wasser auffüllen. | |
| DTT | 5 mmol/L |
| cOmplete™ Proteaseinhibitor, EDTA-frei | 5 mmol/L |

Tabelle 20: M9-Puffer

| Bezeichnung | Konzentration |
|--|---------------|
| KH ₂ PO ₄ | 22,0 mmol/L |
| Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O | 42,3 mmol/L |
| NaCl | 85,6 mmol/L |
| Autoklavieren bei 121 °C für 20 min. Nachfolgende Substanzen möglichst steril zufügen. | |
| MgSO ₄ 8H ₂ O | 1,0 mmol/L |

Tabelle 21: Natriumhypochlorit-Lysierlösung

| Bezeichnung | Konzentration |
|--------------------------------------|---------------|
| M9-Puffer | 5 ml |
| NaOH [2 mol/l] | 1 ml |
| Natriumhypochlorit [10 – 15 % Chlor] | 0,4 ml |

Tabelle 22: Neutralisierungslösung, pH 5

| Bezeichnung | Konzentration |
|-------------|---------------|
| TRIS HCl | 45,0 mmol/L |

Tabelle 23: PBS-Puffer

| Bezeichnung | Konzentration |
|--|---------------|
| NaCl | 137 mmol/L |
| KCl | 2,7 mmol/L |
| Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O | 10 mmol/L |
| KH ₂ PO ₄ | 2 mmol/L |

Tabelle 24: Polyacrylamid-Sammelgel

| Bezeichnung | Konzentration |
|--------------|---------------|
| Acrylamid | 4.8 % |
| TRIS, pH 6,8 | 500 mmol/L |
| APS | 0.1 % |
| TEMED | 0.15 % |

Tabelle 25: Polyacrylamid-Trenngel

| Bezeichnung | Konzentration |
|--------------|---------------|
| Acrylamid | 10 % |
| TRIS, pH 8,8 | 750 mmol/L |
| APS | 0.1 % |
| TEMED | 0.15 % |

Tabelle 26: Protein-Waschpuffer

| Bezeichnung | Konzentration |
|------------------|---------------|
| TRIS HCl, pH 7,5 | 27 mmol/L |
| NaCl | 273 mmol/L |
| Polysorbat 20 | 2.2 mmol/L |

Tabelle 27: PSI-Medium

| Bezeichnung | Konzentration |
|---|---------------|
| Trypton | 2 % |
| Hefeextrakt | 0,5 % |
| MgCl ₂ 6H ₂ O | 12,1 mmol/L |
| KOH zugeben, bis pH 7,6 erreicht ist. Anschließend 1 L ddH ₂ O hinzufügen und bei 121 °C für 20 min autoklavieren. | |

Tabelle 28: SOB-Medium

| Bezeichnung | Konzentration |
|---|---------------|
| Trypton | 2 % |
| Hefeextrakt | 0,5 % |
| NaCl | 10 mmol/L |
| KCl | 2.5 mmol/L |
| Autoklavieren bei 121 °C für 20 min und danach im Wasserbad auf 54 °C abkühlen lassen. Nachfolgende Substanzen möglichst steril zufügen und dabei unter Rühren vermengen. | |
| MgCl ₂ 6H ₂ O | 10 mmol/L |
| Glucose | 20 mmol/L |
| Bei – 80 °C einfrieren. | |

Tabelle 29: TAE-Puffer

| Bezeichnung | Konzentration |
|----------------------|---------------|
| TRIS | 21,7 mmol/L |
| Essigsäure | 10,8 mmol/L |
| EDTA-Na ₂ | 1,1 mmol/L |
| Ethidiumbromid | 1,4 µmol/L |

Tabelle 30: TFB-1-Puffer

| Bezeichnung | Konzentration |
|---|---------------|
| Kaliumacetat | 26,0 mmol/L |
| Rubidiumchlorid | 87,0 mmol/L |
| Kalziumchlorid Dihydrat | 8,7 mmol/L |
| Mangan(II)-chlorid Tetra-hydrat | 44,1 mmol/L |
| Glycerin | 1,4 mol/L |
| 1:10 verdünnte Essigsäure zugeben, bis pH 5,8 erreicht ist. Anschließend 1 L ddH ₂ O hinzufügen und steril filtrieren. | |

Tabelle 31: TFB-2-Puffer

| Bezeichnung | Konzentration |
|--|---------------|
| Rubidiumchlorid | 8,7 mmol/L |
| Kalziumchlorid Dihydrat | 65,1 mmol/L |
| MOPS | 8,7 mmol/L |
| Glycerin | 1,4 mol/L |
| Verdünntes NaOH zugeben, bis pH 6,5 erreicht ist. Anschließend 200 ml ddH ₂ O hinzufügen und steril filtrieren. | |

Tabelle 32: Transferpuffer

| Bezeichnung | Konzentration |
|--------------------|----------------------|
| TRIS | 22 mmol/L |
| Glycin | 166 mmol/L |
| SDS | 0.1 % |
| Methanol | 12 % |

3.2. Methoden

3.2.1. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der *in vitro* Replikation kurzer DNA-Sequenzen. Die Mastermixe wurden nach Herstellerprotokoll angesetzt und anschließend mit 2 µl DNA aus Wurmlysaten als Template versetzt. Die dazugehörigen Pipettierschemata und Thermozykler-Parameter sind in Tabelle 33 aufgeführt.

Tabelle 33: DNA-Polymerasen

| DNA- Polymerase | Pipettierschema | | Thermozykler-Parameter | | |
|---------------------|--|---------|------------------------|--------|--------|
| GoTaq® G2 Flexi | Ampuwa® Wasser | 10µl | 95 °C | 2 min | } 30 x |
| | 5x Green GoTaq® Flexi Puffer | 10µl | 95 °C | 30 sec | |
| | 25 mmol/L MgCl ₂ ·6H ₂ O | 3 µl | 50 – 65 °C | 30 sec | |
| | 25 mmol/L dNTP`s | 0,2 µl | 72 °C | 1 min | |
| | 10 µmol/L Primer Mix | 0,5 µl | 72 °C | 5 min | |
| | DNA Polymerase | 0,25 µl | | | |
| GoTaq® G2 Hot Start | Ampuwa® Wasser | 27µl | 95 °C | 4 min | } 30 x |
| | 5x Green GoTaq® Flexi Puffer | 10µl | 95 °C | 30 sec | |
| | 25 mmol/L MgCl ₂ ·6H ₂ O | 5 µl | 50 – 65 °C | 30 sec | |
| | 25 mmol/L dNTP`s | 0,2 µl | 72 °C | 1 min | |
| | 10 µmol/L Primer Mix | 0,9 µl | 72 °C | 5 min | |
| | DNA Polymerase | 0,25 µl | | | |
| Q5® High Fidelity | Ampuwa® Wasser | 18 µl | 98 °C | 30 sec | } 30 x |
| | 5x Q5® Reaktionspuffer | 5 µl | 98 °C | 10 sec | |
| | 25 mmol/L dNTP`s | 0,2 µl | 50 – 72 °C | 30 sec | |
| | 10 µmol/L Primer Mix | 1,5 µl | 72 °C | 1 min | |
| | DNA Polymerase | 0,25 µl | 72 °C | 2 min | |

3.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese werden Biopolymere, zum Beispiel DNA- oder RNA-Stränge, nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Zunächst wurde Agarosepulver in TAE-Puffer aufgekocht und in einen Gelträger zum Auskühlen gegossen. Bei einer Biopolymergröße von bis zu 500 bp wurde ein 1 % Agarosegel und bei größeren Molekülen ein 2 % Agarosegel verwendet. Sobald das Gel eine feste Konsistenz angenommen hatte, wurde es in einer Gelelektrophoresekammer mit TAE-Puffer bedeckt. Die Proben und ein DNA-Marker wurden anschließend einzeln in die Laufaschen geladen. Danach wurde ein

Elektrophorese Netzgerät angeschlossen und ein horizontales elektrisches Feld angelegt (5 Volt/cm). Durch die Bindung des im TAE-Puffer enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid, welcher an Nukleinsäuren bindet, wurden die einzelnen Banden unter UV-Licht sichtbar. Ihre Größe wurde durch den Vergleich mit den genormten Banden des DNA-Markers bestimmt.

3.2.3. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung ist eine molekularbiologische Methode zur Bestimmung der Nukleotid-Abfolge eines DNA-Moleküls. Zunächst wurde die DNA mithilfe des GeneJET™ Gelextraktion-Sets aufbereitet. Anschließend wurde mit dem BigDye™ Terminator v3.1 Cycle-Sequenzierung-Set ein Mastermix angesetzt. Das Pipettierschema und die Thermozykler-Parameter sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 34: DNA-Sequenzierung

| Pipettierschema | | Thermozykler-Parameter | |
|---|---------|------------------------|--------|
| BigDye® Terminator v3.1 | 0,25 µl | 96 °C | 1 min |
| BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X | 2,25 µl | 96 °C | 10 sec |
| Sequenzierungspuffer | | 55 °C | 5 sec |
| Primer (1:1000 verdünnt) | 2 µl | 60 °C | 4 min |
| DNA (aufbereitet) | 0,2 µl | | |
| Mastermix mit ddH ₂ O auf 10 µl auffüllen. | | | |

Die Proben wurden anschließend lichtgeschützt zum *Cologne Center for Genomics (CCG)* transportiert und dort analysiert. Die Ergebnisse wurden anschließend unter der Webdomain <http://greemberg.ccg.uni-koeln.de/sequence/> abgerufen.

3.2.4. Klonierung von RNAi-Plasmiden

Die Klonierung ist eine molekularbiologische Methode, bei der DNA-Fragmente zunächst in einen Vektor eingebracht werden, um sie dann in einer fremden Wirtszelle amplifizieren zu lassen.

Herstellung des RNAi-Plasmids: Zunächst wurden Primer für ein ca. 1000 bp großes cDNA-Fragment des Zielgens, im Folgenden Insert genannt, generiert. An den 5'-Enden wurden zusätzlich die spezifischen Schnittstellen der Restriktionsenzyme MluI und NotI angefügt. Dann wurde ein Mastermix der GoTaq® G2 Flexi DNA-Polymerase angesetzt und anschließend 2 µl DNA aus Wurmlysaten als Template hinzugefügt. Nach der Amplifikation des Inserts mittels PCR wurde die DNA mit dem GeneJET™ Gelextraktion-Set aufbereitet.

30 µl Insert-DNA wurde mit 3 µl NEBuffer™ 3.1, 0,5 µl MluI (5U/ µl) und 0,5 µl NotI (5U/ µl) bei 37 °C für eine Stunde verdaut. Als Vektor wurde ein *L4440* Plasmid verwendet.¹⁴³ Er besitzt mehrere Polylinker (ungefähr 50bp große DNA-Oligonukleotide, die verschiedene Schnittstellen für Restriktionsenzyme enthalten), die von T7-Promotoren flankiert werden. Diese werden spezifisch von T7-RNA-Polymerasen erkannt, die nach Induktion mit IPTG oder Lactose in *E. coli* Bakterien gebildet werden.¹⁴³ Zunächst wurde das *L4440* Plasmid mit dem GeneJET™ Plasmid-DNA-Miniprep-Set aus HT115 EV Bakterien extrahiert. 1 µl Plasmid-DNA wurde mit 3 µl NEBuffer™ 3.1, 0,5 µl MluI (5U/ µl) und 0,5 µl NotI (5U/ µl) bei 37 °C für eine Stunde verdaut. Anschließend wurde 0,04 µl Insert-DNA und 0,05 µl Plasmid-DNA mit 2 µl T4 DNA-Reaktionspuffer (10X), 1 µl T4 DNA-Ligase und 16,9 µl Ampuwa® Wasser für eine Stunde ligiert.

Transformation in DH10 Bakterien: Zur Übertragung des Plasmids in kompetente Zellen wurden jeweils 5 µl des Ligationsproduktes zu 50 µl chemisch kompetenten DH10 Bakterien gegeben und 30 Minuten auf Eis ruhen gelassen. Anschließend wurden die Bakterien für 45 Sekunden in ein auf 42 °C temperiertes Wasserbad getaucht. Die Bakterien wurden anschließend in 300 µl SOB-Nährmedium transferiert und bei 37 °C für eine Stunde auf dem Thermoschüttler inkubiert. Das *L4440* Plasmid codiert für eine Antibiotika-Resistenz gegenüber Ampicillin.¹⁵² Zur Transformationsvalidierung wurden deshalb 100 µl Transformationsprodukt auf eine mit Ampicillin bestrichene LB-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von vier Einzelkolonien wurden Bakterienflüssigkulturen angelegt.

Kontrollverdau: Die Plasmid-DNA wurde mithilfe des GeneJET™ Plasmid-DNA-Miniprep-Sets isoliert. Anschließend wurde 1 µl Plasmid-DNA mit 3 µl NEBuffer™ 3.1, 0,5 µl MluI (5U/ µl), 0,5 µl NotI (5U/ µl) und 25 µl Ampuwa® Wasser bei 37 °C für eine Stunde verdaut. Danach wurde der Ansatz mittels Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt. Bei passender Größe der Banden wurde das Plasmid zur Sicherheit zusätzlich sequenziert.

Transformation in HT115 Bakterien: 1 µl Plasmid-DNA wurde zu 50 µl chemisch kompetenten HT115 Bakterien gegeben und 30 Minuten auf Eis ruhen gelassen. Die Bakterien wurden anschließend bei 42 °C für 45 Sekunden im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt, in 300 µl SOB-Nährmedium transferiert und bei 37 °C für eine Stunde auf dem Thermoschüttler inkubiert. Neben der im *L4440* Plasmid codierten Ampicillin-Resistenz besitzen HT115 Bakterien eine zusätzliche Tetracyclin-Resistenz.¹⁵³ Zur Selektion erfolgreich transformierter HT115 Bakterien wurde deshalb 100 µl Transformationsprodukt auf eine mit Ampicillin und Tetracyclin bestrichene LB-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese wurde schließlich im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.5. Kultivierung von *Caenorhabditis elegans*

Alle Würmer wurden bei 20°C im Brutschrank auf mit OP50 Bakterien besiedelten Agarplatten gehalten.

3.2.6. Herstellung von Agarplatten

NGM-Platten: Die NGM-Platten wurden als Standard verwendet. Die Produktionsschritte sind in Tabelle 35 aufgeführt.

Tabelle 35: NGM-Platten

| Bezeichnung | Konzentration |
|--|----------------|
| Pepton | 2,5 g/L |
| NaCl | 51,3 mmol/L |
| Agar | 50,5 mmol/L |
| Autoklavieren bei 121 °C für 20 min und danach im Wasserbad auf 54 °C abkühlen lassen. Nachfolgende Zutaten möglichst steril zufügen und dabei unter Rühren vermengen. | |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 1,0 mmol/L |
| MgSO ₄ 8H ₂ O | 1,0 mmol/L |
| Cholesterin in Ethanol | 12,9 nmol/L |
| KH ₂ PO ₄ Puffer, pH 6,0 | 25,0 mol/L |
| Nystantin-Suspension | 10 000 unit/ml |
| Agar möglichst zügig und unter sterilen Bedingungen in leere Petrischalen gießen. 60 x 15 mm → 10 ml 92 x 16 mm → 30 ml | |
| Über Nacht auskühlen lassen. Anschließend frische OP50 Bakterienkultur auf dem Agar ausstreichen. 60 x 15 mm → 200 µl 92 x 16 mm → 500 µl | |

FUDR-Platten: Bei der Herstellung wurde dem NGM-Medium nach dem Autoklavieren zusätzlich 203,1 µmol/L FUDR zugefügt.

Kala namak-Platten: Bei der Herstellung des NGM-Mediums wurde NaCl durch Kala namak ersetzt. Der OP50 Bakterienflüssigkultur wurde ebenfalls 51,3 mmol/L Kala namak zugegeben.

Mesna-Platten: Bei der Herstellung wurde dem NGM-Medium nach dem Autoklavieren zusätzlich 1,2 mmol/L Mesna zugefügt. Der OP50 Bakterienflüssigkultur wurde ebenfalls 1,2 mmol/L Mesna zugegeben.

Natriumthiosulfat- / NaHS-Platten: Bei der Herstellung wurde dem NGM Medium nach dem Autoklavieren zusätzlich 50 µmol/L Natriumthiosulfat / NaHS zugefügt. Der OP50 Bakterienflüssigkultur wurde ebenfalls 50 µmol/L Natriumthiosulfat / NaHS zugegeben.

RNAi-Platten: Bei der Herstellung wurde dem NGM Medium nach dem Autoklavieren zusätzlich 1,3 mmol/L Carbenicillin Dinatriumsalz sowie 1 mmol/L IPTG hinzugegeben. Die Platten wurden zum Schutz vor UV-Strahlung unter Alufolie abgedeckt und nach dem Auskühlen mit HT115 / OP50(xu363) Bakterien ausgestrichen.

3.2.7. Generierung von *Caenorhabditis elegans* Männchen

Zur Generierung männlicher *Caenorhabditis elegans* Würmer wurden jeweils fünf Hermaphroditen im L4-Stadium auf drei NGM-Platten transferiert und im Inkubator bei 32 °C für fünf Stunden erhitzt. Die Tiere wurden anschließend bei 20 °C gehalten. Unter den Nachkommen wurde anschließend nach Männchen gesucht. Diese sind auffällig schmal, klein und besitzen ein hakenförmig anmutendes Schwanzende, mit denen sie gezielt Hermaphroditen inseminieren.¹⁵⁴

3.2.8. Kreuzung von *Caenorhabditis elegans* Stämmen

Auf drei NGM-Platten wurden jeweils zehn männliche Tiere eines Genotyps und zwei Hermaphroditen im L4-Stadium des anderen Genotyps transferiert und anschließend im Brutschrank bei 20 °C inkubiert. Nach rund 24 Stunden wurden sowohl die Männchen als auch die Hermaphroditen entfernt und die zurückbleibenden Eier bebrütet. Jeweils zehn Nachkommen wurden im L4-Stadium einzeln auf neue NGM-Platten isoliert und diese über Nacht im Brutschrank gelagert. Anschließend wurden die Muttertiere genotypisiert. Jeweils zwanzig Nachkommen einer heterozygoten Mutter wurden im L4-Stadium auf neue NGM-Platten isoliert. Nachdem diese über Nacht Eier abgelegt hatten, wurden sie ebenfalls genotypisiert.

3.2.9. Synchronisierung von *Caenorhabditis elegans* Populationen

Zunächst wurde eine Natriumhypochlorit-Lysierlösung frisch angesetzt. Anschließend wurden adulte Würmer mit M9-Puffer von ihrer Platte gewaschen. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt und dabei der Überstand jeweils verworfen. Dann wurde 1 ml Natriumhypochlorit-Lysierlösung zugegeben und die Probe geschüttelt, bis unter dem Mikroskop keine Wurmreste mehr zu erkennen waren. Daraufhin wurde 500 µl Ampuwa® Wasser zugegeben und die Probe bei 3600 rpm für 1,5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde diese anschließend jeweils drei Mal mit Ampuwa® Wasser und drei Mal mit M9-Puffer

gewaschen und die in der Probe verbleibenden Wurmeier dazwischen jeweils bei 3600 rpm für 1,5 Minuten runterzentrifugiert. Anschließend wurden rund 1000 Eier auf eine frische NGM-Platte transferiert und bei 20 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.10. Kryokonservierung von *Caenorhabditis elegans*

Die Kryostase von *C. elegans* Würmern dient ihrer Konservierung. Dazu wurden Wurmeier über Nacht auf einer unbesiedelten NGM-Platte schlüpfen gelassen. Die L1-Larven wurden mit einem 50:50 Gemisch aus M9-Puffer und Gefrierlösung von der Platte gewaschen und jeweils 1 ml in mindestens zwei Mikroreaktionsgefäße überführt und bei – 80 °C weggefroren. Eine Probe wurde anschließend zur Funktionskontrolle am nächsten Tag wieder aufgefroren.

3.2.11. Wurmlyse in *Caenorhabditis elegans*

Die Wurmlyse dient der Freisetzung genomischer DNA aus Zellen von Würmern. Dafür wurde ein einzelnes adultes Tier in 11 µl hoch basischer Basislösung (pH 12) bei 95 °C für 30 Minuten erhitzt. Anschließend wurde durch Zugabe von 11 µl Neutralisierungslösung (pH 5) die alkalische Lyse der Zellen gestoppt. Das Wurmlysat wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.2.12. RNA-Interferenz in *Caenorhabditis elegans*

Unter dem Begriff RNAi versteht man die spezifische Inhibierung der Genexpression oder -translation eines Gens durch RNA-Moleküle. Dazu wurden WT-Würmer auf frische RNAi-Platten transferiert. Durch den Verdau von RNAi-Bakterien, die ein spezifisches RNAi-Plasmid besitzen und exprimieren, wird die Abundanz des Ziel-Proteins im Wurm reduziert.

3.2.13. Bestimmung der mittleren Lebensspanne von *Caenorhabditis elegans*

Jeweils 20 adulte Würmer wurden zur Eiablage für zwei Stunden auf eine frische NGM-Platte transferiert, anschließend wieder entfernt und die Mutterplatte im Brutschrank bei 20 °C inkubiert. Nach 72 Stunden wurden jeweils 120 adulte Nachkommen auf sechs FUDR-Platten verteilt und im Brutschrank bei 20 °C gelagert. Anschließend wurde alle 48 Stunden die relative Überlebensrate der Wurmstämme erfasst. Ein Wurm galt dabei als tot, sobald er nicht mehr auf die Berührung des nervenreichen Kopfes reagierte. Verletzte oder verschwundene Tiere wurden als zensiert dokumentiert und aus der Wertung genommen.

3.2.14. Hitzeschock in *Caenorhabditis elegans*

Als Hitzeschock wird eine Form von Stress bezeichnet, bei der ein Organismus einer höheren Temperatur als der idealen Körpertemperatur ausgesetzt wird. Dazu wurden jeweils

20 Würmer im L4-Stadium auf drei Agarplatten transferiert und danach im Brutschrank bei 20 °C inkubiert. Nach einer Ruhezeit von zwölf Stunden wurden die Agarplatten mit Parafilm® abgedichtet. Immer zwölf Agarplatten wurden in einem wasserundurchlässigen Gefrierbeutel verschlossen und anschließend in einem auf konstant 37 °C temperierten Wasserbad mit Gewichten am Boden fixiert. Nach 105 Minuten wurden die Agarplatten wieder aus dem Wasserbad genommen. Anschließend wurde der Parafilm® entfernt und alle Agarplatten aussortiert, in denen Wasser eingedrungen war. Der Rest wurde im Brutschrank bei 20 °C gelagert. Nach zwölf Stunden Regenerationszeit wurde die relative Überlebensrate der einzelnen Populationen erfasst. Ein Wurm galt als tot, sobald er nicht auf mehr auf die Berührung des nervenreichen Kopfes reagierte. Verschwundene Tiere wurden als zensiert dokumentiert und aus der Wertung genommen.

3.2.15. Messung der endogenen H₂S-Produktion in *Caenorhabditis elegans*

Zur Herstellung des H₂S-Detektionspapiers wurde Blotting-Papier auf die Größe einer 96-Kammer Reaktionsplatte zugeschnitten, danach in eine 20 mmol/L Blei(II)-Acetat Lösung getaucht und anschließend unter einer Sicherheitswerkbank getrocknet. Jeweils ungefähr 1000 synchronisierte Würmer wurden mehrmals mit M9-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen. Zur Wurmlyse wurde den Proben zunächst 1 ml passiver Lysierpuffer, 5X zugegeben. Um M9-Pufferreste zu entfernen wurde dieser Vorgang mehrfach wiederholt. Die Proben wurden dreimal in Flüssigstickstoff eingefroren und anschließend jeweils in einem Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Zusätzlich wurden sie mehrfach mit einem Ultraschall-Homogenisator zerkleinert. In die Kammern einer 96-Kammer Reaktionsplatte wurden 100 µl Wurmlysat und 100 µl PBS, ergänzt durch 10 mmol/L L-Cystein und 6 mmol/L PLP, gegeben. Die Reaktionsplatte wurde anschließend mit dem H₂S-Detektionpapier abgedeckt, mit einem Deckel fest verschlossen und bei 37 °C für 2 – 5 Stunden inkubiert. Durch die Reaktion von H₂S mit dem im Erkennungspapier gebundenem Blei(II)-Acetat trat eine schwarze Verfärbung auf.

3.2.16. Anlegung von Bakterienflüssigkulturen

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine Bakterienkolonie auf einer LB-Platte berührt und diese anschließend in LB-Medium abgeworfen. Zusätzlich wurden Antibiotika entsprechend dem Resistenzspektrum des Bakterienstammes zugegeben. Im Inkubator wurde die Kultur anschließend bei 37 °C und 120 rpm für mindestens zwölf Stunden geschüttelt, bis eine deutliche Trübung des Mediums zu erkennen war. Bakterienflüssigkulturen wurden stets frisch angesetzt oder für höchstens einen Tag bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.2.17. Kryokonservierung von Bakterien

Die Kryostase von Bakterien dient deren Konservierung. Dazu wurde eine Bakterienflüssigkultur angesetzt und jeweils 500 µl in mindestens zwei Mikroreaktionsgefäße überführt. Dazu wurden jeweils 500 µl Glycerin gegeben und das Gemisch mehrmals hoch und runter pipettiert. Die Proben wurden anschließend bei - 80 °C weggefroren. Eine Probe wurde anschließend als Funktionskontrolle am nächsten Tag auf einer frischen LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.18. Plasmidpräparation

Unter dem Begriff Plasmidpräparation versteht man die Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien. Dafür wurde das GeneJET™ Plasmid-DNA-Miniprep-Set verwendet. Zunächst wurde eine Bakterienflüssigkultur angesetzt. Für die Extraktion von *high-copy* Plasmiden wurden 1 - 5 ml und bei *low-copy* Plasmiden bis zu 10 ml der Kultur verwendet. Die Probe wurde bei 2000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert, sodass die Bakterien als Bodensatz zu erkennen waren. Dann wurde der Überstand abgenommen, das zurückbleibende Pellet in 250 µl Resuspensionslösung durch mehrmaliges hoch und runter pipettieren aufgelöst und anschließend in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Nun wurden 250 µl Lysierlösung zugegeben und die Probe mehrmals invertiert, bis eine träge und leicht klare Färbung auftrat. Anschließend wurden 350 µl Neutralisierungslösung zugefügt und das Mikrozentrifugenröhrchen sofort mehrmals invertiert. Das Lysat wurde daraufhin flockig trüb. Durch Zentrifugieren bei 10000 – 14000 rpm für fünf Minuten wurden sowohl Zelltrümmer als auch chromosomale DNA pelletiert. Der Überstand wurde in eine GeneJET™ Spin-Säule transferiert und diese danach fest verschlossen. Die Probe wurde bei 10000 – 14000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen. Als Nächstes wurde 500 µl Waschlösung auf die GeneJET™ Spin-Säule gegeben, das Gemisch bei 10000 – 14000 rpm für eine Minute zentrifugiert und der Durchfluss wieder verworfen. Dieser Waschschrift wurde anschließend wiederholt. Um zurückgebliebene Ethanolreste zu entfernen, wurde die Probe noch einmal bei 10000 – 14000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die GeneJET™ Spin-Säule wurde nun in ein frisches 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen transferiert und auf die Membran 30 – 50 µl Elutionspuffer gegeben. Nach mindestens zwei Minuten Inkubationszeit wurde bei 10000 – 14000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert und die GeneJET™ Spin-Säule danach verworfen. Die aufbereitete Plasmid-DNA wurde bei - 20°C gelagert.

3.2.19. Generierung von chemisch kompetenten Bakterien

Unter dem Begriff Kompetenz versteht man die Fähigkeit von Bakterien, Fremd-DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine Bakterienkolonie auf

einer LB-Platte berührt und anschließend in 50 ml PSI-Medium abgeworfen. Im Inkubator wurde die Bakterienflüssigkultur bei 37 °C und 100 rpm für mindestens zwölf Stunden geschüttelt. Anschließend wurden 15 ml Flüssigkeit zu 500 ml frischem PSI-Medium gegeben und das Gemisch im Inkubator bei 37 °C und 120 rpm geschüttelt. Dabei wurde mit einem UV/VIS-Spektrophotometer in regelmäßigen Abständen die optische Dichte bis hin zu einem Wert zwischen 0,6 – 0,8 ($\approx 10^8$ Bakterien/ml) bestimmt. Dann wurde die Kultur zunächst für 15 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend bei 4 °C und 4000 rpm für 15 Minuten in einer 1 L Zentrifugenflasche zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen, das Pellet in 200 ml eiskaltem TFB-1-Puffer resuspendiert und in eine 250 ml Zentrifugenflasche überführt. Nach einer Ruhezeit von 15 Minuten auf Eis wurden die Bakterien wieder bei 4 °C und 4000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet in 10 ml TFB-2-Puffer resuspendiert. Durch kurzes Eintauchen in flüssigem Stickstoff wurden je 100 µl Aliquotes eingefroren und anschließend bei – 80 °C gelagert.

3.2.20. Statistik

Für die Auswertung der Hitzeschock-Versuche wurde jeweils ein ungepaarter Student's t-Test durchgeführt. Für die Ermittlung der mittleren Lebensspanne wurde ein Log-Rank-Test durchgeführt. Die Auswertung von Bandenintensitäten wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt.

3.2.21. Abbildungen

Die Abbildungen im Einleitungsteil wurden mit dem Programm Microsoft Power Point (Version 16.36) erstellt. Die Abbildungen im Ergebnisteil wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 generiert. Sie wurden jeweils als PNG-Datei formatiert.

4. Ergebnisse

4.1. Einfluss HIF-regulierter RNA-bindender Proteine auf die Stressresistenz von *Caenorhabditis elegans*

4.1.1. Der Funktionsverlust HIF-regulierter RNA-bindender Proteine beeinflusst die Thermotoleranz von *Caenorhabditis elegans*

Forscher des Nephrolabs konnten mithilfe der RIC insgesamt 1354 verschiedene RBPs in *C. elegans* identifizieren. In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass eine *vhl-1(ok161)* LOF-Mutation die Zusammensetzung des RBPoms beeinflusst.⁹⁵ Die Unterschiede waren dabei nicht auf eine Veränderung der RBP-Proteinabundanz zurückzuführen. Daraus lässt sich schließen, dass die Stabilisierung der HIF α -Untereinheit das RNA-Bindeverhalten von RBPs in *C. elegans* beeinflusst.⁹⁵ Die Daten von 641 HIF-regulierten RBPs (die zum Startzeitpunkt dieser Doktorarbeit bereits identifiziert waren) wurden in einer *in silico* Analyse mit Proteom- und RNA-Sequenzierungs-Datensätzen zu Stressresistenz in Maus und Wurm verglichen. Sie ergab insgesamt 146 Kandidaten, die an der Vermittlung von Stressresistenz in *C. elegans* beteiligt sein könnten. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden vierzehn HIF-regulierte RBPs (AASS-1, SEU-1, NEX-1, LARP-1, COL-179, RME-1, KAT-1, MBF-1, T26C11.4, DPY-8, CYSL-2, ARGK-1, GST-4 und ZFP-3) näher charakterisiert.

In einem ersten Schritt wurde ausgetestet, inwieweit sich ihr Gen-Knockout auf die Thermotoleranz von *C. elegans* auswirkt. Dazu wurden WT-Würmer und RBP LOF-Mutanten (*aass-1(ok926)*, *seu-1(ev572)*, *nex-1(gk148)*, *larp-1(q783)*, *col-179(ok3010)*, *rme-1(b1045)*, *kat-1(tm1037)*, *mbf-1(gk952)*, *T26C11.4(ok1663)*, *dpy-8(e130)*, *cysl-2(ok3516)*, *argk-1(ok2973)*, *gst-4(ok2358)* und *zfp-3(gk3165)*) miteinander verglichen. Als Positivkontrollgruppe wurde die LOF-Mutante *daf-2(e1370)* ausgewählt. Das *daf-2*-Gen codiert für das einzige Ortholog des humanen Insulin-Wachstumsfaktors (IGF-1). Eine Änderung der IGF-1 Abundanz führt im Wurm zur Aktivierung eines hoch konservierten metabolischen Signalwegs. *Daf-2(e1370)* LOF-Mutanten sind dadurch unter anderem resistenter gegenüber oxidativem, hypoxischem und thermalem Stress und haben eine deutlich verlängerte Lebensspanne.^{148,155} Die Thermotoleranz der verschiedenen Wurmstämme wurde mittels Hitzeschock gemessen. Dabei wurden L4-Larven auf NGM-Platten für 105 Minuten in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad getaucht. Anschließend wurde nach einer zwölfstündigen Erholungsphase die relative Überlebensrate der Versuchsgruppen ermittelt, die mit ihrer Thermotoleranz korreliert.

Die LOF-Mutanten *cysl-2(ok3516)*, *argk-1(ok2973)*, *gst-4(ok2358)* und *zfp-3(gk3165)* sowie die Positivkontrollgruppe *daf-2(e1370)* wiesen eine im Vergleich zu WT-Würmern erhöhte

Thermotoleranz auf. Dagegen zeigte die LOF-Mutante *aass-1(ok926)* eine signifikant verringerte Thermotoleranz. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Thermotoleranz der LOF-Mutanten *seu-1(ev572)*, *larp-1(q783)*, *rme-1(b1045)*, *kat-1(tm1037)*, *mbf-1(gk952)*, *T26C11.4(ok1663)* und *dpy-8(e130)* festgestellt werden (Abb. 7). Zusammenfassend zeigte sich, dass ein Gen-Knockout der RBPs AASS-1, CYSL-2, ARGK-1, GST-4 und ZFP-3 die Thermotoleranz in *C. elegans* beeinflusst.

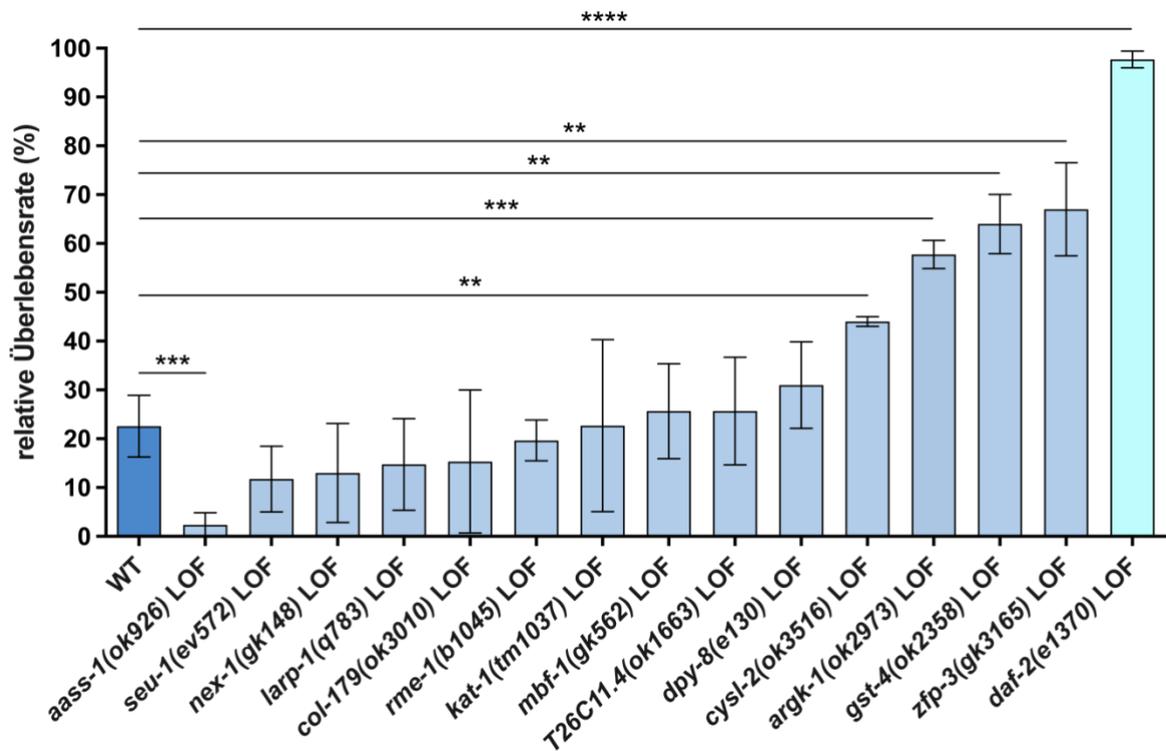


Abb. 7: Thermotoleranz von RBP LOF-Mutanten

WT-Würmer und RBP LOF-Mutanten (n = jeweils 60 Tiere) wurden mittels Hitzeschock (37 °C für 105 min) gestresst. *Daf-2(e1370)* LOF-Mutanten wurden als Positivkontrollgruppe verwendet. Die relative Überlebensrate (%) der Versuchsgruppen wurde nach zwölf Stunden Regenerationszeit erhoben. Die Säulen zeigen den Mittelwert aus \geq drei Replikaten mit SA. Die Signifikanz wurde mithilfe eines ungepaarten Student's t-Tests ermittelt: ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

4.1.2. Generierung eines *cysl-2* RNAi-Plasmids

Neben der dauerhaften Inaktivierung von Genen im Zuge eines Gen-Knockouts (zum Beispiel durch LOF-Mutationen) existieren noch weitere Methoden, um die Abundanz von RBPs in *C. elegans* zu reduzieren. Dazu gehört auch die Verfütterung von HT115 Bakterien, die durch das Einbringen von Plasmiden zur Produktion spezifischer RNAi fähig sind.¹⁵⁶ Die meisten dieser Bakterien können direkt einer RNAi Bibliothek entnommen werden.^{144,145} Ein HT115 Stamm, der *cysl-2* RNAi produziert, war allerdings nicht vorhanden und wurde deshalb neu generiert. Zunächst wurden Primer mit Schnittstellen der Restriktionsenzyme MluI und NotI

sowie einem Basenüberhang für das Gen *cysl-2* kreierte. Der mittels PCR amplifizierte *cysl-2* DNA-Abschnitt (Insert) wurde nach einer Aufreinigung durch die Restriktionsenzyme MluI und NotI verdaut (Abb. 8 A) und danach in den ebenfalls mit MluI und NotI verdauten Plasmid-Vektor *L4440* (Abb. 8 B) ligiert. Das neu generierte *cysl-2* RNAi-Plasmid wurde anschließend zunächst in chemisch kompetente DH10 Bakterien transformiert. Zur Kontrolle wurde das Plasmid erneut mittels MluI und NotI aufgeschnitten und die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Wie erwartet fanden sich zwei Banden auf Höhe des *cysl-2* Inserts und *L4440* Vektors (Abb. 8 C). Eine nachfolgende Sequenzierung bestätigte die erfolgreiche Klonierung. Das Plasmid wurde schließlich aufbereitet und in chemokompetente HT115 Bakterien transformiert.

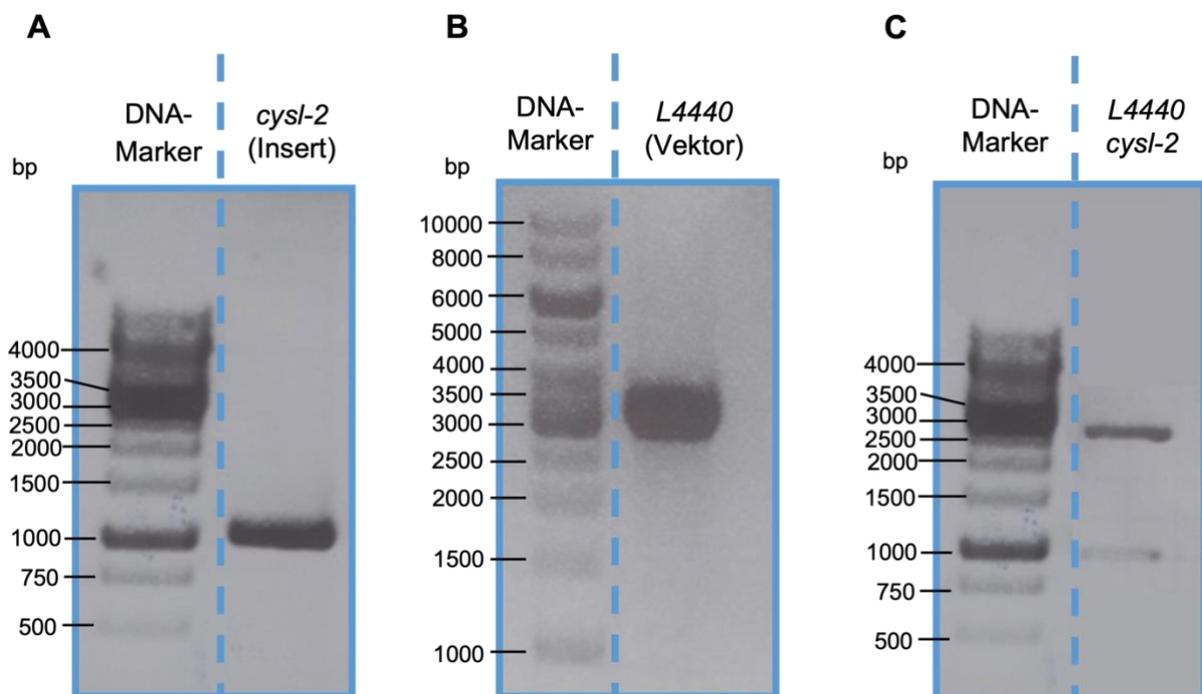


Abb. 8: Generierung eines *cysl-2* RNAi-Plasmids

A Gelelektrophorese des aufbereiteten und verdauten Inserts *cysl-2* (1034 bp).

B Gelelektrophorese des aufbereiteten und verdauten Vektors *L4440* (2790 bp).

C Gelelektrophorese des aufbereiteten und verdauten RNAi-Vektors *L4440 cysl-2*.

Als DNA-Marker wurde der GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder verwendet.

4.1.3. Die RNA-Interferenz HIF-regulierter RNA-bindender Proteine bestätigt deren thermoregulatorische Funktion in *Caenorhabditis elegans*

Zur Validierung der thermoregulatorischen Funktion der Kandidaten wurden WT-Würmer auf RNAi-Platten transferiert, die mit HT115 RNAi-Bakterien besiedelt waren. Als Knockdown-Kandidaten wurden AASS-1, COL-179 und CYSL-2 ausgewählt, deren Funktionsverlust unterschiedliche Auswirkungen auf die Stressresistenz des Fadenwurms hatte (siehe Abb. 7).

In der Positivkontrollgruppe wurde die Genexpression von DAF-2 herunterreguliert, da die Fütterung mit *daf-2* RNAi bekanntermaßen die Thermotoleranz von *C. elegans* erhöht.¹⁵⁷ Die Negativkontrollgruppe wurde dagegen mit HT115 EV Bakterien gefüttert, die einen L4440 Leervektor exprimieren. Ihre Nachkommen wurden anschließend einem Hitzeschock ausgesetzt.

WT-Würmer wiesen nach der Fütterung mit HT115 *cysl-2* und *daf-2* RNAi-Bakterien eine signifikant höhere Thermotoleranz auf. Dagegen zeigten sie sich nach Fütterung mit HT115 *aass-1* RNAi-Bakterien anfälliger gegenüber Hitzestress. Ein Knockdown des Gens *col-179* hatte dagegen keinen Einfluss auf die Thermotoleranz von *C. elegans* (Abb. 9). Somit konnte die unterschiedliche Thermotoleranz verschiedener RBP LOF-Mutanten mittels RNAi erfolgreich reproduziert werden.

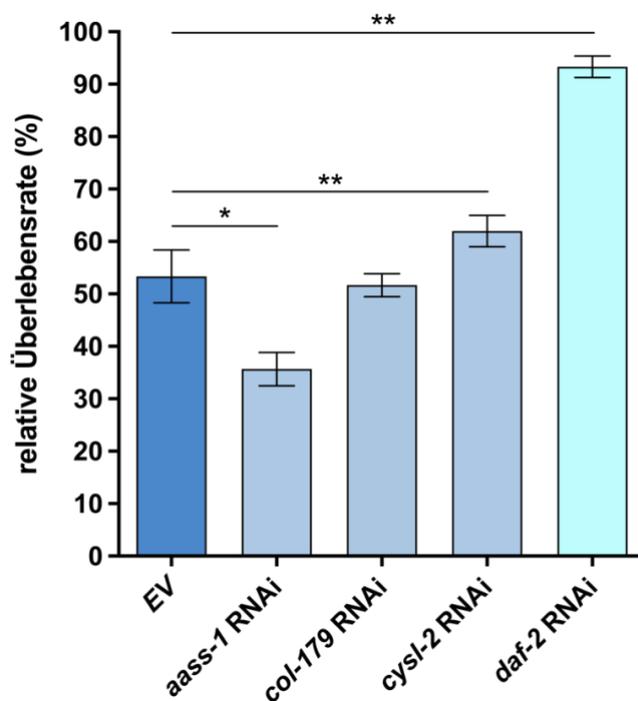


Abb. 9: Thermotoleranz von WT-Würmern nach Fütterung mit HT115 RNAi-Bakterien

WT-Würmer wurden mit HT115 EVBakterien oder mit HT115 *aass-1*, *col-179* und *cysl-2* RNAi-Bakterien gefüttert. Die Positivkontrollgruppe wurde mit HT115 *daf-2* RNAi-Bakterien ernährt. Die Folgegeneration (n = jeweils 60 Tiere) wurde anschließend mittels Hitzeschock (37 °C für 105 min) gestresst. Die relative Überlebensrate (%) der Versuchsgruppen wurde nach zwölf Stunden Regenerationszeit erhoben. Die Säulen zeigen den Mittelwert aus drei Replikaten mit SA. Die Signifikanz wurde mithilfe eines ungepaarten Student's t-Tests ermittelt: * = p < 0,05; ** = p < 0,01.

Als Nebenbefund fiel auf, dass die relativen Überlebensraten der RBP LOF-Mutanten nach einem Hitzeschock deutlicher geringer ausfielen als die von WT-Würmern nach Fütterung mit HT115 RNAi-Bakterien (Tabelle 36).

Tabelle 36: Vergleich der relativen Überlebensraten nach Hitzeschock

| | LOF-Mutation | RNAi |
|----------------|--------------|------|
| WT/EV | 23 % | 53 % |
| AASS-1 | 2 % | 36 % |
| COL-179 | 15 % | 52 % |
| CYSL-2 | 44 % | 62 % |
| DAF-2 | 98 % | 93 % |

4.1.4. Die Wahl des Futterbakteriums beeinflusst die Thermotoleranz von *Caenorhabditis elegans*

Die signifikanten Unterschiede in den relativen Überlebensraten von LOF-Mutanten und WT-Würmern nach dem Gen-Knockdown einzelner RBPs können möglicherweise auf den Einsatz verschiedener Futterbakterien zurückgeführt werden. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden WT-Würmer mit OP50 oder HT115 *EV* Bakterien gefüttert und ihre Nachkommen einem Hitzeschock ausgesetzt.

Es zeigte sich, dass WT-Würmer nach Fütterung mit HT115 *EV* Bakterien eine höhere Thermotoleranz aufwiesen als nach Fütterung mit OP50 Bakterien (Abb. 10). Somit sind die höheren relativen Überlebensraten von WT-Würmern nach RNAi Knockdown mindestens partiell auf den Einsatz verschiedener Futterbakterien zurückzuführen. Dies kann den Vergleich der experimentellen Daten erschweren.

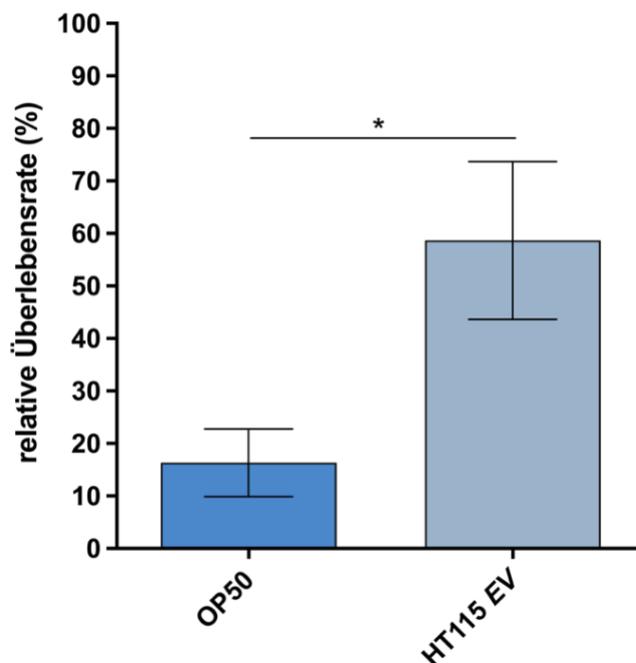
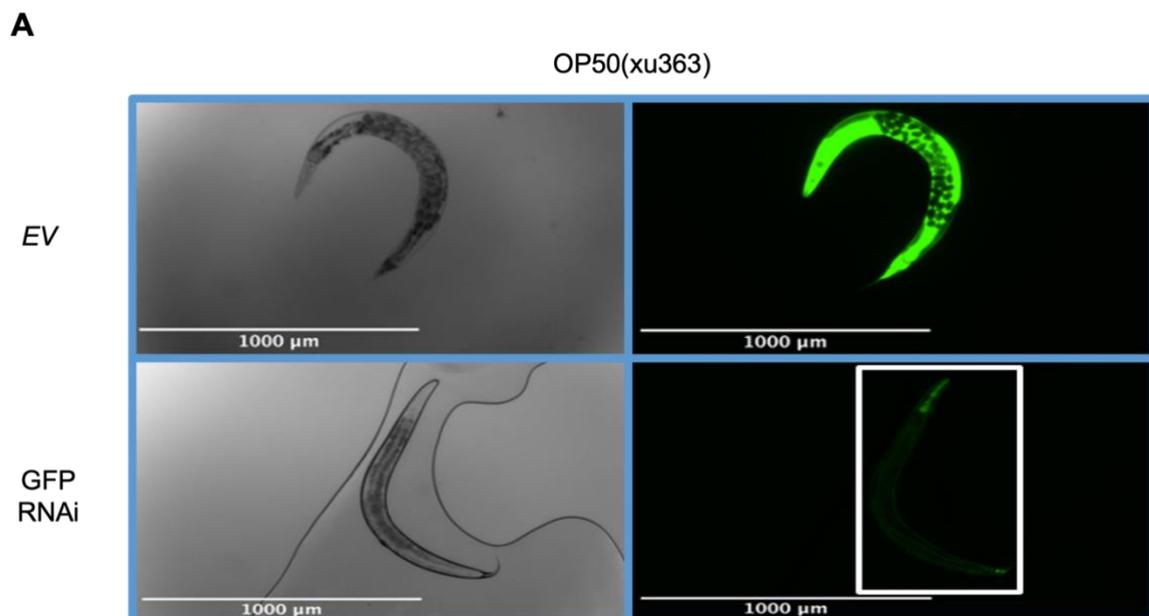


Abb. 10: Thermotoleranz von WT-Würmern nach OP50 oder HT115 *EV* Diät
 WT-Würmer wurden mit OP50 oder HT115 *EV* Bakterien gefüttert. Die Folgegeneration (n = jeweils 60 Tiere) wurde anschließend mittels Hitzeschock (37 °C für 105 min) gestresst. Die relative Überlebensrate (%) der Versuchsgruppen wurde nach zwölf Stunden Regenerationszeit erhoben. Die Säulen zeigen den Mittelwert aus drei Replikaten mit SA. Die Signifikanz wurde mithilfe eines ungepaarten Student's t-Tests ermittelt: * = p < 0,05.

4.1.5. Etablierung von OP50(xu363)

Um unter anderem diätbedingte Unterschiede in der Thermotoleranz von LOF-Mutanten und WT-Würmern nach Fütterung mit RNAi-Bakterien auszuschließen, wurde OP50(xu3636) als neues RNAi Bakterium im Labor etabliert. Es unterscheidet sich von regulären OP50 Bakterien allein in seiner Fähigkeit, dsRNA aus Plasmiden zu produzieren.¹⁵³ Da bisher keine kommerziell erhältlichen RNAi-Bibliotheken für OP50(xu3636) Bakterien existieren, wurden eigene RNAi-Bakterienstämme generiert. Dazu wurden die jeweiligen *L4440* RNAi-Plasmide aus HT115 RNAi-Bakterien extrahiert, aufbereitet und in chemisch kompetente OP50(xu363) Bakterien transformiert. Die Transformationseffizienz wurde an *sur-5::GFP*-Würmern, die regelhaft GFP exprimieren, ausgetestet. Dazu wurden *sur-5::GFP*-Würmer entweder mit OP50(xu363) *EV* Bakterien oder OP50(xu363) GFP RNAi-Bakterien gefüttert. Die Kontrollgruppen wurden dagegen mit HT115 *EV* Bakterien oder HT115 GFP RNAi-Bakterien gefüttert. Der Effekt auf die Genexpression von GFP in *sur-5::GFP*-Würmern wurde anschließend mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops bestimmt.

Sowohl der Verzehr von HT115 als auch OP50(xu363) GFP RNAi-Bakterien führte zur deutlichen Reduktion der Fluoreszenzsignale in einem Großteil der *sur-5::GFP*-Würmern (Abb. 11). Vom optischen Eindruck her war dieser Effekt in der HT115 Vergleichsgruppe möglicherweise ausgeprägter. Unabhängig davon konnte die Funktionalität von OP50(xu363) als neues RNAi- Bakterium erfolgreich nachgewiesen werden.



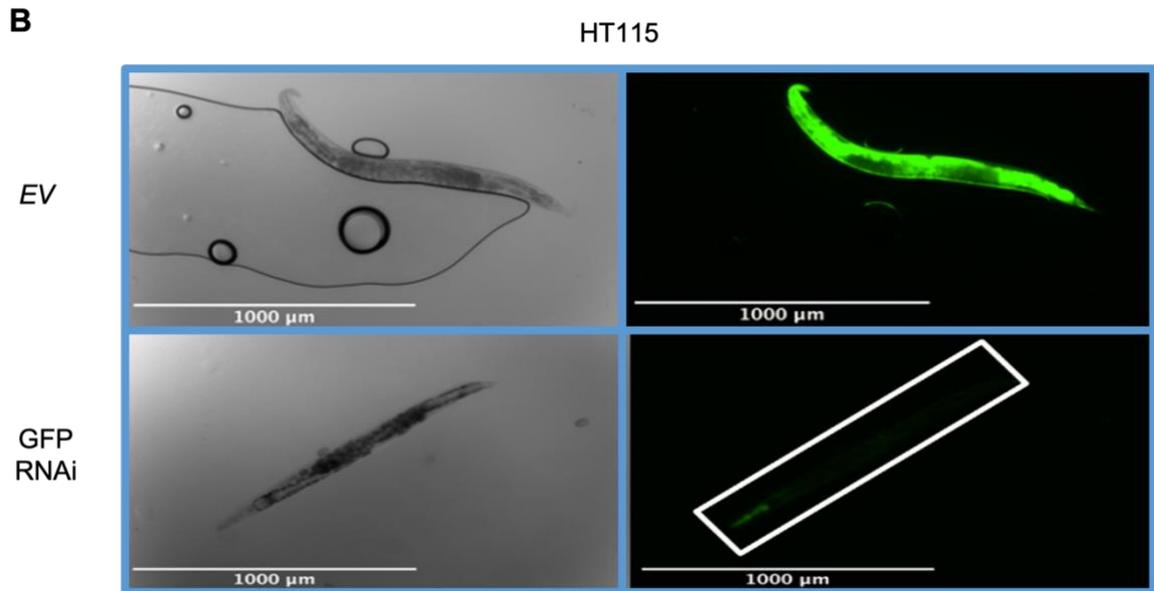


Abb. 11: GFP-Expression in *sur-5::GFP*-Würmern nach Fütterung mit GFP RNAi-Bakterien

Sur-5::GFP-Würmer wurden entweder mit **A** OP50(xu363) *EV* oder OP50(xu363) GFP RNAi-Bakterien bzw. **B** HT115 *EV* oder HT115 GFP RNAi-Bakterien gefüttert. Die GFP-Expression wurde nach 60 Stunden mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Die Bilder zeigen jeweils repräsentativ den Knockdown-Nachweis an einem Tier. *Linke Seite*: grauer Farbkanal. *Rechte Seite*: grüner Farbkanal. Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

4.1.6. RNAi-Bakterien beeinflussen unabhängig vom Nährstoffgehalt die Thermotoleranz von *Caenorhabditis elegans*

Neben dem unterschiedlichen Nährstoffgehalt von OP50 und HT115 Bakterien könnten auch andere Einflussfaktoren die Unterschiede in den relativen Überlebensraten von LOF-Mutanten und WT-Würmern nach Fütterung mit RNAi-Bakterien bedingen. Um dies auszuschließen, wurden WT-Würmer mit OP50 oder OP50(xu363) *EV* Bakterien gefüttert und ihre Nachkommen einem Hitzeschock ausgesetzt.

Es zeigte sich, dass der Verzehr von OP50(xu363) *EV* Bakterien die Thermotoleranz von *C. elegans* signifikant gegenüber dem Verzehr von OP50 Bakterien erhöht (Abb.12).

Somit können die im Vergleich zu LOF-Mutanten höheren relativen Überlebensraten von WT-Würmern nach RNAi nicht nur auf Unterschiede im Nährstoffgehalt von HT115 und OP50 Bakterien zurückgeführt werden.

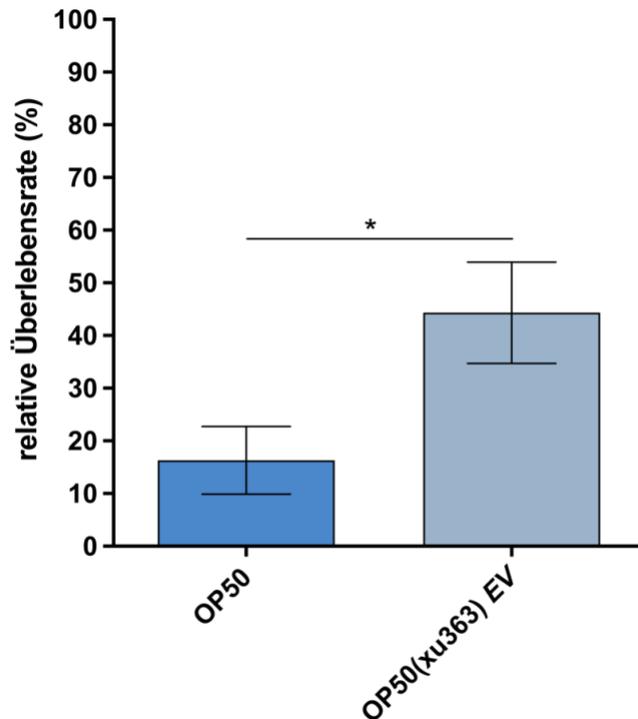


Abb. 12: Thermotoleranz von WT-Würmern nach Diät mit OP50 oder OP50(xu363) EV Bakterien

WT-Würmer wurden mit OP50 oder OP50(xu363) EV Bakterien gefüttert. Die Folgegeneration (n = jeweils 60 Tiere) wurde anschließend mittels Hitzeschock (37 °C für 105 min) gestresst. Die relative Überlebensrate (%) der Versuchsgruppen wurde nach zwölf Stunden Regenerationszeit erhoben. Die Säulen zeigen den Mittelwert aus drei Replikaten mit SA. Die Signifikanz wurde mithilfe eines ungepaarten Student's t-Tests ermittelt: * = $p < 0,05$.

4.1.7. Effekt von OP50(xu363) RNAi-Bakterien auf die Thermotoleranz von *Caenorhabditis elegans*

Durch den Einsatz von OP50(xu363) RNAi-Bakterien lassen sich zumindest diätbedingte Unterschiede in der Thermotoleranz von LOF-Mutanten und WT-Würmern nach RNAi Knockdown ausschließen. Deshalb wurden zur weiteren Ergebnisvalidierung WT-Würmer auf RNAi-Platten transferiert, die mit OP50(xu363) RNAi-Bakterien besiedelt waren. Als Knockdown-Kandidaten wurden mit AASS-1, GST-4, ARGK-1 und NEX-1 wiederum HIF-regulierte RBPs ausgewählt, deren Funktionsverlust sich unterschiedlich auf die Thermotoleranz von *C. elegans* auswirkte (siehe Abb. 7). Die Positivkontrollgruppe wurde mit OP50(xu363) *daf-2* RNAi-Bakterien und die Negativkontrollgruppe mit OP50(xu363) EV gefüttert. Die Nachkommen wurden anschließend einem Hitzeschock ausgesetzt.

WT-Würmer zeigten sich nach Fütterung mit OP50(xu363) *gst-4* und *aass-1* RNAi-Bakterien sensibler gegenüber Hitzestress. Dagegen hatte die Fütterung mit OP50(xu363) *argk-1*, *nex-1* und *daf-2* RNAi-Bakterien keinen signifikanten Einfluss auf ihre Thermotoleranz (Abb. 13). Damit divergiert die Thermotoleranz der meisten Kandidaten von der in RBP LOF-Mutanten. Allerdings ist hervorzuheben, dass auch die Positivkontrollgruppe keine erhöhte Thermotoleranz zeigte. Somit sind die Ergebnisse als nicht valide zu werten.

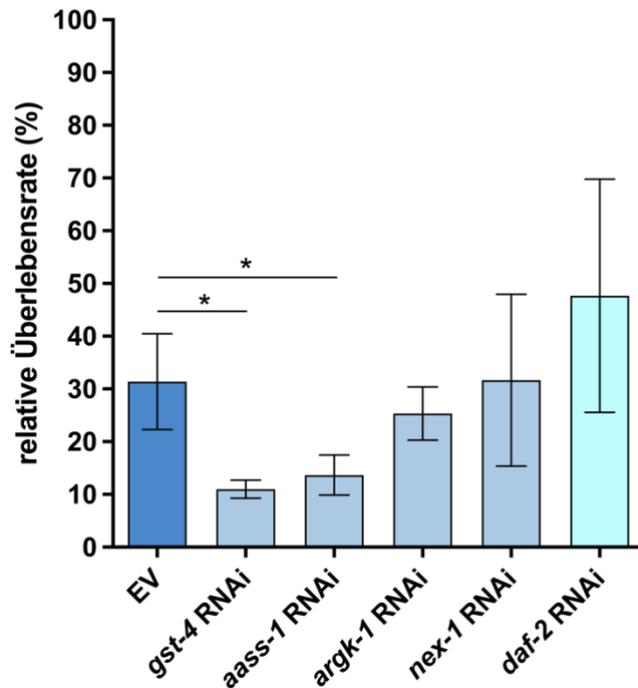


Abb. 13: Thermotoleranz von WT-Würmern nach Fütterung mit OP50(xu363) RNAi-Bakterien

WT-Würmer wurden mit OP50(xu363) *EV* Bakterien und mit OP50(xu363) *gst-4*, *aass-1*, *argk-1* und *nex-1* RNAi-Bakterien gefüttert. Die Positivkontrollgruppe wurde mit OP50(xu363) *daf-2* RNAi-Bakterien ernährt. Die Folgegeneration (n = jeweils 60 Tiere) wurde anschließend mittels Hitzeschock (37 °C für 105 min) gestresst. Die relative Überlebensrate (%) der Versuchsgruppen wurde nach zwölf Stunden Regenerationszeit erhoben. Die Säulen zeigen den Mittelwert aus drei Replikaten mit SA. Die Signifikanz wurde mithilfe eines ungepaarten Student's t- Tests ermittelt:

* = $p < 0,05$

4.1.8. Effekt eines Funktionsverlusts HIF-regulierter RNA-bindender Proteine auf die Lebensspanne von *Caenorhabditis elegans*

Einzelne Genmutationen können die Lebensspanne von *C. elegans* beeinflussen. Dies trifft besonders häufig für Gene zu, die an der Vermittlung von Thermotoleranz beteiligt sind.¹⁴⁸ Aus diesem Grund wurde untersucht, inwieweit die Thermotoleranz von RBP LOF-Mutanten mit ihrer Lebensspanne korreliert. Als Kandidaten wurden zum einen die LOF-Mutanten *gst-4(ok2358)*, *aass-1(ok926)* und *cysl-2(ok3516)* ausgewählt, da diese eine im Vergleich zu WT-Würmern veränderte Thermotoleranz aufwiesen (siehe Abb. 7). Zum anderen wurde auch die LOF-Mutante *col-179(ok3010)* ausgewählt, da COL-179 eines der ersten Kollagene ist, das als RBP identifiziert werden konnte. Ihre Lebensspanne wurde jeweils mit der von WT-Würmern als auch mit der von besonders langlebigen *daf-2(e1370)* LOF-Mutanten verglichen.¹⁵⁸

Zunächst wurden synchronisierte Tiere nach Erreichen des adulten Entwicklungsstadiums auf frische FUDR-Platten transferiert. Anschließend wurde alle 48 Stunden die relative Überlebensrate der Versuchsgruppen erhoben. Die Würmer galten dabei definitionsgemäß als tot, wenn sie nicht mehr auf die Berührung ihres nervenreichen Kopfes reagierten. Mit Pilzen kontaminierte FUDR-Platten sowie verschwundene oder verletzte Tiere wurden aus der Wertung genommen. Letzteres trat besonders häufig bei *cysl-2(ok3516)* LOF-Mutanten auf. So verstarben mehr als ein Drittel von ihnen frühzeitig am Aufplatzen ihrer Haut mit

nachfolgendem Austreten von Darm- und Gonadenanteilen. Insgesamt mussten rund 34 % aller Würmer zensiert werden (Tabelle 37).

Tabelle 37: Zensierte Würmer bei der Lebensspannenbestimmung

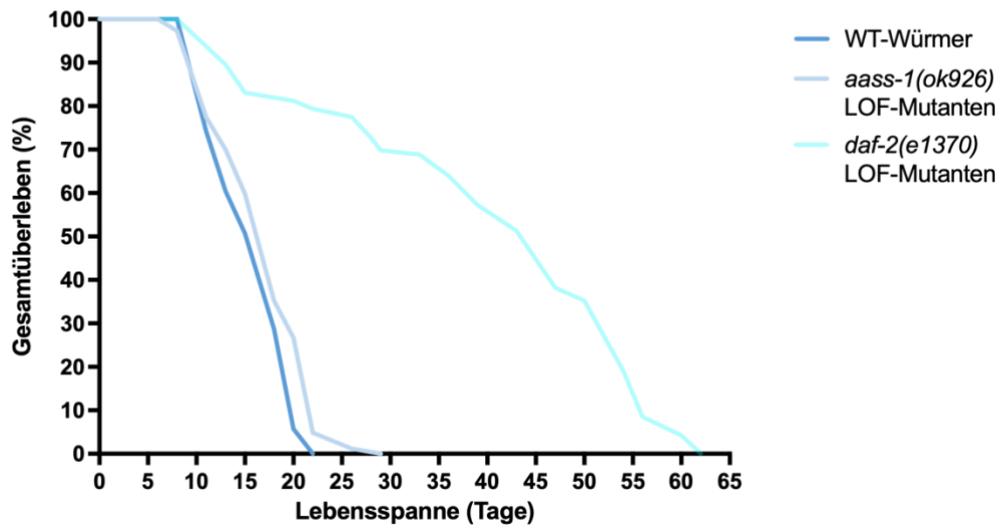
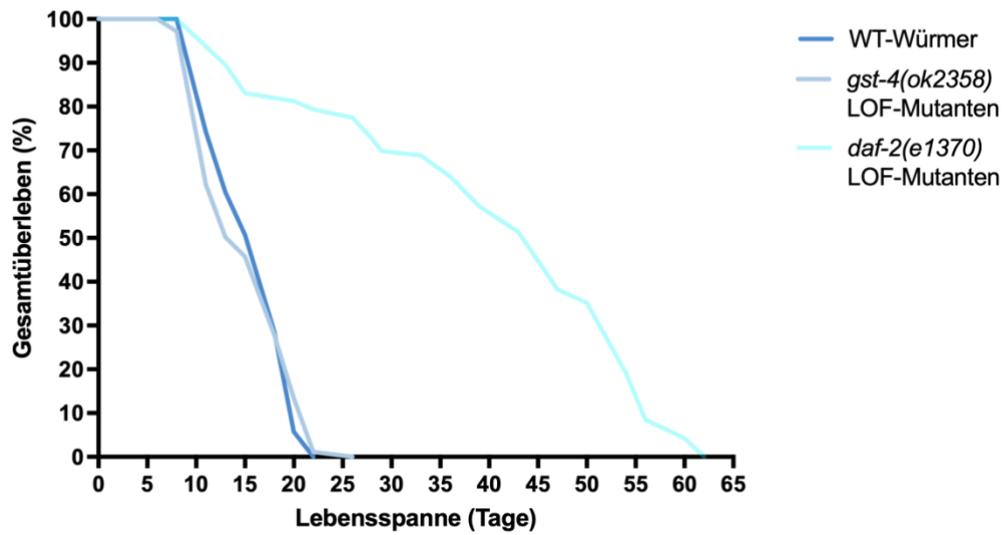
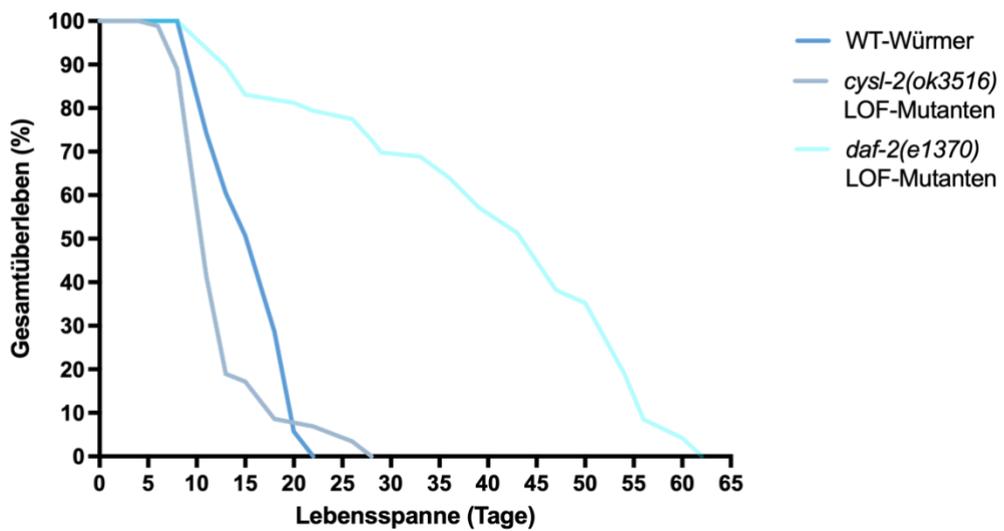
| | gewertet | verletzt/verschwunden | kontaminiert |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|
| WT | 256 (71,1 %) | 84 (23,3 %) | 20 (5,6 %) |
| <i>daf-2(e1370)</i> | 261 (72,5 %) | 99 (27,5 %) | 0 (0,0 %) |
| <i>gst-4 (ok2358)</i> | 250 (69,5 %) | 70 (19,4 %) | 40 (11,1 %) |
| <i>cysl-2 (ok3516)</i> | 135 (37,5 %) | 145 (40,3 %) | 80 (22,2 %) |
| <i>aass-1(ok926)</i> | 225 (62,5 %) | 115 (31,9 %) | 20 (5,6 %) |
| <i>col-179 (ok3010)</i> | 301 (83,6 %) | 39 (10,8 %) | 20 (5,6 %) |
| | 1428 (66,1 %) | 552 (25,6 %) | 180 (8,3 %) |

In der Auswertung zeigte sich, dass *aass-1(ok926)* und *col-179(ok3010)* LOF-Mutanten mit durchschnittlich achtzehn Tagen genauso lange lebten wie WT-Würmer. Die *gst-4(ok2358)* LOF-Mutante hatte eine um einen Tag kürzere mittlere Lebensdauer, was allerdings wahrscheinlich auf eine auffällig große Ergebnisdifferenz in einem der biologischen Replikat zurückgeführt werden kann. Eine deutliche Reduktion der Lebensspanne auf dreizehn Tage zeigte hingegen die *cysl-2(ok3516)* LOF-Mutante. Die Positivkontrollgruppe *daf-2(e1370)* lebte wie erwartet mit 42 Tagen deutlich länger als WT-Würmer (Tabelle 38; Abb. 14). Ein Funktionsverlust der HIF-regulierten RBPs GST-4, AASS-1 und COL-179 hat demnach keinen Einfluss auf die Lebensspanne von *C. elegans*, während eine LOF-Mutation von CYSL-2 diese verkürzt. Somit zeigte sich keine Korrelation von Lebensspanne und Thermotoleranz in *aass-1(ok926)*, *cysl-2(ok3516)* und *gst-4(ok2358)* LOF-Mutanten. Der Funktionsverlust von COL-179 wiederum hatte dagegen weder Einfluss auf die Thermotoleranz noch die Lebensspanne von *C. elegans*.

Tabelle 38: Mittlere Lebensspanne von *Caenorhabditis elegans* Stämmen

Die mittlere Lebensspanne der Versuchsgruppen wurde mithilfe eines Log-Rank-Tests ermittelt.

| | mittlere Lebensspanne | | | |
|--------------------------------|-----------------------|------------|------------|-------------|
| | 1. Versuch | 2. Versuch | 3. Versuch | Ø |
| WT | 18 d | 18 d | 18 d | 18 d |
| <i>daf-2(e1370)</i> | 36 d | 43 d | 47 d | 42 d |
| <i>gst-4 (ok2358)</i> | 18 d | 18 d | 15 d | 17 d |
| <i>cysl-2 (ok3516)</i> | 14 d | 13 d | 11 d | 13 d |
| <i>aass-1(ok926)</i> | 18 d | 18 d | 18 d | 18 d |
| <i>col-179 (ok3010)</i> | 18 d | 18 d | 18 d | 18 d |

A**B****C**

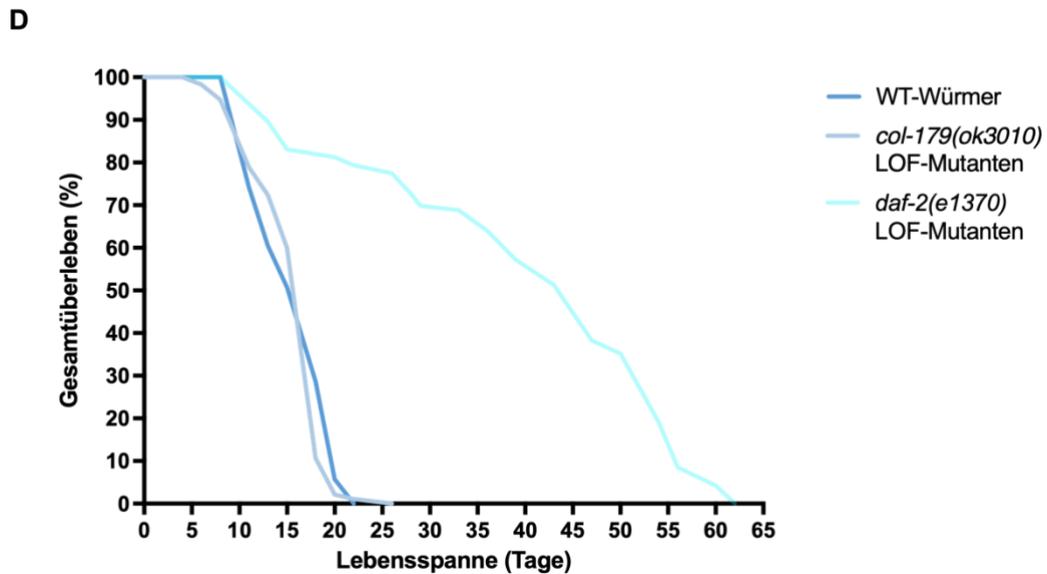


Abb. 14: Lebensspanne von RBP LOF-Mutanten

WT-Würmer und RBP LOF-Mutanten (n = jeweils 120 Tiere) wurden auf FUDR-Platten transferiert. *Daf-2(e1370)* LOF-Mutanten wurden als Positivkontrollgruppe verwendet. Das Gesamtüberleben (%) der Versuchsgruppen wurde alle 48 Stunden erhoben. Kontaminierte, unauffindbare oder verletzte Würmer wurden aus der Wertung genommen. Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen jeweils eins von drei Replikaten der LOF-Mutanten **A** *aass-1(ok926)*, **B** *gst-4(ok2358)*, **C** *cysl-2(ok3516)* und **D** *col-179(ok3010)*. Die mittlere Lebensspanne wurde mithilfe eines Log-Rank-Tests ermittelt (siehe Tabelle 38).

4.2. Einfluss der H₂S-Donatoren Mesna und Kala namak auf die Stressresistenz von *Caenorhabditis elegans*

4.2.1. Die Exposition mit Mesna und Kala namak steigert die Thermotoleranz von *Caenorhabditis elegans*

Im Rahmen einer anderen Doktorarbeit konnte mittels Hitzeschock bereits gezeigt werden, dass die Exposition mit den H₂S-Donatoren Kala namak und Mesna die Thermotoleranz von *C. elegans* erhöht.¹⁵⁹ Die zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings noch unbekannt. Zunächst wurde untersucht, ob sich der thermoprotektive Effekt beider Substanzen reproduzieren lässt. Dazu wurden WT-Würmer auf Mesna- oder Kala namak-Platten transferiert. Die Positivkontrollgruppen wurden dagegen auf NaHS- und Natriumthiosulfat-Platten gehalten. Beide Substanzen sind potente H₂S-Donatoren, die schon in vielen Studien zur Wirkung von H₂S eingesetzt wurden und teilweise bereits klinisch zugelassen sind (unter anderem zur Behandlung von Zyanid- und CO-Vergiftung sowie Abmilderung der Toxizität von Cisplatin).^{110,160} Die Thermotoleranz aller Versuchsgruppen wurde in der Folgegeneration mittels Hitzeschock erhoben und mit der von nicht exponierten WT-Würmern verglichen. Sowohl die mit Mesna oder Kala namak als auch mit NaHS oder Natriumthiosulfat exponierten WT-Würmer zeigten sich resistenter gegenüber Hitzestress (Abb. 15). Somit konnte der thermoprotektive Effekt von Mesna und Kala namak erfolgreich reproduziert werden.

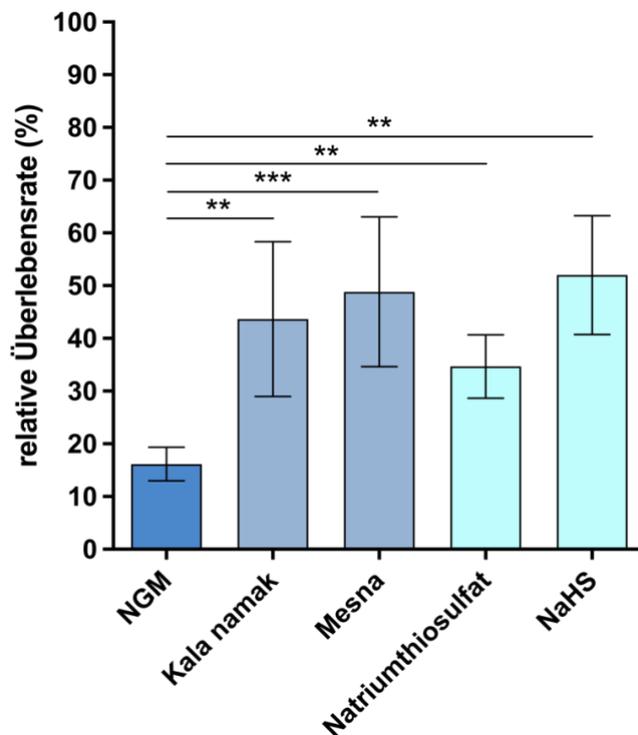


Abb. 15: Thermotoleranz von WT-Würmern unter Exposition mit Mesna oder Kala namak

WT-Würmer wurden auf Mensa- oder Kala namak-Platten transferiert. Die Positivkontrollgruppen wurden dagegen auf Natriumthiosulfat- und NaHS-Platten überführt. Die Folgegeneration (n = jeweils 60 Tiere) wurde anschließend mittels Hitzeschock (37 °C für 105 min) gestresst. Die relative Überlebensrate (%) der Versuchsgruppen wurde nach zwölf Stunden Regenerationszeit erhoben. Die Säulen zeigen den Mittelwert aus sechs Replikaten (NGM, Kala namak und Mesna) bzw. aus drei Replikaten (Natriumthiosulfat und NaHS) mit SA. Die Signifikanz wurde mithilfe eines ungepaarten Student's t-Tests ermittelt:

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

4.2.2. Generierung einer *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* Loss-of-Function-Mutante

Der thermoprotektive Effekt von Mesna und Kala namak könnte sowohl auf der Freisetzung von H₂S als auch auf der Aktivierung H₂S-unabhängiger Stresssignalwege zurückzuführen sein. So wird die Hitzestressantwort im Wurm nicht nur durch den HIF-1 sondern auch durch den Transkriptionsfaktor DAF-16 reguliert, der bekanntermaßen nicht durch H₂S induziert werden kann.^{105,161,162} Um herauszufinden, ob der thermoprotektive Effekt von Mesna und Kala namak möglicherweise auch von der gemeinsamen Aktivierung des HIF-1 und DAF-16 abhängig ist, wurde die LOF-Mutante *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* generiert. Dazu wurden die LOF-Mutanten *hif-1(ia4)* und *daf-16(mu86)* miteinander gekreuzt. Zunächst wurden mehrere *hif-1(ia4)* Hermaphroditen bei 32 °C für fünf Stunden gestresst und unter ihren Nachkommen Männchen mit ihrem typischen Phänotyp selektiert. Diese wurden anschließend mit mehreren *daf-16(mu86)* Hermaphroditen verpaart. Zuletzt wurde in der F2 Generation mithilfe von Genotypisierung nach homozygoten Doppelmutationen gesucht.

4.2.3. Der thermoprotektive Effekt von Mesna und Kala namak ist abhängig vom HIF-1 und/oder DAF-16

Der thermoprotektive Effekt von Mesna und Kala namak hängt wahrscheinlich mit der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren HIF-1 und/oder DAF-16 zusammen, die beide maßgeblich die Hitzestressantwort im Wurm regulieren. Deshalb wurde der Einfluss beider Substanzen auf die Thermotoleranz von *daf-16(mu86)*, *hif-1(ia4)* sowie *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten untersucht. Dazu wurden WT-Würmer und LOF-Mutanten zunächst auf Mesna- oder Kala namak-Platten transferiert. Die Folgegeneration wurden anschließend einem Hitzeschock ausgesetzt und ihre Thermotoleranz mit der von nicht exponierten Tieren verglichen.

Die mit Kala namak exponierten *daf-16(mu86)* und *hif-1(ia4)* Versuchsgruppen konnten wegen mehrfachem Wassereinbruch nicht ausgewertet werden. *Daf-16(mu86)* und *hif-1(ia4)* LOF-Mutanten wiesen weder auf NGM- oder Mesna-Platten eine veränderte Thermotoleranz auf. Zusätzlich zeigten sich auch in WT-Würmern kein thermoprotektiver Effekt von Mesna (Abb. 16 A). Somit sind diese Teilergebnisse als nicht valide zu werten. *Daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten wiesen weder unter Standardbedingungen noch unter Exposition mit Mesna und Kala namak eine veränderte Thermotoleranz auf. Der thermoprotektive Effekt beider Substanzen konnte dagegen in WT-Würmern erfolgreich reproduziert werden (Abb. 16 B). Somit ist der thermoprotektive Effekt von Mesna und Kala namak von den Transkriptionsfaktoren HIF-1 und/oder DAF-16 abhängig.

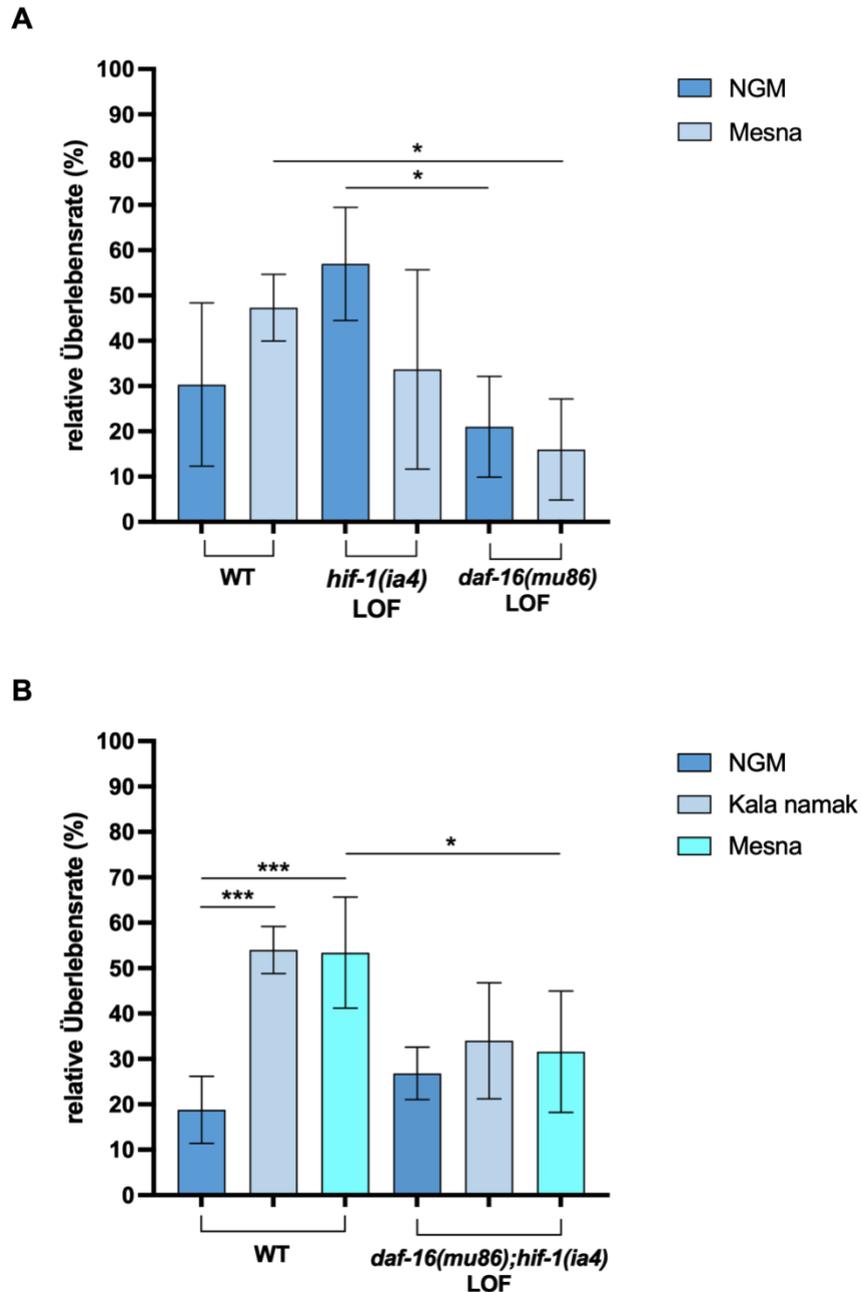


Abb. 16: Thermotoleranz von *hif-1(ia4)*, *daf-16(mu86)* und *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten unter Exposition mit Kala namak und Mesna

WT-Würmer sowie *hif-1(ia4)*, *daf-16(mu86)* und *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten wurden auf Kala namak- oder Mesna-Platten transferiert. Die Folgegeneration (n = jeweils 60 Tiere) wurde anschließend mittels Hitzeschock (37 °C für 105 min) gestresst.

A Relative Überlebensrate (%) von WT-Würmern sowie *hif-1(ia4)* und *daf-16(mu86)* LOF-Mutanten unter Exposition mit Mesna nach zwölf Stunden Regenerationszeit. Die Säulen zeigen den Mittelwert aus drei Replikaten mit SA.

B Relative Überlebensrate (%) von WT-Würmern und *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten unter Exposition mit Kala namak und Mesna nach zwölf Stunden Regenerationszeit. Die Säulen zeigen den Mittelwert aus sechs Replikaten mit SA.

Die Signifikanz wurde mithilfe eines ungepaarten Student's t-Tests ermittelt: * = p < 0,05, *** = p < 0,001.

4.2.4. Messung intrazellulärer H₂S-Konzentrationen in *Caenorhabditis elegans*

Bisher ist unbekannt, inwieweit verschiedene H₂S-Donatoren die intrazelluläre H₂S-Konzentration in *C. elegans* beeinflussen. Eine entsprechende Messmethode konnte allerdings noch nicht im Labor etabliert werden. Deshalb wurde evaluiert, ob sich H₂S-Konzentrationen in WT-Würmern mittels konventioneller H₂S-Teststreifen bestimmen lassen. Zunächst wurde eine ungefähr gleich große Anzahl an WT-Wurmeiern auf Mesna-, Kala namak-, Natriumthiosulfat- und NaHS-Platten transferiert. Die Vergleichsgruppe wurde dagegen auf regulären NGM-Platten herangezogen. Nachdem die Tiere ausgewachsen waren, wurden sie lysiert. Über den Proben wurde anschließend jeweils ein H₂S-Teststreifen angebracht. Dieser verfärbt sich bei Reaktion mit H₂S schwärzlich. Die Wurmlysate wurden schließlich bei 95 °C für drei Stunden erhitzt.

In der Auswertung zeigte sich auf keinem der H₂S-Teststreifen eine schwärzliche Verfärbung (Abb. 17). Damit scheint die Methode nicht geeignet zu sein, um Unterschiede in der intrazellulären H₂S-Konzentration von *C. elegans* Stämmen zu detektieren.

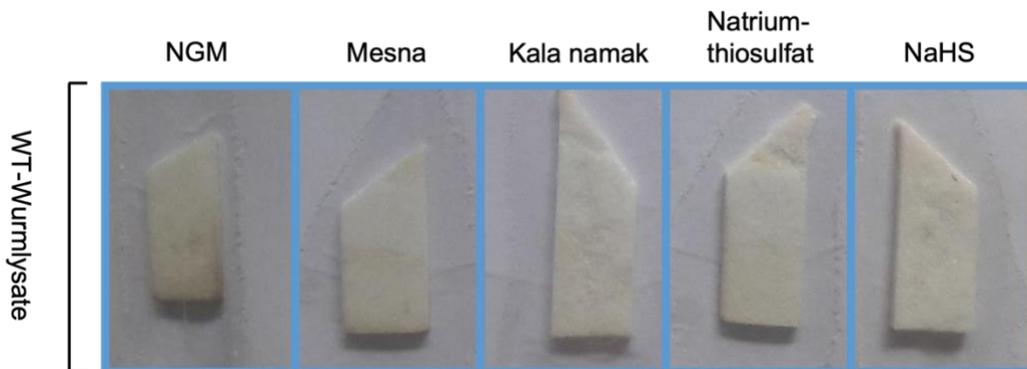


Abb. 17: H₂S-Messung in WT-Wurmlysaten mittels konventioneller H₂S-Teststreifen

WT-Wurmeier (n = jeweils 1000 Tiere) wurden auf NGM-, Mesna-, Kala namak-, Natriumthiosulfat- oder NaHS-Platten transferiert. Nach 60 Stunden wurden die adulten Würmer lysiert und anschließend erhitzt (95 °C). Die Höhe der H₂S-Konzentration in den Proben wurde nach drei Stunden anhand der Verfärbung eines konventionellen H₂S-Detektionspapiers bestimmt. Die Bilder zeigen jeweils einen von drei H₂S-Teststreifen. Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Die fehlgeschlagene H₂S-Detektion könnte möglicherweise mit dem Versuchsaufbau oder der Sensitivität der H₂S-Teststreifen zusammenhängen. Deshalb wurde als Nächstes ausgetestet, ob diese sich über Reinkonzentrationen von Mesna (1,2 mmol/L), Kala namak (51,3 µmol/L), Natriumthiosulfat oder NaHS (jeweils 50 µmol/L) verfärben. Wie beim vorherigen Versuchsaufbau wurde über den Proben jeweils ein H₂S-Teststreifen angebracht, bevor sie bei 95 °C für drei Stunden erhitzt wurden.

Über dem Kala namak Reinkonzentrat trat eine deutliche, schwärzliche Verfärbung auf. Dagegen zeigten sich die restlichen H₂S-Teststreifen immer noch unverändert (Abb. 18 A). Deshalb wurde der Versuch noch einmal mit deutlich höheren Konzentrationen von Natriumthiosulfat wiederholt (10 mmol/L, 30 mmol/L, 70 mmol/L und 100 mmol/L). Am Ende zeigte auch hier keiner der H₂S-Teststreifen eine Verfärbung (Abb. 18 B).

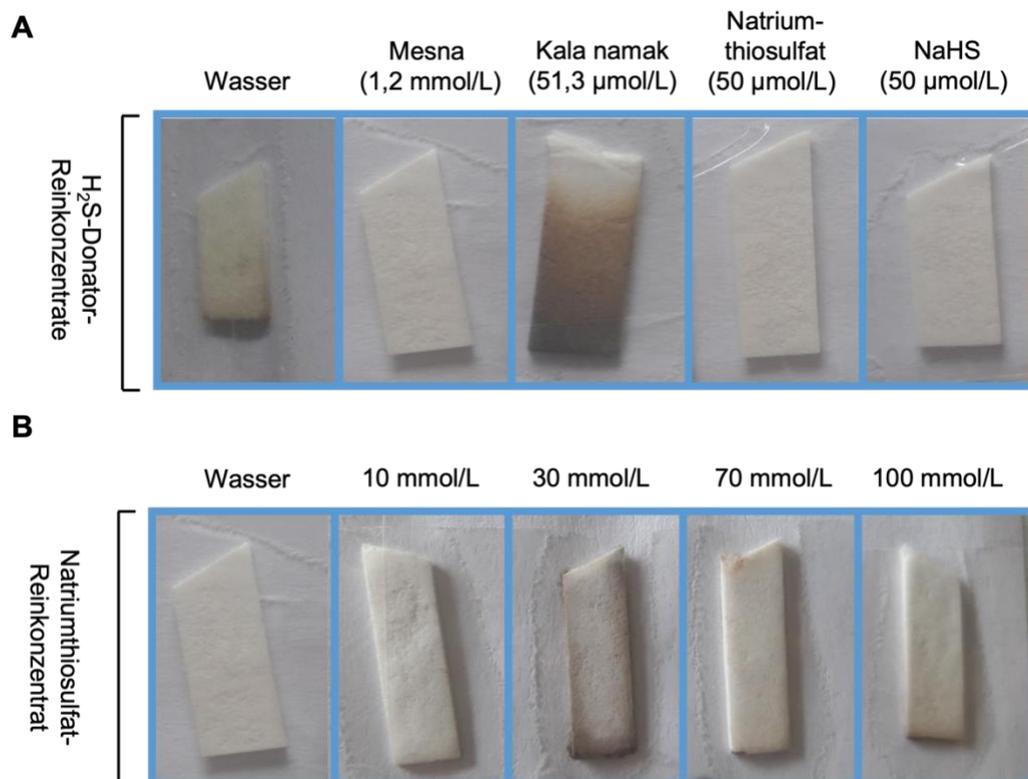


Abb. 18: H₂S-Messung in Reinkonzentraten verschiedener H₂S-Donatoren mittels konventioneller H₂S-Teststreifen

A Reinkonzentrate von Mesna (1,2 mmol/L), Kala namak (51,3 µmol/L), Natriumthiosulfat und NaHS (50 µmol/L) sowie **B** Reinkonzentrate von Natriumthiosulfat (10 mmol/L, 30 mmol/L, 70 mmol/L und 100 mmol/L) wurden erhitzt (95 °C). Die Höhe der H₂S-Konzentration in den Proben wurde nach drei Stunden anhand der Verfärbung eines konventionellen H₂S-Detektionspapiers bestimmt. Die Bilder zeigen jeweils einen von drei H₂S-Teststreifen. Die Versuche wurden insgesamt dreimal durchgeführt.

4.2.5. Etablierung einer Methode zur Messung der endogenen H₂S-Produktion in *Caenorhabditis elegans*

Tierexperimentelle Studien in höheren Organismen deuten darauf hin, dass die endogene H₂S-Produktion speziesübergreifend durch eine Exposition mit H₂S-Donatoren beeinflusst werden kann.¹⁶³⁻¹⁶⁶ Für deren Quantifizierung wurde bereits eine einfache und kostengünstige Messmethode in *C. elegans* entwickelt.¹⁶⁷ Um diese im Labor zu etablieren, wurde der Grundsatzversuch der Ursprungspublikation nachgestellt.

Zunächst wurden WT-Würmer und *eat-2(ad1116)* LOF-Mutanten, die durch einen Defekt im Pharynx langsamer Nahrung aufnehmen, synchronisiert. Anschließend wurde eine in etwa gleich große Population beider Stämme lysiert. Den Proben wurden zusätzlich die Substrate der H₂S-produzierenden Enzyme CBS und CSE, L-Cystein und dessen Cofaktor PLP, beigefügt. Als H₂S-Detektionspapier wurde ein in Blei(II)-Acetat getunktes Blotting-Papier über den Wurmlysaten angebracht: Blei(II)-Acetat reagiert mit H₂S unter Bildung von schwarzem Bleisulfid. Die Proben wurden schließlich bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert.

Das H₂S-Detektionspapier verfärbte sich über den Lysaten von *eat-2(ad1116)* LOF-Mutanten stärker als über den WT-Wurmlysaten (Abb. 19 A). Diese Beobachtung konnte durch eine Quantifizierung der verfärbten Bereiche verifiziert werden (Abb. 19 B). Daraus lässt sich schließen, dass die endogene H₂S-Produktion in *eat-2(ad1116)* LOF-Mutanten höher ist als in WT-Würmer. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Ursprungspublikation. Somit konnte die Funktionalität der neuen Messmethode erfolgreich gezeigt werden.

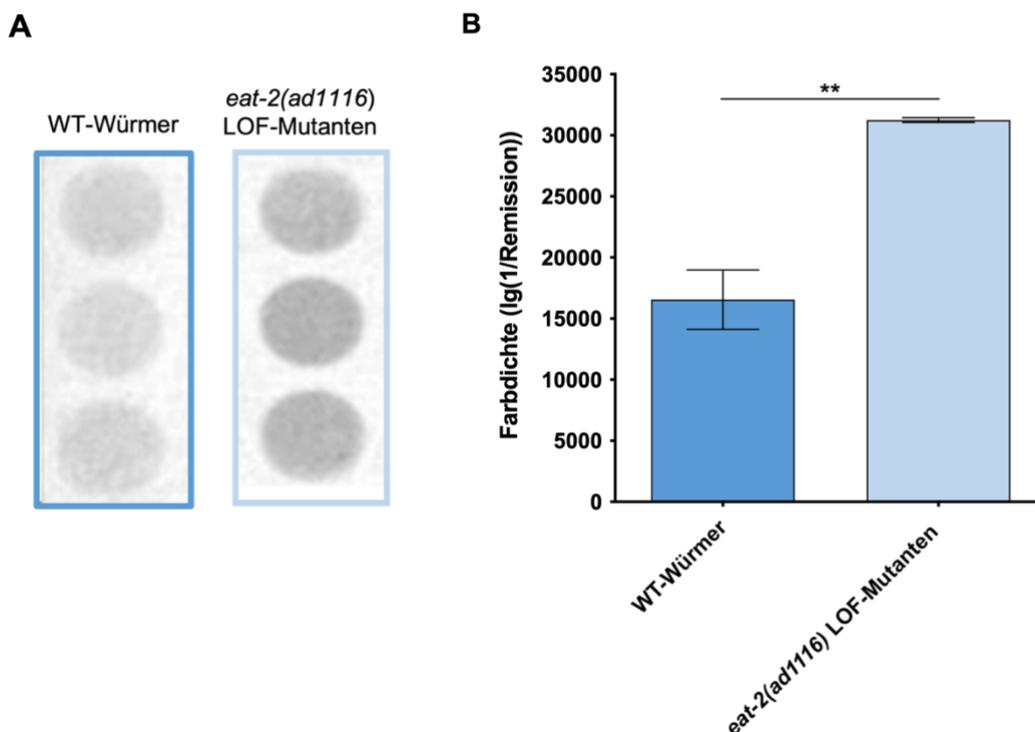


Abb. 19: Endogene H₂S-Produktion von WT-Würmern und *eat-2(ad1116)* LOF-Mutanten

Eier von WT-Würmern und *eat-2(ad1116)* LOF-Mutanten (n = jeweils 1000 Tiere) wurden auf NGM-Platten transferiert. Nach 60 Stunden wurden die adulten Tiere lysiert und zusammen mit 10 mmol/L L-Cystein und 6 mmol/L PLP erhitzt (37 °C).

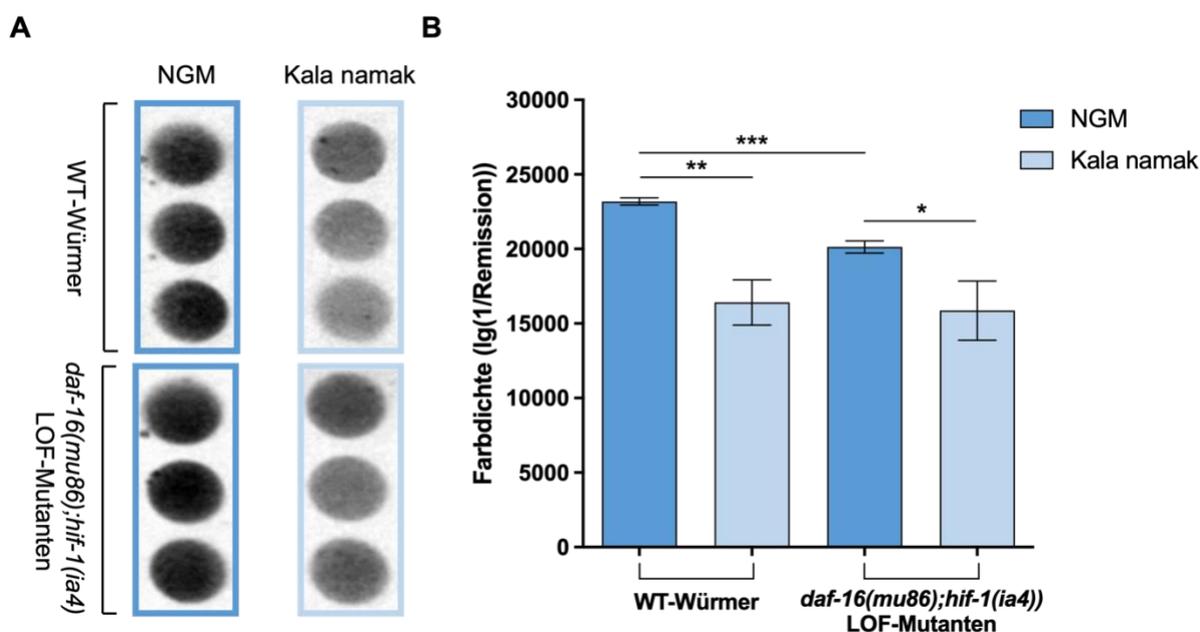
A Die Höhe der H₂S-Konzentration in den Proben wurde nach zwei Stunden anhand der Verfärbung eines in Blei(II)-Acetat getauchten Blotting-Papiers bestimmt.

B Bestimmung der Farbdichte (lg(1/Remission)) der H₂S-Teststreifen aus A mittels ImageJ. Die Säulen zeigen den Mittelwert aus drei Replikaten mit SA. Die Signifikanz wurde mithilfe eines ungepaarten Student's t-Tests ermittelt: ** = p < 0,01.

4.2.6. Einfluss von Mesna und Kala namak auf die endogene H₂S-Produktion in *Caenorhabditis elegans*

Die neu etablierte Messmethode wurde dazu verwendet, den Einfluss von Mesna und Kala namak auf die endogene H₂S-Produktion in WT-Würmern und *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten miteinander zu vergleichen. Dazu wurden beide Wurmstämme auf Mesna- und Kala namak-Platten transferiert. Eine in etwa gleich große, synchronisierte Population ihrer Nachkommen wurde anschließend lysiert. In der Vergleichsgruppe wurde ebenso mit nicht exponierten Würmern verfahren. Den Proben wurde anschließend L-Cystein und PLP zugegeben bevor sie bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert wurden. Als H₂S-Detektionspapier wurde wiederum ein in Blei(II)-Acetat getunktes Blotting-Papier über den Wurmlysaten angebracht.

Über den H₂S-Teststreifen von mit Mesna oder Kala namak exponierten Lysaten von WT-Würmern und *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten traten jeweils weniger schwärzliche Verfärbungen auf, als über denen von unbehandelten Tieren. Darüber hinaus wiesen die H₂S-Teststreifen unter Standardbedingungen über *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten weniger Verfärbungen auf als über WT-Würmern. Dagegen zeigten sich divergierende Ergebnisse beim Vergleich der Verfärbungen über mit Mesna oder Kala namak exponierten WT-Würmern und *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten (Abb. 20 A-D). Damit scheint sowohl die Exposition mit Mesna oder Kala namak als auch ein Funktionsverlust der Transkriptionsfaktoren HIF-1 und/oder DAF-16 die endogene H₂S-Produktion in *C. elegans* zu beeinflussen.



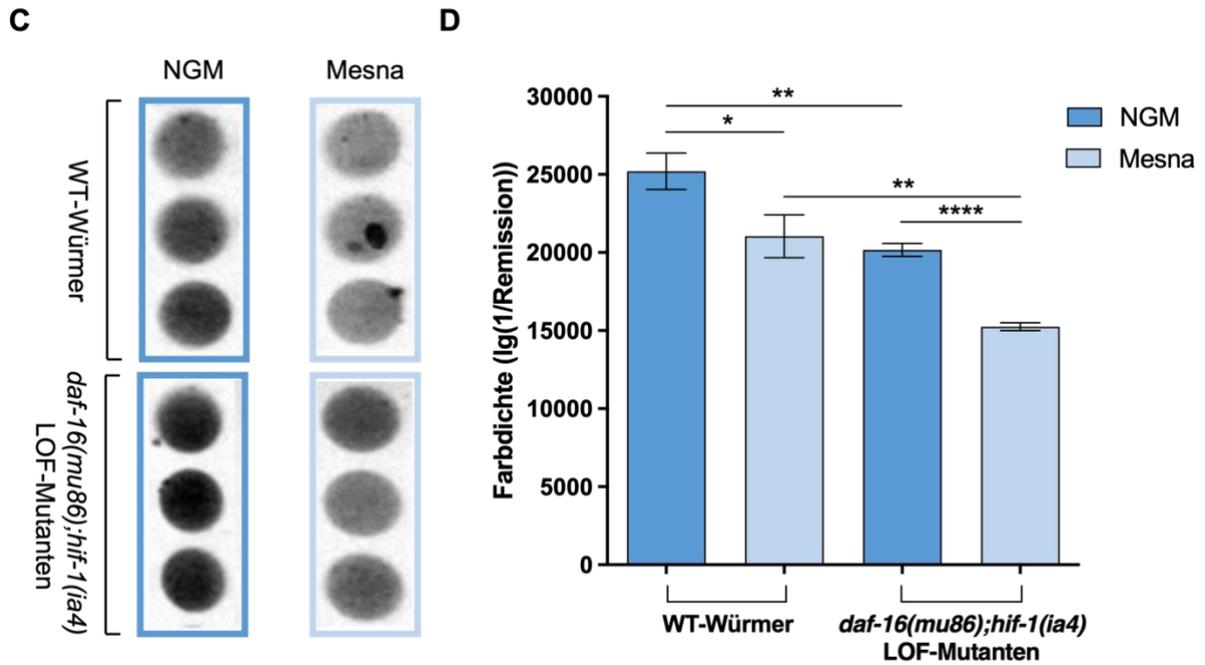


Abb. 20: Endogene H₂S-Produktion von WT-Würmern und *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten unter Exposition mit Kala namak und Mesna

Eier von WT-Würmern und *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten (n = jeweils 1000) wurden auf NGM-Kala namak- oder Mesna-Platten transferiert. Nach 60 Stunden wurden die adulten Tiere lysiert und zusammen mit 10 mmol/L L-Cystein und 6 mmol/L PLP erhitzt (37 °C).

A / C Die Höhe der H₂S-Konzentration in den Proben wurde nach zwei Stunden anhand der Verfärbung eines in Blei(II)-Acetat getauchten Blotting-Papiers bestimmt.

B / D Bestimmung der Farbdichte (lg(1/Remission)) der H₂S-Teststreifen mittels ImageJ. Die Säulen zeigen den Mittelwert aus drei Replikaten mit SA. Die Signifikanz wurde mithilfe eines ungepaarten Student's t-Tests ermittelt: * = p < 0,05, ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001.

5. Diskussion

5.1. Einfluss HIF-regulierter RNA-bindender Proteine auf die Stressresistenz von *Caenorhabditis elegans*

5.1.1. Methodische Fehlerquellen des Hitzeschocks

Beim Hitzeschock wird die hohe Sensibilität von *C. elegans* gegenüber Temperaturunterschieden dazu genutzt, den Einfluss von Stress auf Physiologie, Verhalten, Fertilität und Überleben im Wurm, und damit indirekt auch in höheren Organismen, zu untersuchen. Es existieren allerdings verschiedene Versuchsprotokolle, die sich in der Auswahl von Temperatur, Expositionsdauer, Wurm-Entwicklungsstadium und Versuchsmedium (darunter temperierte Flüssigkultur/Agarplatte/Inkubator/Wasserbad) unterscheiden.¹⁶⁸ Daraus ergeben sich mögliche methodische Fehlerquellen, die im Folgenden diskutiert werden.

Jede Form von außerplanmäßiger Stressexposition kann bekanntermaßen zur Aktivierung von Stresssignalwegen und damit zu einer temporär veränderten Stressresistenz in *C. elegans* führen.¹⁶⁹ Der große Nachteil im Einsatz von temperierten Flüssigkulturen oder Agarplatten liegt darin, dass den Tieren zwischen Transfer und Hitzeexposition keine Erholungszeit bleibt. Doch auch Inkubatoren sind sehr anfällig für Messfehler, da diese aufgrund ihrer Funktionsweise häufig einen Temperaturgradienten (von oben nach unten / vorne nach hinten) besitzen und/oder beim Öffnen der Geräte unvermeidbar Hitze verloren geht.¹⁶⁸ Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein temperiertes Wasserbad zur Exposition von Hitzestress verwendet. Weitere Vorteile sind dessen einfache und kostengünstige Anwendung, sowie eine hohe Retest-Reliabilität. Allerdings existieren auch hier mögliche Störfaktoren. So heizt sich das Wasserbad, abhängig von der Umgebungstemperatur, selbstständig intermittierend auf. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass einige Tiere während dem Hitzeschock unterschiedlich hohen Temperaturen ausgesetzt werden. Dieses Risiko ließe sich in Zukunft vermeiden, indem das Wasserbad nach dem Aufheizen ausgeschaltet wird. Zwar verringert sich dadurch langsam die Wassertemperatur, diese wäre dafür aber in allen Versuchsreplikaten weitestgehend konstant. Eine weitere, mögliche Schwachstelle von Wasserbädern liegt darin, dass die Agarplatten wegen ihrem Auftrieb mit mehreren Gewichten am Boden, unter dem die Heizstäbe liegen, fixiert werden müssen. Durch ein ungünstig platziertes Gewicht könnten deshalb einige Würmer wiederum unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt worden sein. Der Einsatz eines großen, wasserbadumfängenden Gewichtseinsatzes könnte in Zukunft dieses Risiko minimieren.

Unabhängig vom Versuchsprotokoll liegt eine große methodische Schwachstelle in der Auswertung des Hitzeschocks. So ist die Bewertung, ob ein Wurm tot oder nur temporär durch

den Hitzestress paralyisiert ist, nicht immer eindeutig und bleibt damit am Ende untersucherabhängig. Die Auswertungsobjektivität ließe sich möglicherweise durch eine verlängerte Erholungszeit der Würmer nach Hitzeexposition erhöhen. Alternativ existieren bereits Konstruktionen, die die Bewegung der Würmer über einen definierten Zeitraum kontinuierlich detektieren können.¹⁷⁰ Wenn auch noch nicht kommerziell verfügbar, könnte eine solche Vorrichtung die Auswertung des Hitzeschocks weitestgehend objektivieren. Die „*Caenorhabditis elegans* Lifespan Machine“ konnte nach Abschluss dieser Arbeit erfolgreich im Nephrolab etabliert werden.

5.1.2. HIF-regulierte RNA-bindende Proteine beeinflussen die Thermotoleranz von *Caenorhabditis elegans*

Das Genom des Modellorganismus *C. elegans* beinhaltet viele Orthologe renaler Proteine und eignet sich deshalb zum Studium der Nephroprotektion.^{132,133} Als dessen Marker wurde die Thermotoleranz gewählt, da diese im Wurm primär durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert wird.¹⁷¹ Dieser wird nicht nur bei Hitzestress, sondern unter anderem auch beim Auftreten einer Gewebehypoxie induziert und weist damit Parallelen zur Signaltransduktion im Menschen auf.¹⁷² Darüber hinaus ist er als zentraler Regulator der Nephroprotektion bekannt.²⁵ In einem ersten Screening wurde der Einfluss eines Funktionsverlusts von vierzehn HIF-regulierten RBPs, die in einer *in silico* Analyse als potenzielle Kandidaten der Nephroprotektion identifiziert werden konnten, auf die Thermotoleranz von *C. elegans* untersucht. In fünf Kandidaten (*aass-1(ok926)*, *cysl-2(ok3516)*, *argk-1(ok2973)*, *gst-4(ok2358)* und *zfp-3(gk3165)* LOF-Mutanten) zeigten sich dabei signifikante Unterschiede. Im Folgenden werden die dafür möglichen Ursachen für jeden Kandidaten diskutiert.

Aass-1(ok926) LOF-Mutanten weisen einen Funktionsverlust des RBP AASS-1 auf, einem Ortholog der humanen α -Aminoadipinsäure-Semialdehyd-Synthase.¹⁷³ Als Schlüsselenzym des Saccharopin-Signalwegs ist diese maßgeblich am Abbau der Aminosäure Lysin in hepatischen Mitochondrien beteiligt. In Folge einer LOF-Mutation kommt es deshalb in höheren Organismen zur Stoffwechselerkrankung Hyperlysinämie, mit charakteristischer Vermehrung der Lysin-Konzentration im Blutplasma und Zerebrospinalflüssigkeit.¹⁷⁴

In *C. elegans* zeigten sich *aass-1(ok926)* LOF-Mutanten deutlich anfälliger gegenüber Hitzestress. Dies könnte möglicherweise mit der signifikanten Akkumulation von Saccharopin, einem Zwischenprodukt des Lysin-Abbaus, zusammenhängen. Der Metabolit stört bekanntermaßen den Ablauf der Atmungskette und führt dadurch zur Ausbildung einer mitochondrialen Dysfunktion im Wurm.^{173,175} Die „Zellkraftwerke“ sind spezieübergreifend in die zelluläre Stressantwort eingebunden. Zum einen stellen sie über oxidative Phosphorylierung und Glykolyse sicher, dass für zelluläre Adaptionprozesse ausreichend

Energie zur Verfügung steht. Zum anderen steuern sie über die Ausschüttung verschiedener Hormone, die auch Mitokine genannt werden, die zelluläre Plastizität.¹⁷⁶ Die erniedrigte Thermotoleranz von *aass-1(ok926)* LOF-Mutanten könnte somit möglicherweise auf ihre mitochondriale Dysfunktion zurückzuführen sein. Dagegen spricht wiederum, dass es gerade bei Mutationen von mitochondrialen Fusionsgenen, wie beispielsweise *eat-3* und *fzo-1*, zur Aktivierung verschiedener Stresssignalwege (darunter dem Hypoxie-Signalweg) in *C. elegans* kommt. So zeigten *eat-3(tm1107)* und *fzo-1(tm1133)* LOF-Mutanten eine im Vergleich zu WT-Würmern erhöhte Resistenz gegenüber thermalem und oxidativem Stress. Interessanterweise war ihre Resistenz gegenüber hypoxischem und osmotischem Stress gleichzeitig erniedrigt.¹⁷⁷ Ein Erklärungsansatz hierfür lautet, dass Zellen aufgrund limitierter Ressourcen nur über eingeschränkte Adaptionsmechanismen verfügen könnten.¹⁷⁷ Zusammenfassend kann die erniedrigte Thermotoleranz von *aass-1(ok926)* LOF-Mutanten nicht eindeutig mit dem Vorhandensein einer mitochondrialen Dysfunktion erklärt werden. Möglicherweise besitzt AASS-1 weitere enzymatische Funktionen oder ist in Stresssignalwegen involviert, die bisher nicht bekannt sind. Des Weiteren ist über dessen Funktion als RBP bisher nur wenig bekannt, da es erst vor kurzem als solches identifiziert werden konnte. AASS-1 zeigte im RBPom von *vhl-1(ok161)* LOF-Mutanten, mit dauerhaft erhöhter HIF-Aktivität, ein verstärktes RNA-Bindevverhalten.⁹⁵ Somit könnte die erniedrigte Thermotoleranz von *aass-1(ok926)* LOF-Mutanten möglicherweise auch mit der gestörten Interaktion von AASS-1 mit dessen RNA-Targets zusammenhängen.

Argk-1(ok2973) LOF-Mutanten besitzen einen Funktionsverlust des RBP Argininkinase 1 (ARGK-1), einem Ortholog der humanen Creatin-Kinase (CK) vom Mitochondrientyp.¹⁷⁸ Diese katalysiert in den Mitochondrien die Übertragung einer Phosphatgruppe von Kreatinphosphat auf Adenosindiphosphat unter Entstehung des universalen Energieträgers ATP.¹⁷⁹ Weitere Isoenzyme werden in Skelettmuskulatur, Myokard und Gehirn gebildet.¹⁸⁰ Die Funktionalität der CK vom Mitochondrientyp ist insbesondere für die Energieversorgung mitochondrienreicher Gewebe wie dem Herzen oder dem Gehirn entscheidend. So ist bekannt, dass ihre Konzentrationsminderung zur Ausbildung neurodegenerativer Erkrankungen sowie verschiedener Kardiomyopathien beiträgt.^{181,182}

In *C. elegans* zeigten *argk-1(ok2973)* LOF-Mutanten eine im Vergleich zu WT-Würmern erhöhte Thermotoleranz. Dieser Effekt könnte möglicherweise auf eine Störung der mitochondrialen Funktion zurückzuführen sein. So wiesen die thermotoleranten LOF-Mutanten *eat-3(tm1107)* und *fzo-1(tm1133)*, in denen die Fusionsfähigkeit von Mitochondrien gestört ist, ebenfalls eine Abnahme ihrer Energiereserven auf. Ihre erhöhte Stressresistenz basiert dabei zum einen auf der zellulären Reaktion auf fehlgefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum (UPR), zum anderen auf der Aktivierung und Translokation der Transkriptionsfaktoren Skinhead-Protein 1 (SKN-1), DAF-16 und HIF-1, die jeweils

verschiedene Stresssignalwege regulieren.¹⁷⁷ Im RBPom von *vhl-1(ok161)* LOF-Mutanten zeigte sich ARGK-1 indessen nicht erhöht.⁹⁵ Somit hängt die erhöhte Thermotoleranz von *argk-1(ok2973)* LOF-Mutanten wahrscheinlich nicht mit der RBP-RNA-Interaktion zusammen. Stattdessen ist die Aktivierung verschiedener Stresssignalwege (inklusive dem Hypoxie-Signalweg) eine wahrscheinlichere Hypothese.

Gst-4(ok2358) LOF-Mutanten weisen einen Funktionsverlust des RBP Glutathion-S-Transferase 4 (GST-4) auf, einem Ortholog der humanen hämatopoetischen Prostaglandin D Synthase (HPGDS).¹⁸³ HPGDS wird vor allem in antigenpräsentierenden Zellen, Mastzellen und TH₂-Zellen, einer Untergruppe der T-Helfer-Zellen, exprimiert und ist in die Regulation inflammatorischer Prozesse involviert.^{184,185} Das bifunktionale Enzym katalysiert zum einen die Konversion von Prostaglandin H₂, einem Zwischenprodukt der Prostaglandin-Synthese, zu Prostaglandin D₂ in peripherem Gewebe.¹⁸⁶ Prostaglandin D₂ wird vor allem bei Allergenkontakt massiv freigesetzt und induziert eine Vasodilatation, Bronchokonstriktion und Rekrutierung weiterer Immunzellen.¹⁸⁷ Zum anderen katalysiert HPGDS die Bindung des Antioxidans Glutathion an elektrophile Xenobiotika und potenziell toxischer Metabolite.¹⁸⁶ Dazu gehören insbesondere ROS, eine Gruppe hochreaktiver chemischer Verbindungen (darunter Hyperoxid-Anionen (O₂⁻), Hydroxyl-Radikale (HO·) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂)), die unter anderem als Nebenprodukte bei der Zellatmung entstehen.¹⁸⁸ So konnte bereits gezeigt werden, dass die Akkumulation von ROS zur Aktivierung von HPGDS beiträgt.¹⁸⁹ Durch seine zentralen Funktionen in der Immunmodulation ist HPGDS in den letzten Jahren immer weiter in den Fokus der Wissenschaft gerückt. So wird derzeit über den Einsatz von spezifischen HPGDS-Inhibitoren in der Therapie von allergischen Entzündungsreaktionen, genetisch bedingten Muskeldystrophien, neurodegenerativen Erkrankungen und Rückenmarksverletzungen diskutiert.¹⁹⁰⁻¹⁹³

In *C. elegans* zeigten *gst-4(ok2358)* LOF-Mutanten eine im Vergleich zu WT-Würmern erhöhte Thermotoleranz. Dieser Effekt ist dabei unabhängig von der Konzentration an Prostaglandin D₂ im Wurm, da GST-4 bekanntermaßen nicht an dessen Synthese beteiligt ist.¹⁹⁴ Stattdessen könnte ihre gesteigerte Hitzestressresistenz möglicherweise mit der Akkumulation von ROS zusammenhängen.¹⁹⁵ Während der Metabolit in niedriger Konzentration zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase beiträgt, führt er in höherer Konzentration zur Zellschädigung in Form von oxidativem Stress.¹⁹⁶ Als Reaktion kommt es in *C. elegans* zum einen zur Reduktion der Insulin/IGF-1 Signalkaskade, zum anderen zur direkten Aktivierung von spezifischen Proteinkinasen, der UPR, der Apoptose-Signalgebung sowie der Transkriptionsfaktoren Nuklearfaktor 2 (Nrf₂) und HIF-1, die jeweils verschiedene Stresssignalwege regulieren.^{188,197-199} Dazu passend konnte bereits gezeigt werden, dass ein moderater Anstieg der intrazellulären ROS-Konzentration sowohl die oxidative als auch thermale Stressresistenz von *C. elegans* positiv beeinflussen kann.^{200,201} GST-4 zeigte sich indes im RBPom von

vhl-1(ok161) LOF-Mutanten nicht erhöht und wies somit kein verändertes RNA-Bindevverhalten auf.⁹⁵ Dementsprechend hängt die erhöhte Thermotoleranz von *gst-4(ok2358)* LOF-Mutanten am ehesten mit der Aktivierung verschiedener Stresssignalwege (darunter dem Hypoxie-Signalweg) zusammen.

Cysl-2(ok3516) LOF-Mutanten besitzen einen Funktionsverlust des RBP CYSL-2, einem Ortholog der humanen CBS.¹⁰⁶ Diese wird vor allem in Leber, Gehirn, Niere und Pankreas exprimiert und ist dort maßgeblich am Stoffwechsel der Aminosäure L-Cystein beteiligt.²⁰² So katalysiert CBS kontinuierlich die Konversion der Aminosäuren L-Serin und L-Homocystein zu Wasser und dem Metaboliten L-Cystathionin. Dieser wird anschließend durch die CSE zu L-Cystein und α -Ketobutyrat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, umgewandelt.²⁰³ Im Rahmen einer Hypoxie oder bei hohen intrazellulären Konzentrationen von L-Cystein katalysiert CBS dagegen primär alternative Stoffwechselforgänge unter Anfall des zytoprotektiven Gasotransmitters H₂S. Am bedeutendsten (verantwortlich für 95 % der H₂S-Produktion durch CBS) gilt dabei die partielle Verdrängung von L-Serin durch L-Cystein als Substrat von CBS.^{204,205} Insgesamt ist das Enzym für 30 – 46 % der endogenen H₂S-Produktion verantwortlich und übertrifft damit deutlich den Anteil der anderen H₂S-produzierenden Enzyme im Menschen.²⁰⁶ Ein CBS-Mangel ist insbesondere mit der seltenen, autosomal-rezessiven Erbkrankheit Homocystinurie vergesellschaftet. Dabei kommt es bei Betroffenen in unterschiedlicher Ausprägung zu Linsendislokationen, Kurzsichtigkeit, Entwicklungsverzögerungen mit teilweiser Intelligenzminderung sowie einem Auftreten von Skelettanomalien (ähnlich dem Marfan-Syndrom) und/oder thromboembolischen Ereignissen.²⁰⁷ Unabhängig davon gilt eine Homocysteinämie als bedeutender Risikofaktor für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen, darunter koronarer Herzkrankheit, tiefer Venenthrombose oder Schlaganfall.^{208,209} Die pharmakologische Inhibierung von CBS birgt allerdings auch klinische Anwendungsmöglichkeiten. So ist bekannt, dass CBS bei Tumorerkrankungen, insbesondere beim kolorektalen, Ovarial-, Prostata- oder Mammakarzinom, als auch bei Trisomie 21 („Down-Syndrom“) vermehrt exprimiert wird.²¹⁰ Die nachfolgend gesteigerte H₂S-Produktion wird bei Tumoren mit einem Anstieg der Widerstandsfähigkeit gegenüber antineoplastischen Wirkstoffen oder dem Immunsystem und bei Trisomie 21 mit einem frühzeitigen Auftreten von Neurotoxizität und -degeneration assoziiert.²¹¹⁻²¹³ Die Diskrepanz beruht dabei auf einer biphasischen Dosis-Wirkungs-Beziehung von H₂S: mild erhöhte Konzentrationen sind zytoprotektiv, niedrige oder stark erhöhte Konzentrationen dagegen zytotoxisch.²¹³

In *C. elegans* zeigten *cysl-2(ok3516)* LOF-Mutanten eine im Vergleich zu WT-Würmern erhöhte Thermotoleranz. Dieses Ergebnis überrascht zunächst, führt ein Funktionsverlust von CYSL-2 doch bekanntermaßen zur Abnahme der endogenen H₂S-Produktion.¹⁰⁹ Der Gasotransmitter ist ein direkter Aktivator des HIF-1 im Wurm und induziert damit indirekt auch

dessen Hitzestressantwort.¹⁰⁵ Des Weiteren stellt er ein potentes Reduktionsmittel dar und ist somit zentral am Abbau toxischer Metabolite beteiligt, die beim Hitzestress vermehrt anfallen.^{128,214} Dementsprechend wäre zu erwarten gewesen, dass *cysl-2(ok3516)* LOF-Mutanten anfälliger gegenüber Hitzestress sind. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass ihre endogene H₂S-Produktion lediglich um 13 % reduziert ist. Als Ursache wird eine Kompensation durch weitere CBS Orthologe (CYSL-1, CYSL-3, CYSL-4, CBS-1 und CBS-2) im Wurm diskutiert.¹⁰⁹ Weiterhin ist CYSL-2 am Abbau von Toxinen beteiligt, die beispielsweise beim Verzehr pathogener Bakterien aufgenommen werden.²¹⁵ Ihr bekanntester Vertreter ist die hochgiftige Substanz HCN, die mechanistisch die mitochondriale Atmungskette im Wurm inhibiert. Im Rahmen der Immunantwort kommt es daraufhin zur Aktivierung des HIF-1, der nachfolgend die Genexpression zytoprotektiver Proteine induziert. Dazu gehört auch die CYSL-2, die im Rahmen des HCN-Assimilationssignalwegs den ersten Schritt in der Detoxifikation von HCN katalysiert.¹⁰⁶ Daneben gibt es erste Hinweise darauf, dass die CYSL-2 auch unabhängig vom HIF-1 an der Abwehr weiterer Toxine beteiligt sein könnte.²¹⁵ Möglicherweise induzieren diese ebenfalls die Aktivierung von Stresssignalwegen im Wurm. Da die verwendeten Agarplatten aber jeweils mit frisch angesetzten Bakterienkulturen beimpft wurden, kann eine Kontamination mit pathogenen Keimen ausgeschlossen werden. CYSL-2 zeigte sich indes im RBPom von *vhl-1(ok161)* LOF-Mutanten nicht erhöht, sodass auch ein verändertes RNA-Bindevverhalten als Ursache der erhöhten Thermotoleranz von *cysl-2(ok3516)* LOF-Mutanten ausgeschlossen werden kann. Möglicherweise könnte die Beteiligung von CYSL-2 an der Entwicklung und Reproduktionsfähigkeit des Fadenwurms eine Erklärung liefern. So konnte bereits gezeigt werden, dass *cysl-2(ok3516)* LOF-Mutanten einen schmaleren Körper besitzen und weniger Nachkommen generieren.¹⁰⁹ Es lässt sich deshalb spekulieren, dass die dadurch eingesparten Ressourcen in *C. elegans* möglicherweise zur Anpassung an veränderte Umweltbedingungen beitragen.

Zfp-3(gk3165) LOF-Mutanten weisen einen Funktionsverlust des RBPs Zinkfingerprotein 3 (ZFP-3) auf, einem Transkriptionsfaktor aus der Gruppe der C₂H₂-Zinkfingerproteine.²¹⁶ Eine Annotation mit dem menschlichen Genom findet sich in der Literatur bisher nicht, da das ZFP-3 bisher ausschließlich im pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* charakterisiert wurde. Dort ist es maßgeblich für die Widerstandsfähigkeit gegenüber hohen Natriumchlorid-Konzentrationen oder osmotischem Stress verantwortlich.²¹⁷ Im Menschen codieren mindestens 652 Gene für Mitglieder der C₂H₂-Zinkfingerproteine.²¹⁸ Diese besitzen als gemeinsames Merkmal eine Zinkfingerdomäne, bei der ein Zinkion koordinativ an das Protein gebunden ist. Die so entstehende Schleife ermöglicht die Bindung an DNA, RNA oder ähnlichen Strukturen.²¹⁹ Als Transkriptionsfaktoren sind Zinkfingerproteine an vielen zellulären Prozessen wie Transkription, Signaltransduktion und proteosomaler Degradation beteiligt.²²⁰

Darüber hinaus sind sie maßgeblich in die Karzinogenese und Metastasierung verschiedener Tumorentitäten involviert. Sie können dabei sowohl als Onkoprotein und/oder als Tumorsuppressor fungieren. So werden sie unter anderem beim Mammakarzinom, Magenkarzinom und Melanom vermehrt, dagegen beim Prostata-, Lungen-, und Kolonkarzinom vermindert exprimiert. Weitere Vertreter der Zinkfingerproteine sind mit der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen, Diabetes mellitus, angeborenen Herzfehlern sowie Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis assoziiert.²²⁰

In *C. elegans* zeigten *zfp-3(gk3165)* LOF-Mutanten eine im Vergleich zu WT-Würmern deutlich erhöhte Thermotoleranz. Dies erscheint kontraintuitiv, ist der Transkriptionsfaktor in anderen Organismen doch zentral an der Vermittlung zellulärer Stressresistenz involviert. Im RBPom von *vhl-1(ok161)* LOF-Mutanten zeigte das ZFP-3 indes ein gesteigertes RNA-Bindevverhalten. Eine hohe Aktivität des HIF-1, wie beispielsweise beim Hitzestress, führt also zur Induktion des C₂H₂-Zinkfingerproteins inklusive dessen nachgeschalteter Signalkaskade. Es lässt sich nur spekulieren, dass die Störung dieser Signalwege möglicherweise Ressourcen einspart, die stattdessen der Hitzestressantwort in *C. elegans* zugutekommen.

Zusammenfassend können die thermoprotektiven Effekte der meisten Kandidaten potenziell auf eine Änderung der HIF-Aktivität oder -Signalkaskade zurückgeführt werden. Die Ergebnisse können somit als erster Hinweis auf eine mögliche Rolle dieser RBPs in der Nephroprotektion gewertet werden. Zur weiteren Evaluation sollte ihr zytoprotektives Potential als Nächstes in komplexeren Modellorganismen erforscht werden.

5.1.3. RNA-Interferenz als Validierungsmethode

Wie bereits diskutiert existieren beim Hitzeschock methodische Fehlerquellen, die zur Verzerrung der Versuchsergebnisse führen können. Zur Validierung wurden deshalb untersucht, ob diese sich mittels Vektor-basierter RNAi reproduzieren lassen. Statt dem regulär verwendeten Futterbakterium OP50 wurden dazu WT-Würmer mit HT115 Bakterien gefüttert, die spezifisch die Expressionsrate einzelner Gene im Wurm herunterregulieren.²²¹ Exemplarisch wurden mit *aass-1* und *cysl-2* zwei Kandidatengene ausgewählt, deren Funktionsverlust die Thermotoleranz von *C. elegans* reduziert bzw. erhöht.

Als Drittes wurde das Gen *col-179* ausgesucht, welches für das RBP Kollagen 179 (COL-179) codiert, einem Ortholog des humanen Kollagen Typ VI, α 5.²²² Kollagene gehören zu den häufigsten Proteinen im Menschen und machen bis zu einem Drittel der Gesamtproteinmenge aus.²²³ Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene RBPs mit der mRNA von Kollagenen interagieren, um sie posttranskriptional zu modifizieren.²²⁴⁻²²⁶ Das einige Kollagene selbst als RBPs aktiv sein könnten ist dagegen bisher noch nicht gezeigt worden. Kollagen Typ VI, α 5 wird vorwiegend in dermoepidermalen Junctionszone, Lunge und Gastro-

intestinaltrakt exprimiert und ist dort an der Vernetzung verschiedener Gewebetypen der extrazellulären Matrix beteiligt.²²⁷ Die genaue Funktion ist allerdings noch unbekannt, da sich bisherige Studien vor allem auf die Isoformen α 1-3 beziehen.^{227,228} Diese werden vorwiegend in Skelettmuskeln, Sehnen, Knochen, Knorpel, Fettgewebe, zentralem und peripherem Nervensystem sowie Haut gebildet und sind neben der Zelladhäsion auch als zytoprotektive Proteine an der Regulation von Apoptose, Zelldifferenzierung, Autophagie und oxidativer Stressresistenz beteiligt.²²⁹ Derzeit wird noch kontrovers diskutiert, inwieweit ein Funktionsverlust von Kollagen Typ VI, α 5 mit dem Auftreten chronisch-entzündlicher Hauterkrankungen wie der atopischen Dermatitis zusammenhängt. Dagegen spricht, dass die für die Erkrankung typischen Läsionen normalerweise in der Epidermis lokalisiert sind und nicht in der darunter liegenden dermoepidermalen Junktionszone.²²⁷ Einzelnukleotid-Polymorphismen von Kollagen Typ VI, α 5 sind dagegen nachweislich mit dem frühen Auftreten von Myokardinfarkt, arterieller Hypertonie und chronischer Nierenerkrankung assoziiert.²³⁰

In *C. elegans* wiesen *col-179(ok3010)* LOF-Mutanten eine im Vergleich zu WT-Würmern unveränderte Thermotoleranz auf. Dagegen konnte bereits gezeigt werden, dass ein Knockdown von *col-179* die Sterblichkeit von WT-Würmern nach Infektion mit dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* erhöht.²³¹ Es lässt sich deshalb spekulieren, dass das Kollagen möglicherweise spezifisch an der Abwehr pathogener Erreger im Wurm beteiligt sein könnte. Dazu passend trägt COL-179 laut neuester Studien nicht maßgeblich zur Permeabilität der äußeren Schutzhülle bei.²³² Somit beeinflusst dessen Funktionsverlust wahrscheinlich auch nicht deren Schutzwirkung gegenüber Hitzestress. Im RBPom von *vhl-1(ok161)* LOF-Mutanten zeigte COL-179 derweil kein verändertes RNA-Bindevverhalten. Zusammengefasst scheint das RBP eher nicht an der Vermittlung HIF-abhängiger Stressresistenz beteiligt zu sein.

Die Fütterung von WT-Würmern mit den drei ausgewählten RNAi-Bakterien veränderte deren Thermotoleranz entsprechend den Befunden in LOF-Mutanten. So zeigten sie sich nach Verzehr von HT115 *aass-1* RNAi-Bakterien sensibler, von HT115 *cysl-2* RNAi-Bakterien resistenter und von HT115 *col-179* RNAi-Bakterien unverändert anfällig gegenüber Hitzestress. Somit konnten die Versuchsergebnisse aus LOF-Mutanten erfolgreich mittels RNAi bestätigt werden. Allerdings fiel auf, dass die relativen Überlebensraten der RNAi-Versuchsgruppen deutlich höher lagen als in den entsprechenden LOF-Mutanten. Dies könnte möglicherweise mit den methodischen Unterschieden beider Versuche zusammenhängen. So konnte bereits gezeigt werden, dass sich der Phänotyp von Modellorganismen nach Gen-Knockout und Gen-Knockdown unterscheiden können. Zum einen werden dafür Off-target Effekte der RNAi-Plasmide verantwortlich gemacht. Zum anderen ist bekannt, dass es nach einem Gen-Knockdown zur kompensatorischen Steigerung der Genexpression homologer Sequenzen kommen kann.^{233,234} Weiterhin unterscheiden sich beide Methoden in der

Verwendung von Futterbakterien. So wurden die LOF-Mutanten mit OP50 gefüttert, das seit dessen Etablierung durch Sydney Brenner in den meisten Studien verwendet wird.¹⁴¹ Der *E. coli* Stamm ist allerdings aus verschiedenen Gründen nicht für die Verwendung bei RNAi geeignet. So exprimiert er regelhaft die Ribonuclease III, die dsRNA im Rahmen der posttranskriptionalen Modifizierung und antiviralen Abwehr zerschneidet. Darüber hinaus fehlt ihm eine Expressionskassette zur Produktion von dsRNA aus Plasmiden. Deshalb wird standardmäßig mit HT115 ein alternatives *E. coli* Bakterium für RNAi-Experimente verwendet. Dieses kann durch eine *rnc* LOF-Mutation keine Ribonuclease III bilden und besitzt eine durch IPTG induzierbare T7 Expressionskassette.²²¹ OP50 und HT115 differieren maßgeblich in ihrem Nährstoffgehalt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich dadurch Unterschiede im Metabolismus von *C. elegans* ergeben.²³⁵ Beispielsweise weisen Würmer bei alleinigem Verzehr von OP50 Bakterien einen ausgeprägten Vitamin B12 Mangel auf. Dieser führt zur vermehrten Akkumulation mitotoxischer Metabolite und reduziert nachfolgend die Stressresistenz von *C. elegans*.²³⁶ Dazu passend zeigten WT-Würmer nach Verzehr von HT115 *EV* Bakterien eine höhere Thermotoleranz als nach der Fütterung mit OP50 Bakterien. Die Validität beim Vergleich von Ergebnissen, die aus Versuchen mit unterschiedlichen Futterbakterien stammen, ist deshalb umstritten.

5.1.4. OP50(xu363) als RNA-Interferenz Bakterien

Während sich Off-target Effekte und Kompensationsmechanismen beim Gen-Knockdown nicht einfach unterbinden lassen, wurden mittlerweile OP50 Bakterien generiert, die für die Durchführung von RNAi-Versuchen geeignet sind. Sie werden OP50(xu363) genannt. Ähnlich wie HT115 Bakterien weisen sie eine *rnc* LOF-Mutation auf und besitzen eine IPTG induzierbare T7 Expressionskaskade.¹⁵³ Ihr Einsatz ermöglicht somit den Ausschluss diätbedingter Unterschiede in der Thermotoleranz von LOF-Mutanten und WT-Würmern nach RNAi-basiertem Gen-Knockdown. Zur Etablierung von OP50(xu363) als neues RNAi Bakterium wurde der Grundsatzversuch der Ursprungspublikation nachgestellt. Dabei wurde untersucht, inwieweit OP50(xu363) GFP RNAi-Bakterien im Vergleich zu HT115 GFP RNAi-Bakterien das Fluoreszenzsignal von *sur-5::GFP*-Würmern unterdrücken können. Dies traf für beide *E. coli* Stämme zu, sodass die Funktionalität von OP50(xu363) prinzipiell bestätigt werden konnte. Allerdings schien der Effekt rein optisch unter der Diät mit HT115 GFP RNAi-Bakterien ausgeprägter zu sein. Ein Vergleich der GFP-Proteinmengenreduktion, beispielsweise mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) oder Immunoblot, wurde allerdings nicht durchgeführt. Laut Ursprungspublikation unterscheidet sich die dsRNA-Produktionsrate von OP50(xu363) und HT115 Bakterien nicht signifikant voneinander.¹⁵³ Es ist aber nicht auszuschließen, dass Fehler bei der Aufreinigung oder Transformation der *L4440* RNAi-Plasmide deren finale Kopienzahl in OP50(xu363) RNAi-Bakterien beeinträchtigt haben

könnten. Dies würde sich folglich negativ auf deren dsRNA-Produktionskapazität auswirken. Vor ihrer Erstbenutzung könnte es deshalb in Zukunft sinnvoll sein, die Plasmidkopienzahl von OP50(xu363) und HT115 RNAi-Bakterien, beispielsweise mittels Durchflusszytometrie oder qPCR, miteinander zu vergleichen.^{237,238}

Die Bedeutung der bereits erwähnten Off-target Effekte und Kompensationsmechanismen beim Gen-Knockdown zeigt sich daran, dass WT-Würmern nach Verzehr von OP50(xu363) EV Bakterien immer noch resistenter gegenüber Hitzestress sind als nach Fütterung mit OP50 Bakterien. Nichtsdestotrotz trägt eine Angleichung des Nährstoffangebots höchstwahrscheinlich dazu bei, Ergebnisse aus Versuchen mit unterschiedlichen Futterbakterien vergleichbarer zu machen. Deshalb wurde die Validierung der Thermotoleranz von RBP LOF-Mutanten mit den neu generierten OP50(xu363) RNAi-Bakterien fortgeführt. Als Kandidaten wurden mit *aass-1*, *argk-1* und *gst-4* wiederum Gene ausgewählt, deren Funktionsverlust die Thermotoleranz von *C. elegans* reduzierte oder erhöhte.

Als vierter Kandidat wurde das Gen *nex-1* ausgesucht, welches für das RBP NEX-1 codiert, einem Ortholog des humanen Annexin A13.²²² Dieses wird spezifisch im Epithel des Dünndarms und der Niere exprimiert und vermittelt die calciumabhängige Verschmelzung von Vesikeln mit der Plasmamembran.²³⁹ Während für andere Vertreter der großen Annexin-Familie bereits bekannt ist, dass sie in die Regulation von Thermotoleranz und oxidativer Stressresistenz involviert sind, ist dies für Annexin A13 noch nicht der Fall.^{240,241} Das Transportprotein wird bisher vor allem mit der Karzinogenese und Metastasierung des Kolonkarzinoms und kleinzelligem Lungenkarzinoms assoziiert, indem es besonders hoch exprimiert wird.^{242,243} Daraus ergeben sich allerdings auch neue Therapieoptionen. So konnte bereits gezeigt werden, dass ein Funktionsverlust von Annexin A13 in den genannten Tumorentitäten zu einer Abnahme der Zellproliferationsrate, Ausbreitungsgeschwindigkeit und Metastasierungswahrscheinlichkeit führt.^{239,242,243}

In *C. elegans* zeigten *nex-1(gk148)* LOF-Mutanten eine im Vergleich zu WT-Würmern unveränderte Thermotoleranz. Die Ursachenfindung wird dadurch erschwert, dass bisher kaum etwas über die Signaltransduktion von NEX-1 bekannt ist. Das Transportprotein wird in verschiedenen Geweben des Fadenwurms exprimiert und besitzt dort unterschiedliche Funktionen. So ist es beispielsweise im Nervensystem an der Regeneration von Nerven beteiligt, während es in den Zellen von Kopf und Pharynx den apoptosebedingten Zellverdau reguliert.^{244,245} Gerade Störung des Letzteren sind in *C. elegans* mit der Aktivierung von Regulatorproteinen verschiedener Stresssignalwege, darunter Hitzeschockfaktor 1 (HSF-1), SKN-1 und HIF-1, vergesellschaftet. Allerdings ist bekannt, dass nicht alle Proteine, die am Verdau apoptotischer Zellen beteiligt sind, eine Stressantwort auslösen können.²⁴⁶ Dazu passend zeigte NEX-1 im RBPom von *vhl-1(ok161)* LOF-Mutanten kein verändertes RNA-

Bindeverhalten. Somit scheint das RBP zumindest nicht an der Vermittlung HIF-induzierter Stressresistenz beteiligt zu sein.

Die Fütterung von WT-Würmern mit den vier ausgewählten RNAi-Bakterien veränderte deren Thermotoleranz divergierend zu den Befunden in LOF-Mutanten. So zeigten sie sich nach Verzehr von OP50(xu363) *gst-4* RNAi-Bakterien anfälliger und von OP50(xu363) *argk-1* RNAi-Bakterien unverändert anfällig gegenüber Hitzestress. Auch wiesen sie nach Verzehr von OP50(xu363) *daf-2* RNAi-Bakterien, der Positivkontrolle, keine erhöhte Thermotoleranz auf. Die Ergebnisse müssen somit als nicht valide betrachtet werden. Wie bereits diskutiert wurde die Transformationseffizienz der neu generierten OP50(xu363) RNAi-Bakterien vor deren Erstbenutzung nicht ausreichend validiert. Somit kann auch noch keine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit die Verwendung von OP50(xu363) RNAi-Bakterien Vorteile gegenüber HT115 RNAi-Bakterien hat.

5.1.5. Methodische Fehlerquellen bei der Lebensspannenbestimmung

Bei 20 °C Umgebungstemperatur beträgt die Lebensspanne von WT-Würmern je nach Labor zwischen 12 und 18 Tage. Die Varianz ist dabei auf die Verwendung von WT Stämmen zurückzuführen, die im Zeitverlauf unterschiedliche Spontanmutationen ausgebildet haben.¹⁵⁴ Bisher konnten bereits mehr als 900 Gene identifiziert werden, die die Lebensspanne des Fadenwurms beeinflussen. Besonders häufig trifft dies für Erbinformationen zu, die an der Vermittlung von Stressresistenz beteiligt sind. Die Korrelation lässt sich häufig auf die Aktivierung gemeinsamer Signalwege zurückführen.¹⁴⁸⁻¹⁵¹ Dementsprechend wird im Rahmen eines genetischen Screenings häufig auch der Einfluss eines Gen-Knockouts oder -Knockdowns auf die Lebensspanne des Fadenwurms untersucht. Prinzipiell existieren dabei zwei unterschiedliche Versuchsansätze.

Die traditionelle Longitudinalmethode (TLM) stellt die materialschonendere, kostengünstigere und unkompliziertere Variante dar und wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Sie basiert auf der Untersuchung einer festen Wurmpopulation über mehrere Messzeitpunkte hinweg. Die Vitalität der einzelnen Würmer wird dabei an deren Reaktion auf die Berührung des nervenreichen Kopfes bestimmt. Die TLM birgt allerdings mehrere methodische Fehlerquellen. So stellt jede Berührung der Würmer ein potenzielles Verletzungsrisiko dar und kann besonders fragile Tiere sogar vorzeitig umbringen. Des Weiteren werden die verwendeten Agarplatten häufig der Umgebungsluft ausgesetzt, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit eines Pilzbefalls erhöht. Würmer von kontaminierten Platten müssen entweder aus der Wertung genommen oder auf Ersatzplatten transferiert werden. Letzteres stellt wiederum einen potenziellen Stressreiz dar, der sich auf die Lebensspanne des Tieres auswirken kann.^{247,248}

Bei der alternativen Replikat-Methode (RSM) wird die Wurmpopulation in mehrere Subpopulationen aufgespalten. Danach wird an jedem vorher definiertem Messzeitpunkt die Vitalität von nur einer Subpopulation bestimmt, die anschließend verworfen wird. Dadurch wird sowohl die Notwendigkeit mehrfacher Berührungen als auch das Kontaminationsrisiko der Agarplatten minimiert. Das Verletzungsrisiko der Würmer kann sogar noch weiter gesenkt werden, indem die Agarplatten am Messzeitpunkt mit M9-Puffer versetzt werden. Dadurch werden die Tiere vom klebrigen Bakterienteppich gespült und schonend zur Bewegung angeregt. Die RSM ist allerdings mit einem deutlich höheren Material- und Zeitaufwand verbunden. Darüber hinaus muss die Anzahl an Subpopulationen mindestens der Anzahl der Messzeitpunkte entsprechen. Diese liegen deshalb aus Kapazitätsgründen gegebenenfalls weiter auseinander und verringert dadurch die Genauigkeit der Messung.^{248,249}

Bei beiden Versuchsansätzen stellt die hohe Reproduktionsrate des Fadenwurms eine zusätzliche Herausforderung dar. Zum einen verbrauchen die zahlreichen Nachkommen die vorhandenen Nahrungsquellen, zum anderen sind sie durch die kurze Generationszeit nach nur zweieinhalb Tagen nicht mehr von den Muttertieren zu unterscheiden. Prinzipiell existieren mehrere Lösungsansätze.²⁴⁸ Die erste Möglichkeit besteht darin, die Muttertiere regelmäßig bis zum Ende der Eiablage auf neue Agarplatten umzusetzen. Wie bereits erwähnt erhöht dies aber das Verletzungsrisiko und kann als potenzieller Stressreiz die Lebensspanne des Tieres beeinflussen. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von sterilen Wurmstämmen, deren Mutation bekanntermaßen keinen Einfluss auf den Alterungsprozess besitzt. Dazu gehören beispielsweise die LOF-Mutanten *fer-15(b26)* und *fem-1(hc17)*.^{250,251} Ihr Einsatz erfordert allerdings jeweils die Kreuzung mit LOF-Mutanten des zu untersuchenden Gens und ist dadurch sowohl sehr zeit- und materialaufwendig. Der letzte Lösungsansatz basiert auf dem Einsatz von FUDR, einem antineoplastischen Wirkstoff, der die DNA-Synthese unterbindet. Wird dieser in der richtigen Konzentration dem Agar hinzugefügt, bilden Würmer ab dem L4-Entwicklungsstadium keine Eier mehr aus, während ihre somatischen Zellen, da postmitotisch, keinen Schaden davontragen.²⁵² Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass FUDR den Alterungsprozess von *C. elegans* nicht beeinflusst, weshalb es bei der Lebensspannenbestimmung regelhaft eingesetzt wurde. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde der antineoplastische Wirkstoff zur Unterdrückung der Reproduktion im Fadenwurm verwendet. Neuere Studien konnten nun aber zeigen, dass FUDR sowohl die Lebensdauer als auch das Risiko altersassoziierter Pathologien in *C. elegans* verändern kann. Darüber hinaus besitzen einige LOF-Mutanten eine höhere Sensibilität gegenüber FUDR. Als Folge kommt es vermehrt zur Ruptur ihrer äußeren Schutzhülle und nachfolgend zum vorzeitigen Tod des Tieres.²⁵³ Zusammenfassend kann FUDR die Messung der Lebensspanne im Wurm verzerren, sodass in Zukunft besser auf dessen Einsatz verzichtet werden sollte.

Eine weitere methodische Fehlerquelle stellt, wie beim Hitzeschock, die Auswertung der Lebensspanne dar. So ist die Bewertung, ob ein Wurm tot oder im Alter einfach sehr träge ist, nicht immer eindeutig. Um diese Problematik zu umgehen, wurde bereits eine Apparatur entwickelt, die die Bewegung der Würmer über einen definierten Zeitraum kontinuierlich detektieren kann.¹⁷⁰ Wie bereits erwähnt konnte eine solche „*Caenorhabditis elegans* Lifespan Machine“ mittlerweile erfolgreich im Nephrolab Cologne etabliert werden. Dabei muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass ihr Einsatz auf die Verwendung von FUDR-Platten angewiesen ist.

5.1.6. Bedeutung von HIF-regulierten RNA-bindenden Proteinen in der Vermittlung von Langlebigkeit von *Caenorhabditis elegans*

Wie bereits beschrieben basiert die häufige Korrelation von Lebensspanne und Stressresistenz in *C. elegans* auf der Induktion gemeinsamer Signalwege. Diese werden vor allem durch Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise SKN-1, DAF-16 und HIF-1 reguliert. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Aktivierung des HIF-1 nicht nur die oxidative Stressresistenz und Thermotoleranz, sondern auch die Lebensspanne in *C. elegans* erhöht. Andererseits fördert auch ein Funktionsverlust des HIF-1 die Langlebigkeit im Wurm. Beide Effekte werden auf die Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden zurückgeführt.^{254,255} Der Einfluss HIF-regulierter RBPs auf die Lebensspanne von *C. elegans* ist noch weitestgehend unbekannt und wurde deshalb anhand vier verschiedener Kandidaten untersucht. Zum einen wurden die LOF-Mutanten *aass-1(ok926)*, *cysl-2(ok3516)* und *gst-4(ok2358)* ausgewählt, die sich besonders anfällig oder resistent gegenüber Hitzestress zeigten. Zum anderen wurde die LOF-Mutante *col-179(ok3010)* ausgesucht, da Kollagene häufig an der Vermittlung von Langlebigkeit in *C. elegans* involviert sind.²⁵⁶ Bis auf *col-179(ok3010)* zeigte sich bei keinem der Kandidaten eine Korrelation zwischen Thermotoleranz und Lebensspanne. Im Folgenden werden die dafür möglichen Ursachen für jeden Kandidaten separat diskutiert.

Aass-1(ok926) LOF-Mutanten zeigten eine im Vergleich zu WT-Würmern unveränderte Lebensspanne. Dies unterstützt die Hypothese, wonach ihre reduzierte Thermotoleranz nicht mit ihrer mitochondrialen Dysfunktion zusammenhängt. So beeinflusst eine ausgeprägte Schädigung der Mitochondrien bekanntermaßen die Lebensspanne von *C. elegans*. Der Effekt ist dabei vom Schädigungsgrad abhängig: leichtere Mängel sind mit einer verlängerten Lebensspanne, schwerere Mängel dagegen mit einer verkürzten Lebensspanne assoziiert.^{257,258} Allerdings lässt sich nicht ausschließen, dass der Einsatz von FUDR die Auswirkungen der mitochondrialen Dysfunktion in *aass-1(ok926)* LOF-Mutanten abgemildert hat. So senkt FUDR durch Unterdrückung der DNA-Synthese bekanntermaßen den ATP-Verbrauch im Wurm.^{253,259,260}

Gst-4(ok2358) LOF-Mutanten wiesen ebenfalls eine im Vergleich zu WT-Würmern unveränderte Lebensspanne auf. Dies kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass antioxidative Enzyme wie GST-4 bei fehlender Akkumulation toxischer ROS kaum in *C. elegans* exprimiert werden. So wird der Transkriptionsfaktor SKN-1, der zentral in die Regulation der oxidativen Stressantwort involviert ist, unter physiologischen Bedingungen regelhaft ubiquitiniert und anschließend proteosomal abgebaut.²⁶¹ Erst beim Auftreten von oxidativem Stress wird SKN-1 durch eine p38-mitogenaktivierte Proteinkinase phosphoryliert. Der aktivierte Transkriptionsfaktor wandert daraufhin in den Zellkern und induziert dort die Expression zytoprotektiver Gene.²⁶² Unabhängig von SKN-1 wird die Abundanz von GST-4 auch durch die Aktivität des Transkriptionsfaktors EOR-1 bestimmt, der zentral in die Regulation der EGFR-Signalkaskade involviert ist.²⁶³ Diese ist maßgeblich am Wachstumsprozess und an der Ausbildung weiblicher Geschlechtsmerkmale im Wurm beteiligt und reguliert gleichzeitig dessen Lebensspanne durch die Transkription verschiedener Proteine. Eine Störung der EGFR-Signalkaskade führt allerdings bekanntermaßen zur Abnahme der Lebensspanne in *C. elegans* und ist somit unter physiologischen Bedingungen in *gst-4(ok2358)* LOF-Mutanten unwahrscheinlich.²⁶⁴

Col-179(ok3010) LOF-Mutanten zeigten eine im Vergleich zu WT-Würmern unveränderte Lebensspanne. Dieses Ergebnis konnte mittlerweile auch mittels RNAi bestätigt werden.²³¹ Der fehlende Effekt auf die Lebensspanne kann am ehesten darauf zurückgeführt werden, dass die Abundanz von COL-179 unter physiologischen Bedingungen durch einen G-Protein-gekoppelte Rezeptor namens NPR-8 unterdrückt wird, der in Nerven im Kopfbereich exprimiert wird. Erst bei Kontakt mit einem pathogenen Erreger wird die Expression verschiedener Kollagene, darunter COL-179, hochreguliert.²⁶⁵ Auf diese Weise kann die Zusammensetzung der äußeren Schutzhülle dynamisch an wechselnde Umweltbedingungen angepasst werden.

Cysl-2(ok3516) LOF-Mutanten wiesen eine im Vergleich zu WT-Würmern verminderte Lebensspanne auf. Damit konnten die Ergebnisse einer vorangegangenen Studie erfolgreich reproduziert werden. Deren Autoren führten die verfrühte Sterblichkeit von *cysl-2(ok3516)* LOF-Mutanten auf eine Abnahme der endogenen H₂S-Produktion zurück, die sich negativ auf die HIF-1 Aktivität im Wurm auswirken würde.¹⁰⁹ Gegen diese Hypothese könnte sprechen, dass die endogene H₂S-Produktion durch einen Funktionsausfall von CYSL-2 nur sehr moderat beeinflusst wird. Außerdem würde eine verminderte HIF-1 Aktivität nicht nur die Lebensspanne, sondern auch die Thermotoleranz von *cysl-2(ok3516)* LOF-Mutanten einschränken. Diese zeigte sich dagegen signifikant erhöht. Eine alternative Hypothese könnte lauten, dass der Alterungsprozess von *cysl-2(ok3516)* LOF-Mutanten durch eine Akkumulation toxischer ROS beschleunigt wird. So konnte bereits gezeigt werden, dass Würmer mit

eingeschränkter Reproduktionsfähigkeit, zu denen *cysl-2(ok3516)* LOF-Mutanten gehören, vermehrt ROS bilden.^{109,266} Über die genauen Ursachen wird dabei noch diskutiert. Möglicherweise werden Reproduktionsstörungen als Schaden fehlinterpretiert, woraufhin im Rahmen von Reparaturmechanismen der mitochondriale Stoffwechsel angeregt wird.²⁶⁶ ROS werden weithin mit der Schädigung von DNA, RNA, Proteinen und Lipiden assoziiert und gelten dadurch als einer der zentralen Ursachen des Alterungsprozesses.²⁶⁷ Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass es bei einer ROS-Akkumulation zur Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren wie HIF-1, SKN-1 und DAF-16 kommen kann, die jeweils an der Regulation lebensverlängernder Signalwege beteiligt sind.²⁶⁸ Alternativ könnte die verringerte Lebensspanne von *cysl-2(ok3516)* LOF-Mutanten möglicherweise auch auf deren hohe Sensibilität gegenüber FUDR zurückgeführt werden. So verstarben allein 40,3 % der Versuchspopulation frühzeitig am Aufplatzen ihrer äußeren Schutzhülle.

Zusammengefasst wird die Interpretation der gezeigten Ergebnisse durch den Einsatz von FUDR erschwert. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass der antineoplastische Wirkstoff die Lebensspanne und das Auftreten altersassoziiertes Pathologien in den untersuchten Kandidaten beeinflusst hat. Weiterhin ergeben sich Hinweise darauf, dass die Expression einiger HIF-regulierter RBPs hochspezifisch an das Auftreten bestimmter Stressreize gekoppelt ist. Dementsprechend sind sie wahrscheinlich auch nicht maßgeblich an Signalwegen beteiligt, die die Lebensspanne des Wurms unter Standardbedingungen bestimmen.

5.2. Einfluss der H₂S-Donatoren Mesna und Kala namak auf die Stressresistenz von *Caenorhabditis elegans*

5.2.1. Mesna und Kala namak induzieren den HIF-1 und/oder DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*

Als Marker der Nephroprotektion wurde die Thermotoleranz des Modellorganismus *C. elegans* gewählt. Beide Mechanismen werden maßgeblich durch den hochkonservierten Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert.^{25,172} Dessen Aktivität kann direkt durch die exogene Zufuhr von H₂S gesteigert werden, sodass Würmer nach Exposition mit H₂S-Donatoren regelhaft eine erhöhte Thermotoleranz aufweisen.¹⁰⁶ Konform dazu konnte bereits gezeigt werden, dass die Exposition mit Mesna und Kala namak sich ebenfalls positiv auf die Hitzestressresistenz in *C. elegans* auswirkt.¹⁵⁹ Das Ergebnis konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich reproduziert werden. Der thermoprotektive Effekt beider Substanzen muss allerdings nicht zwingend auf der Freisetzung von H₂S beruhen. So besitzen sowohl Mesna als auch Kala namak bekanntermaßen potente antioxidative Eigenschaften.^{122,130} Diese könnten ebenfalls für ihren thermoprotektiven Effekt verantwortlich sein, da während einem Hitzeschock vermehrt oxidative Schäden als Folge einer Akkumulation von ROS anfallen.^{214,269} Um beide Möglichkeiten zu evaluieren, wurde die Wirkung von Mesna und Kala namak auf Wurmmutanten untersucht, die einen Funktionsverlust der Transkriptionsfaktoren HIF-1 und/oder DAF-16 aufweisen.

DAF-16 ist das einzige, hochkonservierte Ortholog der humanen Forkhead-Box-Proteine in *C. elegans*.²⁷⁰ Mutationen dieser Familie sind im Menschen unter anderem mit der Entstehung verschiedener Tumorentitäten, Glaukomformen und Sprachstörungen assoziiert.²⁷¹ DAF-16 wird sowohl bei thermischem als auch bei oxidativem Stress durch verschiedene Kinasen phosphoryliert und wandert daraufhin in den Zellkern. Dort bindet er an spezifische Bindungsstellen und induziert die Expression protektiver Gene.^{105,272} Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Funktionsverlust von DAF-16 die Thermotoleranz in *C. elegans* reduziert, eine Überexpression diese dagegen erhöht.^{161,273} Im Gegensatz zum HIF-1 wird die Aktivität von DAF-16 aber nicht durch H₂S reguliert.¹⁰⁵ Der Transkriptionsfaktor stellt damit ein H₂S-unabhängiges Regulatorprotein der Hitzestressantwort dar.

Der thermoprotektive Effekt von Mesna und Kala namak könnte auch von der Aktivität beider Transkriptionsfaktoren abhängig sein. Deshalb wurde ihre Wirkung nicht nur auf die LOF-Mutanten *hif-1(ia4)* und *daf-16(mu86)*, sondern auch auf eine neu generierte *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutante untersucht. Allerdings konnten nur Teile der Versuche ausgewertet werden. So kam es beim Hitzeschock der *hif-1(ia4)* und *daf-16(mu86)* LOF-Mutanten auf Kala namak-Platten mehrfach zum Wassereinbruch. Dies kann höchstwahrscheinlich auf Fehler beim Abdichten der Agarplatten mit Parafilm® zurückgeführt

werden. Darüber hinaus zeigte die WT-Positivkontrollgruppe der mit Mesna exponierten *hif-1(ia4)* und *daf-16(mu86)* LOF-Mutanten keine erhöhte Thermotoleranz. Dies widerspricht sowohl den Ergebnissen anderer Forscher als auch den eigenen Vorergebnissen.¹⁵⁹ Weiterhin wiesen sowohl *hif-1(ia4)* LOF-Mutanten als auch *daf-16(mu86)* LOF-Mutanten im Vergleich zu WT-Würmern keine veränderte Thermotoleranz auf. Es konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass *hif-1(ia4)* LOF-Mutanten resistenter und *daf-16(mu86)* LOF-Mutanten sensibler gegenüber Hitzestress sind.^{161,171,254} Zusammengefasst sind die Ergebnisse zu den Wirkungen von Mesna und Kala namak auf *hif-1(ia4)* und *daf-16(mu86)* LOF-Mutanten als nicht valide zu werten. Dagegen konnte gezeigt werden, dass die thermoprotektive Wirkung beider Substanzen beim kombinierten Funktionsverlust des HIF-1 und DAF-16 verloren geht. Daraus lässt sich schließen, dass mindestens einer der beiden Hitzestresssignalwege durch Mesna und Kala namak aktiviert wird. Es lässt sich allerdings keine Aussage darüber treffen, ob beide Substanzen die gleichen Signalwege induzieren. Auch ob ihre thermoprotektive Wirkung auf der Freisetzung von H₂S beruht, bleibt unbeantwortet. Um beide Fragestellungen zu beantworten ist zunächst eine Wiederholung der Hitzeschock-Versuche mit *hif-1(ia4)* und *daf-16(mu86)* LOF-Mutanten erforderlich.

5.2.2. Methodische Fehlerquellen konventioneller H₂S-Teststreifen

H₂S-Donatoren können anhand ihrer strukturellen Eigenschaften in verschiedene Substanzklassen eingeteilt werden. So gehören Natriumthiosulfat, NaHS und Kala namak zu den natürlich vorkommenden anorganischen Sulfid-Verbindungen. Diese sind dadurch charakterisiert, dass sie kontinuierlich und ohne äußeren Trigger in kurzer Zeit hohe Konzentrationen an H₂S freisetzen. Mesna kann dagegen den synthetischen H₂S-Donatoren zugeordnet werden. Diese setzen im direkten Vergleich geringere H₂S-Konzentrationen über einen längeren Zeitraum hinweg frei. Hintergrund ist, dass der Gasotrasmmitter erst im Rahmen verschiedener intrazellulärer Prozesse (beispielsweise Hydrolyse, enzymatischer Reaktion, pH Veränderung, Photolyse und Thiol-Substrat Reaktion) gebildet werden muss.^{274,275} Aufgrund dieser mechanistischen Unterschiede lässt sich spekulieren, dass die einzelnen Versuchsgruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt unterschiedlich hohen Konzentrationen an exogenem H₂S ausgesetzt waren. Um diese Hypothese zu evaluieren, wurde die intrazelluläre H₂S-Konzentration von mit Kala namak, Natriumthiosulfat, NaHS oder Mesna exponierten WT-Würmern miteinander verglichen. Für deren *in vivo* Bestimmung wurden bereits verschiedene Methoden entwickelt. Diese basieren unter anderem auf fluoreszenzspektroskopischen, absorptionsphotometrischen, chromatographischen und polarografischen Verfahren.²⁷⁶ Sie erfordern Laborgeräte, die allesamt nicht im Nephrolab vorhanden waren. Darüber hinaus wurden sie bisher nicht an einen Einsatz in *C. elegans* angepasst. Deshalb wurde untersucht, inwieweit sich stattdessen auch kommerziell erhältliche

H₂S-Teststreifen zur Messung intrazellulärer H₂S-Konzentrationen in *C. elegans* eignen. Sie enthalten den kristallinen Feststoff Blei(II)-Acetat, der mit H₂S reagiert und dabei das braungraue, metallisch glänzende Blei(II)-Sulfid bildet.²⁷⁷ In der Versuchsauswertung konnten keine Verfärbungen über den getesteten Wurmlysaten detektiert werden. Mehrere methodische Fehlerquellen sind hierfür als Ursache denkbar.

So könnte die Sensitivität der H₂S-Teststreifen zu gering sein, um das aus den Proben aufsteigende H₂S zu detektieren. Diese Hypothese lässt sich nur schwer evaluieren, wurden bisher doch keine vergleichenden Daten zu den intrazellulären H₂S-Konzentrationen in *C. elegans* und verschiedenen Bakterienstämmen publiziert. Dafür könnte allerdings sprechen, dass sich die H₂S-Teststreifen auch über Reinkonzentraten von Mesna, Natriumthiosulfat und NaHS nicht verfärbten. Dabei lagen diese in bis zu zweitausendfach höherer Konzentration vor als in den zur Kultivierung von *C. elegans* verwendeten Agarplatten. Dass sich die H₂S-Teststreifen dagegen über einem Reinkonzentrat von Kalanamak schwärzlich verfärbten, könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Gewürzsalz möglicherweise deutlich mehr H₂S emittiert als die anderen drei Substanzen.

Eine weitere Problematik besteht darin, dass H₂S als besonders volatiles Gas nur eine Halbwertszeit von ungefähr fünf Minuten ($t_{1/2} = 0.693 / 0,13 \text{ min}^{-1}$) besitzt.²⁷⁸ Es ist deshalb gut möglich, dass ein Großteil der intrazellulären H₂S-Konzentration zum Messzeitpunkt bereits verflüchtigt war. Um diese Problematik zu umgehen, könnte man die H₂S-Teststreifen bereits unmittelbar vor der Wurmlyse über den Proben anbringen. Dies würde allerdings den Einsatz von mechanischen oder ultraschallbasierten Homogenisatoren zur Wurmlyse behindern. Alternativ könnten die Würmer auch mittels Hitze lysiert werden. Dies würde aber unter anderem die kinetischen Eigenschaften sowie die Ionisationsrate von H₂S verändern und könnte somit die Messergebnisse verzerren.^{279,280}

Überhaupt liegt H₂S unter physiologischen Bedingungen allein zu ungefähr 85,5 % als Hydrogensulfid-Anion und in sehr geringem Maße auch als Sulfid-Ion vor.²⁷⁹ Dazu kommt die hohe Reaktionsaffinität des Gasotransmitters, sodass ein weiterer Teil kovalent in saurer, basischer oder reduzierter Form gebunden ist.²⁸¹ Somit kann mit den H₂S-Teststreifen wahrscheinlich auch nur ein Bruchteil der tatsächlichen intrazellulären H₂S-Konzentration detektiert werden.

Zusammengefasst scheint der Versuchsaufbau nicht dazu geeignet, um die intrazelluläre H₂S-Konzentration in *C. elegans* zu messen.

5.2.3. Methodische Schwachstellen bei der Messung der endogenen H₂S-Produktion in *Caenorhabditis elegans*

Der Einfluss von H₂S-Donatoren auf die endogene H₂S-Produktion wurde bislang ausschließlich in höheren Modellorganismen und Zellkulturen erforscht. So konnte bereits

mehrfach gezeigt werden, dass exogen zugeführtes H₂S die Abundanz und Aktivität der H₂S-produzierenden Enzyme CBS und CSE, nicht aber von 3-MST, in Niere und Herz erhöht.¹⁶³⁻¹⁶⁶ Alle genannten Enzyme besitzen verschiedene Homologe in *C. elegans*.¹⁰⁹ Der Einfluss von Mesna und Kala namak auf ihre Aktivität wurde mithilfe einer einfachen und kostengünstigen Messmethode bestimmt. Diese basiert prinzipiell auf dem gleichen Detektionsmechanismus wie die kommerziellen H₂S-Teststreifen. Den Proben wurde allerdings vor Versuchsbeginn L-Cystein und PLP und damit die Substrate von CBS und CSE zugegeben. Mechanistisch bauen diese die Aminosäure im Beisein des Cofaktors ab und setzen dabei H₂S frei. Zur Etablierung der Messmethode im Labor wurde der Grundsatzversuch der Ursprungspublikation zunächst erfolgreich reproduziert.¹⁶⁷ Sie wurde anschließend dazu verwendet, die endogene H₂S-Produktion von WT-Würmern und *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten auf Mesna- oder Kala namak-Platten mit der von unbehandelten Tieren zu vergleichen.

Die Verfärbungen auf den H₂S-Teststreifen legen nahe, dass beide H₂S-Donatoren die endogene H₂S-Produktion in WT-Würmern und *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten reduzieren. Dies würde nicht nur der bisherigen Literatur widersprechen, sondern auch der Hypothese, wonach Mesna und Kala namak primär über die signifikante Freisetzung von H₂S Einfluss auf physiologische Prozesse in *C. elegans* nehmen. Die Ergebnisinterpretation wird allerdings durch mehrere methodische Schwachstellen erschwert.

Zum einen fehlte eine Positivkontrollgruppe (beispielsweise *eat-2(ad1116)* LOF-Mutanten), sodass keine Aussage über die Validität der Daten getroffen werden kann. Zum anderen zeigte sich an den uneinheitlichen Ergebnissen beim Vergleich der endogenen H₂S-Produktion von mit Mesna oder Kala namak exponierten WT-Würmern und *daf-16(mu86);hif-1(ia4)* LOF-Mutanten, dass die Messmethode mutmaßlich eine geringe Genauigkeit besitzt. Weiterhin weist der Einsatz von Blei(II)-Acetat-Teststreifen Limitationen auf, die bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert wurden. Zusammenfassend ist die Interpretation der gezeigten Ergebnisse nicht möglich. In Zukunft könnte der Einfluss von Mesna und Kala namak auf die endogene H₂S-Produktion stattdessen mit anderen Messmethoden bestimmt werden. So ließe sich zum einen die Abundanz von CBS und CSE beispielsweise mittels Western Blot oder qPCR bestimmen.^{282,283} Zum anderen könnte zur H₂S-Detektion auf die bereits erwähnten H₂S-Messmethoden zurückgegriffen werden.²⁷⁶

5.3. Aussicht und Limitation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bislang nur der Einfluss von vierzehn HIF-regulierten RBPs auf die Thermotoleranz von *C. elegans* untersucht. In Zukunft könnte das Screening um weitere Kandidaten erweitert werden. So konnten durch den Vergleich von Datensätzen zu Stressresistenz in Wurm und Maus allein weitere 132 HIF-regulierte RBPs identifiziert werden, die an der Regulation von Stressresistenz beteiligt sein könnten. Anschließend sollte ihre Charakterisierung in höheren Modellorganismen fortgesetzt werden. So ist der Fadenwurm zum einen nur sehr entfernt mit dem Menschen verwandt, zum anderen bildet er weder innere Organe noch ein komplexes Nervensystem aus.²⁸⁴ Somit lassen sich organspezifische Erkrankungen wie das ANV nur indirekt im Fadenwurm untersuchen. Langfristig könnte die Erforschung HIF-regulierter RBPs dazu beitragen, innovative, genbasierte Therapieverfahren für die Behandlung des ANV zu entwickeln und damit den individuellen und gesellschaftlichen Schaden dieser Erkrankung zu senken.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der thermoprotektive Effekt von Mesna und Kala namak von der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren HIF-1 und/oder DAF-16 abhängig ist. In Zukunft sollte das Screening um die LOF-Mutanten *hif-1(ja4)* und *daf-16(mu86)* ergänzt werden, um die zugrunde liegende Signalkaskade weiter zu evaluieren. Darüber hinaus könnte die Etablierung neuer Messgeräte dazu beitragen, den Einfluss beider Substanzen sowohl auf die intrazelluläre H₂S-Konzentration als auch auf die endogene H₂S-Produktion aufzudecken. Schließlich muss noch nachgewiesen werden, dass die Substitution von Kala namak, ähnlich wie Mesna, auch höhere Modellorganismen vor den Auswirkungen eines ANV schützen kann. Sollte sich dies bestätigen, besitzen beide Substanzen aufgrund ihrer guten Verträglichkeit das Potential, in klinischen Studien am Menschen evaluiert zu werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Gueutin V, Deray G, Isnard-Bagnis C. Renal physiology. *Bull Cancer* 2012; **99**(3): 237-49.
2. Schulte E. Niere und ableitende Harnwege. Duale Reihe Anatomie. 3. Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2014: 763 - 89.
3. Schermer B. Schematische Darstellung der Niere. Köln: Nephrologisches Forschungslabor der Universität zu Köln; 2020. <https://www.kidneyresearchcenter.org/21/> (Zuletzt abgerufen am 12.10.2020)
4. Carroll RG, Abdel-Rahman AA. Glomerular Filtration. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference: Elsevier; 2007.
5. Koushanpour E, Kriz W. Tubular Reabsorption and Secretion: Classification Based on Overall Clearance Measurements. *Renal Physiology* 1986.
6. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, et al. The human urine metabolome. *PLoS One* 2013; **8**(9): e73076.
7. Fahlke C, Linke WA, Raßler B, Wiesner RJ. Taschenatlas Physiologie. München: Urban & Fischer in Elsevier; 2015.
8. Kefale B, Alebachew M, Tadesse Y, Engidawork E. Quality of life and its predictors among patients with chronic kidney disease: A hospital-based cross sectional study. *PLoS One* 2019; **14**(2): e0212184.
9. Wonnacott A, Meran S, Amphlett B, Talabani B, Phillips A. Epidemiology and outcomes in community-acquired versus hospital-acquired AKI. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; **9**(6): 1007-14.
10. Herold G. Innere Medizin 2017; 2016.
11. Hoste EAJ, Kellum JA, Selby NM, et al. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 2018; **14**(10): 607-25.
12. Hoste EAJ, De Corte W. Clinical consequences of acute kidney injury. *Contrib Nephrol* 2011; **174**: 56-64.
13. Khadzhyrov D, Schmidt D, Hardt J, et al. The Incidence of Acute Kidney Injury and Associated Hospital Mortality. *Dtsch Arztebl Int* 2019; **116**(22): 397-404.
14. Bienholz A, Kribben A. KDIGO-Leitlinien zum akuten Nierenversagen. *Der Nephrologe* 2013; **8**(3): 247-51.
15. Makris K, Spanou L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *Clin Biochem Rev* 2016; **37**(2): 85-98.
16. Manzoor H, Bhatt H. Prerenal Kidney Failure. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
17. Prakash J, Sen D, Kumar NS, Kumar H, Tripathi LK, Saxena RK. Acute renal failure due to intrinsic renal diseases: review of 1122 cases. *Ren Fail* 2003; **25**(2): 225-33.

18. Meola M, Samoni S, Petrucci I, Ronco C. Clinical Scenarios in Acute Kidney Injury: Post-Renal Acute Kidney Injury. *Contrib Nephrol* 2016; **188**: 64-8.
19. Goyal A, Daneshpajouhnejad P, Muhammad F, Hashmi F, K. B. Acute Kidney Injury. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
20. Giaccia A, Siim BG, Johnson RS. HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2003; **2**(10): 803-11.
21. Aksu U, Demirci C, Ince C. The pathogenesis of acute kidney injury and the toxic triangle of oxygen, reactive oxygen species and nitric oxide. *Contrib Nephrol* 2011; **174**: 119-28.
22. Epstein FH. Oxygen and renal metabolism. *Kidney Int* 1997; **51**(2): 381-5.
23. Soltoff SP. ATP and the regulation of renal cell function. *Annu Rev Physiol* 1986; **48**: 9-31.
24. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**(13): 5680-4.
25. Shu S, Wang Y, Zheng M, et al. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Kidney Injury and Repair. *Cells* 2019; **8**(3).
26. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 1998; **7**(3): 205-13.
27. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012; **148**(3): 399-408.
28. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 versus HIF-2--is one more important than the other? *Vascul Pharmacol* 2012; **56**(5-6): 245-51.
29. Smythies JA, Sun M, Masson N, et al. Inherent DNA-binding specificities of the HIF-1 alpha and HIF-2 alpha transcription factors in chromatin. *EMBO Rep* 2019; **20**(1).
30. Weidemann A, Bernhardt WM, Klanke B, et al. HIF activation protects from acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**(3): 486-94.
31. Spath MR, Koehler FC, Hoyer-Allo KJR, Grundmann F, Burst V, Muller RU. Preconditioning strategies to prevent acute kidney injury. *F1000Res* 2020; **9**.
32. Zager RA, Baltés LA, Sharma HM, Jurkowitz MS. Responses of the ischemic acute renal failure kidney to additional ischemic events. *Kidney Int* 1984; **26**(5): 689-700.
33. Zager RA, Jurkowitz MS, Merola AJ. Responses of the normal rat kidney to sequential ischemic events. *Am J Physiol* 1985; **249**(1 Pt 2): F148-59.
34. Ates E, Genc E, Erkasap N, et al. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation* 2002; **74**(9): 1247-51.
35. Song T, Peng YF, Guo SY, Liu YH, Liul LY. Brief small intestinal ischemia lessens renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Comp Med* 2007; **57**(2): 200-5.

36. Wever KE, Warle MC, Wagener FA, et al. Remote ischaemic preconditioning by brief hind limb ischaemia protects against renal ischaemia-reperfusion injury: the role of adenosine. *Nephrol Dial Transplant* 2011; **26**(10): 3108-17.
37. Kierulf-Lassen C, Kristensen ML, Birn H, Jespersen B, Norregaard R. No Effect of Remote Ischemic Conditioning Strategies on Recovery from Renal Ischemia-Reperfusion Injury and Protective Molecular Mediators. *PLoS One* 2015; **10**(12): e0146109.
38. Samadi M, Tabibian F, Moradzadeh K, Nassiri SM, Gheisari Y. Evaluating the effect of remote ischemic preconditioning on kidney ischemia-reperfusion injury. *J Res Med Sci* 2020; **25**: 6.
39. Zarbock A, Kellum JA. Remote Ischemic Preconditioning and Protection of the Kidney-- A Novel Therapeutic Option. *Crit Care Med* 2016; **44**(3): 607-16.
40. Menting TP, Wever KE, Ozdemir-van Brunschot DM, Van der Vliet DJ, Rovers MM, Warle MC. Ischaemic preconditioning for the reduction of renal ischaemia reperfusion injury. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; **3**: CD010777.
41. Jones NM, Lee EM, Brown TG, Jarrott B, Beart PM. Hypoxic preconditioning produces differential expression of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and its regulatory enzyme HIF prolyl hydroxylase 2 in neonatal rat brain. *Neurosci Lett* 2006; **404**(1-2): 72-7.
42. Sheldon RA, Lee CL, Jiang X, Knox RN, Ferriero DM. Hypoxic preconditioning protection is eliminated in HIF-1alpha knockout mice subjected to neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 2014; **76**(1): 46-53.
43. Zhang W, Liu L, Huo Y, Yang Y, Wang Y. Hypoxia-pretreated human MSCs attenuate acute kidney injury through enhanced angiogenic and antioxidative capacities. *Biomed Res Int* 2014; **2014**: 462472.
44. Bruzzese L, Lumet G, Vairo D, Guiol C, Guieu R, Faure A. Hypoxic preconditioning in renal ischaemia-reperfusion injury: a review in pre-clinical models. *Clin Sci (Lond)* 2021; **135**(23): 2607-18.
45. Vesnina ZV, Lishmanov YB, Alexandrova EA, Nesterov EA. Evaluation of Nephroprotective Efficacy of Hypoxic Preconditioning in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Surgery. *Cardiorenal Med* 2016; **6**(4): 328-36.
46. Chin BY, Jiang G, Wegiel B, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(12): 5109-14.
47. Neto JS, Nakao A, Kimizuka K, et al. Protection of transplant-induced renal ischemia-reperfusion injury with carbon monoxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **287**(5): F979-89.

48. Hanto DW, Maki T, Yoon MH, et al. Intraoperative administration of inhaled carbon monoxide reduces delayed graft function in kidney allografts in Swine. *Am J Transplant* 2010; **10**(11): 2421-30.
49. Yoshida J, Ozaki KS, Nalesnik MA, et al. Ex vivo application of carbon monoxide in UW solution prevents transplant-induced renal ischemia/reperfusion injury in pigs. *Am J Transplant* 2010; **10**(4): 763-72.
50. Goebel U, Wollborn J. Carbon monoxide in intensive care medicine-time to start the therapeutic application?! *Intensive Care Med Exp* 2020; **8**(1): 2.
51. Semenza GL. Pharmacologic Targeting of Hypoxia-Inducible Factors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2019; **59**: 379-403.
52. Bernhardt WM, Campean V, Kany S, et al. Preconditional activation of hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**(7): 1970-8.
53. Yang Y, Yu X, Zhang Y, et al. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat (FG-4592) protects against cisplatin-induced acute kidney injury. *Clin Sci (Lond)* 2018; **132**(7): 825-38.
54. Henry DH, Glaspy J, Harrup R, et al. Roxadustat for the treatment of anemia in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome: Open-label, dose-selection, lead-in stage of a phase 3 study. *Am J Hematol* 2022; **97**(2): 174-84.
55. Sakashita M, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia-Inducible Factor-Prolyl Hydroxylase Domain Inhibitors to Treat Anemia in Chronic Kidney Disease. *Contrib Nephrol* 2019; **198**: 112-23.
56. Mathia S, Paliege A, Koesters R, et al. Action of hypoxia-inducible factor in liver and kidney from mice with Pax8-rtTA-based deletion of von Hippel-Lindau protein. *Acta Physiol (Oxf)* 2013; **207**(3): 565-76.
57. Iguchi M, Kakinuma Y, Kurabayashi A, et al. Acute inactivation of the VHL gene contributes to protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. *Nephron Exp Nephrol* 2008; **110**(3): e82-90.
58. Fahling M, Mathia S, Paliege A, et al. Tubular von Hippel-Lindau knockout protects against rhabdomyolysis-induced AKI. *J Am Soc Nephrol* 2013; **24**(11): 1806-19.
59. Ivanova IG, Park CV, Kenneth NS. Translating the Hypoxic Response-the Role of HIF Protein Translation in the Cellular Response to Low Oxygen. *Cells* 2019; **8**(2).
60. Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**(3): 195-205.
61. Hentze MW, Castello A, Schwarzl T, Preiss T. A brave new world of RNA-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; **19**(5): 327-41.
62. Lunde BM, Moore C, Varani G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**(6): 479-90.

63. Boucas J, Fritz C, Schmitt A, et al. Label-Free Protein-RNA Interactome Analysis Identifies Khsrp Signaling Downstream of the p38/Mk2 Kinase Complex as a Critical Modulator of Cell Cycle Progression. *PLoS One* 2015; **10**(5): e0125745.
64. Liepelt A, Naarmann-de Vries IS, Simons N, et al. Identification of RNA-binding Proteins in Macrophages by Interactome Capture. *Mol Cell Proteomics* 2016; **15**(8): 2699-714.
65. Sysoev VO, Fischer B, Frese CK, et al. Global changes of the RNA-bound proteome during the maternal-to-zygotic transition in Drosophila. *Nat Commun* 2016; **7**: 12128.
66. Despic V, Dejung M, Gu M, et al. Dynamic RNA-protein interactions underlie the zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Genome Res* 2017; **27**(7): 1184-94.
67. Perez-Perri JI, Rogell B, Schwarzl T, et al. Discovery of RNA-binding proteins and characterization of their dynamic responses by enhanced RNA interactome capture. *Nat Commun* 2018; **9**(1): 4408.
68. Neelamraju Y, Hashemikhabir S, Janga SC. The human RBPome: from genes and proteins to human disease. *J Proteomics* 2015; **127**(Pt A): 61-70.
69. Gerstberger S, Hafner M, Tuschl T. A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet* 2014; **15**(12): 829-45.
70. Beckmann BM, Horos R, Fischer B, et al. The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs. *Nat Commun* 2015; **6**: 10127.
71. O'Brien KP, Remm M, Sonnhammer EL. InParanoid: a comprehensive database of eukaryotic orthologs. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**(Database issue): D476-80.
72. Sonnhammer EL, Ostlund G. InParanoid 8: orthology analysis between 273 proteomes, mostly eukaryotic. *Nucleic Acids Res* 2015; **43**(Database issue): D234-9.
73. Alves LR, Goldenberg S. RNA-binding proteins related to stress response and differentiation in protozoa. *World J Biol Chem* 2016; **7**(1): 78-87.
74. Harvey R, Dezi V, Pizzinga M, Willis AE. Post-transcriptional control of gene expression following stress: the role of RNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans* 2017; **45**(4): 1007-14.
75. Kim C, Kang D, Lee EK, Lee JS. Long Noncoding RNAs and RNA-Binding Proteins in Oxidative Stress, Cellular Senescence, and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2017; **2017**: 2062384.
76. Maronedze C, Thomas L, Gehring C, Lilley KS. Changes in the Arabidopsis RNA-binding proteome reveal novel stress response mechanisms. *BMC Plant Biol* 2019; **19**(1): 139.
77. Donnelly N, Gorman AM, Gupta S, Samali A. The eIF2alpha kinases: their structures and functions. *Cell Mol Life Sci* 2013; **70**(19): 3493-511.
78. Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 2002; **3**(3): REVIEWS0004.

79. Schwerk J, Savan R. Translating the Untranslated Region. *J Immunol* 2015; **195**(7): 2963-71.
80. Hinnebusch AG, Ivanov IP, Sonenberg N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science* 2016; **352**(6292): 1413-6.
81. Schepens B, Tinton SA, Bruynooghe Y, Beyaert R, Cornelis S. The polypyrimidine tract-binding protein stimulates HIF-1alpha IRES-mediated translation during hypoxia. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**(21): 6884-94.
82. Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency. *Nat Struct Mol Biol* 2007; **14**(5): 420-6.
83. Zimmer M, Ebert BL, Neil C, et al. Small-molecule inhibitors of HIF-2a translation link its 5'UTR iron-responsive element to oxygen sensing. *Mol Cell* 2008; **32**(6): 838-48.
84. Galban S, Kuwano Y, Pullmann R, Jr., et al. RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* 2008; **28**(1): 93-107.
85. Hagele S, Kuhn U, Boning M, Katschinski DM. Cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein (CPEB)1 and 2 bind to the HIF-1alpha mRNA 3'-UTR and modulate HIF-1alpha protein expression. *Biochem J* 2009; **417**(1): 235-46.
86. Kim TW, Yim S, Choi BJ, et al. Tristetraprolin regulates the stability of HIF-1alpha mRNA during prolonged hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **391**(1): 963-8.
87. Chamboredon S, Ciais D, Desroches-Castan A, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA: a new target for destabilization by tristetraprolin in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 2011; **22**(18): 3366-78.
88. Lebedeva S, Jens M, Theil K, et al. Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Mol Cell* 2011; **43**(3): 340-52.
89. Cho SJ, Teng IF, Zhang M, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha is regulated by RBM38, a RNA-binding protein and a p53 family target, via mRNA translation. *Oncotarget* 2015; **6**(1): 305-16.
90. El-Naggar AM, Veinotte CJ, Cheng H, et al. Translational Activation of HIF1alpha by YB-1 Promotes Sarcoma Metastasis. *Cancer Cell* 2015; **27**(5): 682-97.
91. Ivanova IG, Park CV, Yemm AI, Kenneth NS. PERK/eIF2alpha signaling inhibits HIF-induced gene expression during the unfolded protein response via YB1-dependent regulation of HIF1alpha translation. *Nucleic Acids Res* 2018; **46**(8): 3878-90.
92. Lujan DA, Ochoa JL, Hartley RS. Cold-inducible RNA binding protein in cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2018; **9**(2).
93. Uniacke J, Holterman CE, Lachance G, et al. An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature* 2012; **486**(7401): 126-9.

94. Ho JJD, Balukoff NC, Theodoridis PR, et al. A network of RNA-binding proteins controls translation efficiency to activate anaerobic metabolism. *Nat Commun* 2020; **11**(1): 2677.
95. Esmaille R, Ignarski M, Bohl K, et al. Activation of Hypoxia-Inducible Factor Signaling Modulates the RNA Protein Interactome in *Caenorhabditis elegans*. *iScience* 2019; **22**: 466-76.
96. Budde MW, Roth MB. Hydrogen sulfide increases hypoxia-inducible factor-1 activity independently of von Hippel-Lindau tumor suppressor-1 in *C. elegans*. *Mol Biol Cell* 2010; **21**(1): 212-7.
97. Beauchamp RO, Jr., Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1984; **13**(1): 25-97.
98. Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; **32**: 109-34.
99. Haouzi P. Ventilatory and metabolic effects of exogenous hydrogen sulfide. *Respir Physiol Neurobiol* 2012; **184**(2): 170-7.
100. Kimura H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino Acids* 2011; **41**(1): 113-21.
101. Gadalla MM, Snyder SH. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J Neurochem* 2010; **113**(1): 14-26.
102. Cao X, Bian JS. The Role of Hydrogen Sulfide in Renal System. *Front Pharmacol* 2016; **7**: 385.
103. Olson KR. Hydrogen sulfide and oxygen sensing: implications in cardiorespiratory control. *J Exp Biol* 2008; **211**(Pt 17): 2727-34.
104. Miller DL, Budde MW, Roth MB. HIF-1 and SKN-1 coordinate the transcriptional response to hydrogen sulfide in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 2011; **6**(9): e25476.
105. Miller DL, Roth MB. Hydrogen sulfide increases thermotolerance and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(51): 20618-22.
106. Budde MW, Roth MB. The response of *Caenorhabditis elegans* to hydrogen sulfide and hydrogen cyanide. *Genetics* 2011; **189**(2): 521-32.
107. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev* 2012; **92**(2): 791-896.
108. Mathew ND, Schlipalius DI, Ebert PR. Sulfurous gases as biological messengers and toxins: comparative genetics of their metabolism in model organisms. *J Toxicol* 2011; **2011**: 394970.
109. Qabazard B, Ahmed S, Li L, Arlt VM, Moore PK, Sturzenbaum SR. *C. elegans* aging is modulated by hydrogen sulfide and the sulfhydrylase/cysteine synthase *cysl-2*. *PLoS One* 2013; **8**(11): e80135.

110. Powell CR, Dillon KM, Matson JB. A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem Pharmacol* 2018; **149**: 110-23.
111. Tripatara P, Patel NS, Brancaleone V, et al. Characterisation of cystathionine gamma-lyase/hydrogen sulphide pathway in ischaemia/reperfusion injury of the mouse kidney: an in vivo study. *Eur J Pharmacol* 2009; **606**(1-3): 205-9.
112. Tripatara P, Patel NS, Collino M, et al. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. *Lab Invest* 2008; **88**(10): 1038-48.
113. Bos EM, Wang R, Snijder PM, et al. Cystathionine gamma-lyase protects against renal ischemia/reperfusion by modulating oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 2013; **24**(5): 759-70.
114. Simon F, Scheuerle A, Groger M, et al. Effects of intravenous sulfide during porcine aortic occlusion-induced kidney ischemia/reperfusion injury. *Shock* 2011; **35**(2): 156-63.
115. Zhu JX, Kalbfleisch M, Yang YX, et al. Detrimental effects of prolonged warm renal ischaemia-reperfusion injury are abrogated by supplemental hydrogen sulphide: an analysis using real-time intravital microscopy and polymerase chain reaction. *BJU Int* 2012; **110**(11 Pt C): E1218-27.
116. Azizi F, Seifi B, Kadkhodae M, Ahghari P. Administration of hydrogen sulfide protects ischemia reperfusion-induced acute kidney injury by reducing the oxidative stress. *Ir J Med Sci* 2016; **185**(3): 649-54.
117. Chen Y, Jin S, Teng X, et al. Hydrogen Sulfide Attenuates LPS-Induced Acute Kidney Injury by Inhibiting Inflammation and Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2018; **2018**: 6717212.
118. Han SJ, Kim JI, Park JW, Park KM. Hydrogen sulfide accelerates the recovery of kidney tubules after renal ischemia/reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant* 2015; **30**(9): 1497-506.
119. Teksen Y, Kadioglu E, Kocak C, Kocak H. Effect of Hydrogen Sulfide on Kidney Injury in Rat Model of Crush Syndrome. *J Surg Res* 2019; **235**: 470-8.
120. Szabo C, Papapetropoulos A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H₂S Levels: H₂S Donors and H₂S Biosynthesis Inhibitors. *Pharmacol Rev* 2017; **69**(4): 497-564.
121. Büntzel J, Bruns F, Lüftner D, Pollmann D, Schildhauer S. Protektive Medikamente (Organprotektoren): Mesna. Supportivtherapie bei malignen Erkrankungen. ONKODIN: Link, H. ; 2006.
122. Brock N, Stekar J, Pohl J, Niemeyer U, Scheffler G. Acrolein, the causative factor of urotoxic side-effects of cyclophosphamide, ifosfamide, trofosfamide and sufosfamide. *Arzneimittelforschung* 1979; **29**(4): 659-61.

123. Mashiach E, Sela S, Weinstein T, Cohen HI, Shasha SM, Kristal B. Mesna: a novel renoprotective antioxidant in ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2001; **16**(3): 542-51.
124. Kabasakal L, Sehirli AO, Cetinel S, Cikler E, Gedik N, Sener G. Mesna (2-mercaptoethane sulfonate) prevents ischemia/reperfusion induced renal oxidative damage in rats. *Life Sci* 2004; **75**(19): 2329-40.
125. Sener G, Sehirli O, Erkanli G, Cetinel S, Gedik N, Yegen B. 2-Mercaptoethane sulfonate (MESNA) protects against burn-induced renal injury in rats. *Burns* 2004; **30**(6): 557-64.
126. Chen H, Busse LW. Novel Therapies for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Rep* 2017; **2**(5): 785-99.
127. Greiner R, Palinkas Z, Basell K, et al. Polysulfides link H₂S to protein thiol oxidation. *Antioxid Redox Signal* 2013; **19**(15): 1749-65.
128. Ali R, Pal HA, Hameed R, Nazir A, Verma S. Controlled release of hydrogen sulfide significantly reduces ROS stress and increases dopamine levels in transgenic *C. elegans*. *Chem Commun (Camb)* 2019; **55**(68): 10142-5.
129. Yang G, An SS, Ji Y, Zhang W, Pei Y. Hydrogen Sulfide Signaling in Oxidative Stress and Aging Development. *Oxid Med Cell Longev* 2015; **2015**: 357824.
130. Chander V, Tewari D, Negi V, Singh R, Upadhyaya K, Aleya L. Structural characterization of Himalayan black rock salt by SEM, XRD and in-vitro antioxidant activity. *Sci Total Environ* 2020; **748**: 141269.
131. BfR. Vorkommen von Schwefelwasserstoff in „Schwarzsatz“. Berlin: Bundesinstitut für Risikobewertung; 2003.
132. Müller RU, Zank S, Fabretti F, Benzing T. *Caenorhabditis elegans*, a model organism for kidney research: from cilia to mechanosensation and longevity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; **20**(4): 400-8.
133. Ganner A, Neumann-Haefelin E. Genetic kidney diseases: *Caenorhabditis elegans* as model system. *Cell Tissue Res* 2017; **369**(1): 105-18.
134. Shaye DD, Greenwald I. OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS One* 2011; **6**(5): e20085.
135. Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**(5): 387-98.
136. Edgar L. Embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. Development: Springer, Berlin, Heidelberg; 1992.
137. Altun ZF, Hall DH. Handbook of *C. elegans* Anatomy. WormAtlas; 2021.
138. Byerly L, Cassada RC, Russell RL. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev Biol* 1976; **51**(1): 23-33.

139. Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 1983; **100**(1): 64-119.
140. Anderson JL, Morran LT, Phillips PC. Outcrossing and the maintenance of males within *C. elegans* populations. *J Hered* 2010; **101 Suppl 1**: S62-74.
141. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974; **77**(1): 71-94.
142. Haag ES. Dial-a-mutant: web-based knockout collections for model organisms. *Biol Cell* 2007; **99**(6): 343-7.
143. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; **391**(6669): 806-11.
144. Kamath RS, Ahringer J. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 2003; **30**(4): 313-21.
145. Rual JF, Ceron J, Koreth J, et al. Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome Res* 2004; **14**(10B): 2162-8.
146. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994; **263**(5148): 802-5.
147. Sugi T. Genome Editing in *C. elegans* and Other Nematode Species. *Int J Mol Sci* 2016; **17**(3): 295.
148. Lithgow GJ, White TM, Melov S, Johnson TE. Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(16): 7540-4.
149. Walker GA, Walker DW, Lithgow GJ. A relationship between thermotolerance and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1998; **3**(1): 6-10.
150. Muñoz MJ. Longevity and heat stress regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* 2003; **124**(1): 43-8.
151. Kishimoto S, Uno M, Nishida E. Molecular mechanisms regulating lifespan and environmental stress responses. *Inflamm Regen* 2018; **38**: 22.
152. Andersen J, Krichevsky A, Lehesté JR, Moloney DJ. *Caenorhabditis elegans* as an undergraduate educational tool for teaching RNAi. *Biochem Mol Biol Educ* 2008; **36**(6): 417-27.
153. Xiao R, Chun L, Ronan EA, Friedman DI, Liu J, Xu XZ. RNAi Interrogation of Dietary Modulation of Development, Metabolism, Behavior, and Aging in *C. elegans*. *Cell Rep* 2015; **11**(7): 1123-33.
154. Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR. Section III, Aging in *C. elegans*. *C. elegans II* 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.

155. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1997; **277**(5328): 942-6.
156. Conte D, Jr., MacNeil LT, Walhout AJM, Mello CC. RNA Interference in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Protoc Mol Biol* 2015; **109**: 26 3 1- 3 30.
157. McColl G, Rogers AN, Alavez S, et al. Insulin-like signaling determines survival during stress via posttranscriptional mechanisms in *C. elegans*. *Cell Metab* 2010; **12**(3): 260-72.
158. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 1993; **366**(6454): 461-4.
159. Peterson M. Erforschung der Modulation zellulärer Stressresistenz mittels Präkonditionierung in *C. elegans* [medizinische Doktorarbeit]. Köln: Universität zu Köln; 2019.
160. Zhang MY, Dugbartey GJ, Juriasingani S, Sener A. Hydrogen Sulfide Metabolite, Sodium Thiosulfate: Clinical Applications and Underlying Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci* 2021; **22**(12).
161. Henderson ST, Johnson TE. *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 2001; **11**(24): 1975-80.
162. Furuhashi T, Sakamoto K. FoxO/Daf-16 restored thrashing movement reduced by heat stress in *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2014; **170**: 26-32.
163. Hou CL, Wang MJ, Sun C, et al. Protective Effects of Hydrogen Sulfide in the Ageing Kidney. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**: 7570489.
164. Li N, Wang MJ, Jin S, et al. The H₂S Donor NaHS Changes the Expression Pattern of H₂S-Producing Enzymes after Myocardial Infarction. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**: 6492469.
165. Wu W, Hou CL, Mu XP, et al. H₂S Donor NaHS Changes the Production of Endogenous H₂S and NO in D-Galactose-Induced Accelerated Ageing. *Oxid Med Cell Longev* 2017; **2017**: 5707830.
166. Nandi SS, Mishra PK. H₂S and homocysteine control a novel feedback regulation of cystathionine beta synthase and cystathionine gamma lyase in cardiomyocytes. *Sci Rep* 2017; **7**(1): 3639.
167. Hine C, Harputlugil E, Zhang Y, et al. Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell* 2015; **160**(1-2): 132-44.
168. Zevian SC, Yanowitz JL. Methodological considerations for heat shock of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 2014; **68**(3): 450-7.

169. Kishimoto S, Uno M, Okabe E, Nono M, Nishida E. Environmental stresses induce transgenerationally inheritable survival advantages via germline-to-soma communication in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* 2017; **8**: 14031.
170. Stroustrup N, Ulmschneider BE, Nash ZM, Lopez-Moyado IF, Apfeld J, Fontana W. The *Caenorhabditis elegans* Lifespan Machine. *Nat Methods* 2013; **10**(7): 665-70.
171. Treinin M, Shliar J, Jiang H, Powell-Coffman JA, Bromberg Z, Horowitz M. HIF-1 is required for heat acclimation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Physiol Genomics* 2003; **14**(1): 17-24.
172. Shen C, Nettleton D, Jiang M, Kim SK, Powell-Coffman JA. Roles of the HIF-1 hypoxia-inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 2005; **280**(21): 20580-8.
173. Zhou J, Wang X, Wang M, et al. The lysine catabolite saccharopine impairs development by disrupting mitochondrial homeostasis. *J Cell Biol* 2019; **218**(2): 580-97.
174. Sacksteder KA, Biery BJ, Morrell JC, et al. Identification of the alpha-amino adipic semialdehyde synthase gene, which is defective in familial hyperlysinemia. *Am J Hum Genet* 2000; **66**(6): 1736-43.
175. Leandro J, Houten SM. Saccharopine, a lysine degradation intermediate, is a mitochondrial toxin. *J Cell Biol* 2019; **218**(2): 391-2.
176. Picard M, McEwen BS, Epel ES, Sandi C. An energetic view of stress: Focus on mitochondria. *Front Neuroendocrinol* 2018; **49**: 72-85.
177. Machiela E, Lontis T, Dues DJ, et al. Disruption of mitochondrial dynamics increases stress resistance through activation of multiple stress response pathways. *FASEB J* 2020; **34**(6): 8475-92.
178. McQuary PR, Liao CY, Chang JT, et al. *C. elegans* S6K Mutants Require a Creatine-Kinase-like Effector for Lifespan Extension. *Cell Rep* 2016; **14**(9): 2059-67.
179. Baird MF, Graham SM, Baker JS, Bickerstaff GF. Creatine-kinase- and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. *J Nutr Metab* 2012; **2012**: 960363.
180. Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1762**(2): 164-80.
181. Kekelidze T, Khait I, Togliatti A, Benzecry JM, Wieringa B, Holtzman D. Altered brain phosphocreatine and ATP regulation when mitochondrial creatine kinase is absent. *J Neurosci Res* 2001; **66**(5): 866-72.
182. Murabito A, Hirsch E, Ghigo A. Mechanisms of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Is Mitochondrial Dysfunction the Answer? *Front Cardiovasc Med* 2020; **7**: 35.

183. Pohl F, Teixeira-Castro A, Costa MD, et al. GST-4-Dependent Suppression of Neurodegeneration in *C. elegans* Models of Parkinson's and Machado-Joseph Disease by Rapeseed Pomace Extract Supplementation. *Front Neurosci* 2019; **13**: 1091.
184. Mahmud I, Ueda N, Yamaguchi H, et al. Prostaglandin D synthase in human megakaryoblastic cells. *J Biol Chem* 1997; **272**(45): 28263-6.
185. Rajakariar R, Hilliard M, Lawrence T, et al. Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxyDelta12 14 PGJ2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(52): 20979-84.
186. Flanagan JU, Smythe ML. Sigma-class glutathione transferases. *Drug Metab Rev* 2011; **43**(2): 194-214.
187. Kanaoka Y, Urade Y. Hematopoietic prostaglandin D synthase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; **69**(2-3): 163-7.
188. Shadel GS, Horvath TL. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell* 2015; **163**(3): 560-9.
189. Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J Physiol Pharmacol* 2013; **64**(4): 409-21.
190. Mohri I, Aritake K, Taniguchi H, et al. Inhibition of prostaglandin D synthase suppresses muscular necrosis. *Am J Pathol* 2009; **174**(5): 1735-44.
191. Redensek A, Rathore KI, Berard JL, et al. Expression and detrimental role of hematopoietic prostaglandin D synthase in spinal cord contusion injury. *Glia* 2011; **59**(4): 603-14.
192. Rittchen S, Heinemann A. Therapeutic Potential of Hematopoietic Prostaglandin D2 Synthase in Allergic Inflammation. *Cells* 2019; **8**(6).
193. Choi DJ, An J, Jou I, Park SM, Joe EH. A Parkinson's disease gene, DJ-1, regulates anti-inflammatory roles of astrocytes through prostaglandin D2 synthase expression. *Neurobiol Dis* 2019; **127**: 482-91.
194. Edmonds JW, Prasain JK, Dorand D, et al. Insulin/FOXO signaling regulates ovarian prostaglandins critical for reproduction. *Dev Cell* 2010; **19**(6): 858-71.
195. Tao J, Wu QY, Ma YC, Chen YL, Zou CG. Antioxidant response is a protective mechanism against nutrient deprivation in *C. elegans*. *Sci Rep* 2017; **7**: 43547.
196. Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci* 2011; **32**(3): 125-30.
197. Zarse K, Schmeisser S, Groth M, et al. Impaired insulin/IGF1 signaling extends life span by promoting mitochondrial L-proline catabolism to induce a transient ROS signal. *Cell Metab* 2012; **15**(4): 451-65.

198. Yee C, Yang W, Hekimi S. The intrinsic apoptosis pathway mediates the pro-longevity response to mitochondrial ROS in *C. elegans*. *Cell* 2014; **157**(4): 897-909.
199. Hwang AB, Ryu EA, Artan M, et al. Feedback regulation via AMPK and HIF-1 mediates ROS-dependent longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**(42): E4458-67.
200. Ristow M, Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2011; **51**(2): 327-36.
201. Bazopoulou D, Knoefler D, Zheng Y, et al. Developmental ROS individualizes organismal stress resistance and lifespan. *Nature* 2019; **576**(7786): 301-5.
202. Bao L, Vlcek C, Paces V, Kraus JP. Identification and tissue distribution of human cystathionine beta-synthase mRNA isoforms. *Arch Biochem Biophys* 1998; **350**(1): 95-103.
203. Renga B. Hydrogen sulfide generation in mammals: the molecular biology of cystathionine-beta- synthase (CBS) and cystathionine-gamma-lyase (CSE). *Inflamm Allergy Drug Targets* 2011; **10**(2): 85-91.
204. Takano N, Peng YJ, Kumar GK, et al. Hypoxia-inducible factors regulate human and rat cystathionine beta-synthase gene expression. *Biochem J* 2014; **458**(2): 203-11.
205. Majtan T, Krijt J, Sokolova J, et al. Biogenesis of Hydrogen Sulfide and Thioethers by Cystathionine Beta-Synthase. *Antioxid Redox Signal* 2018; **28**(4): 311-23.
206. Jensen KK, Geoghagen NS, Jin L, et al. Pharmacological activation and genetic manipulation of cystathionine beta-synthase alter circulating levels of homocysteine and hydrogen sulfide in mice. *Eur J Pharmacol* 2011; **650**(1): 86-93.
207. Sacharow SJ, Picker JD, Levy HL. Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA); 1993.
208. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002; **325**(7374): 1202.
209. Homocysteine Studies C. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002; **288**(16): 2015-22.
210. Zuhra K, Augsburger F, Majtan T, Szabo C. Cystathionine-beta-Synthase: Molecular Regulation and Pharmacological Inhibition. *Biomolecules* 2020; **10**(5).
211. Panagaki T, Randi EB, Augsburger F, Szabo C. Overproduction of H₂S, generated by CBS, inhibits mitochondrial Complex IV and suppresses oxidative phosphorylation in Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; **116**(38): 18769-71.
212. Zhu H, Blake S, Chan KT, Pearson RB, Kang J. Cystathionine beta-Synthase in Physiology and Cancer. *Biomed Res Int* 2018; **2018**: 3205125.

213. Paul BD, Snyder SH, Kashfi K. Effects of hydrogen sulfide on mitochondrial function and cellular bioenergetics. *Redox Biol* 2021; **38**: 101772.
214. Smith SW, Latta LCt, Denver DR, Estes S. Endogenous ROS levels in *C. elegans* under exogenous stress support revision of oxidative stress theory of life-history tradeoffs. *BMC Evol Biol* 2014; **14**: 161.
215. Burton NO, Riccio C, Dallaire A, et al. Cysteine synthases CYSL-1 and CYSL-2 mediate *C. elegans* heritable adaptation to *P. vranovensis* infection. *Nat Commun* 2020; **11**(1): 1741.
216. Englbrecht CC, Schoof H, Bohm S. Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC Genomics* 2004; **5**(1): 39.
217. Zhang A, Liu D, Hua C, et al. The *Arabidopsis* Gene zinc finger protein 3(ZFP3) Is Involved in Salt Stress and Osmotic Stress Response. *PLoS One* 2016; **11**(12): e0168367.
218. Tadepally HD, Burger G, Aubry M. Evolution of C2H2-zinc finger genes and subfamilies in mammals: species-specific duplication and loss of clusters, genes and effector domains. *BMC Evol Biol* 2008; **8**: 176.
219. Berg JM. Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for interactions between macromolecules. *J Biol Chem* 1990; **265**(12): 6513-6.
220. Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, et al. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov* 2017; **3**: 17071.
221. Timmons L, Court DL, Fire A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 2001; **263**(1-2): 103-12.
222. Kim KW, Tang NH, Piggott CA, et al. Expanded genetic screening in *Caenorhabditis elegans* identifies new regulators and an inhibitory role for NAD(+) in axon regeneration. *Elife* 2018; **7**.
223. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 2009; **78**: 929-58.
224. Thiele BJ, Doller A, Kahne T, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. RNA-binding proteins heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, E1, and K are involved in post-transcriptional control of collagen I and III synthesis. *Circ Res* 2004; **95**(11): 1058-66.
225. Stefanovic B. RNA protein interactions governing expression of the most abundant protein in human body, type I collagen. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2013; **4**(5): 535-45.
226. Zhang Y, Stefanovic B. LARP6 Meets Collagen mRNA: Specific Regulation of Type I Collagen Expression. *Int J Mol Sci* 2016; **17**(3): 419.

227. Strafella C, Caputo V, Minozzi G, et al. Atopic Eczema: Genetic Analysis of COL6A5, COL8A1, and COL10A1 in Mediterranean Populations. *Biomed Res Int* 2019; **2019**: 3457898.
228. Bushby KM, Collins J, Hicks D. Collagen type VI myopathies. *Adv Exp Med Biol* 2014; **802**: 185-99.
229. Cescon M, Gattazzo F, Chen P, Bonaldo P. Collagen VI at a glance. *J Cell Sci* 2015; **128**(19): 3525-31.
230. Yamada Y, Kato K, Oguri M, et al. Identification of 13 novel susceptibility loci for early-onset myocardial infarction, hypertension, or chronic kidney disease. *Int J Mol Med* 2018; **42**(5): 2415-36.
231. Sellegounder D, Liu Y, Wibisono P, Chen CH, Leap D, Sun J. Neuronal GPCR NPR-8 regulates *C. elegans* defense against pathogen infection. *Sci Adv* 2019; **5**(11): eaaw4717.
232. Sandhu A, Badal D, Sheokand R, Tyagi S, Singh V. Specific collagens maintain the cuticle permeability barrier in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 2021; **217**(3).
233. El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet* 2017; **13**(7): e1006780.
234. Peng J. Gene redundancy and gene compensation: An updated view. *J Genet Genomics* 2019; **46**(7): 329-33.
235. Watson E, Walhout AJ. *Caenorhabditis elegans* metabolic gene regulatory networks govern the cellular economy. *Trends Endocrinol Metab* 2014; **25**(10): 502-8.
236. Revtovich AV, Lee R, Kirienko NV. Interplay between mitochondria and diet mediates pathogen and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 2019; **15**(3): e1008011.
237. Skulj M, Okrslar V, Jalen S, et al. Improved determination of plasmid copy number using quantitative real-time PCR for monitoring fermentation processes. *Microb Cell Fact* 2008; **7**: 6.
238. Jahn M, Vorpahl C, Türkowsky D, Müller S. Akkurate Bestimmung der Plasmidkopienzahl pro Zelle. *BIOspektrum* 2016; **22**(2): 211-3.
239. Fernandez-Lizarbe S, Lecona E, Santiago-Gomez A, Olmo N, Lizarbe MA, Turnay J. Structural and lipid-binding characterization of human annexin A13a reveals strong differences with its long A13b isoform. *Biol Chem* 2017; **398**(3): 359-71.
240. Rhee HJ, Kim GY, Huh JW, Kim SW, Na DS. Annexin I is a stress protein induced by heat, oxidative stress and a sulfhydryl-reactive agent. *Eur J Biochem* 2000; **267**(11): 3220-5.

241. Turnay J, Lecona E, Fernandez-Lizarbe S, et al. Structure-function relationship in annexin A13, the founder member of the vertebrate family of annexins. *Biochem J* 2005; **389**(Pt 3): 899-911.
242. Jiang G, Wang P, Wang W, Li W, Dai L, Chen K. Annexin A13 promotes tumor cell invasion in vitro and is associated with metastasis in human colorectal cancer. *Oncotarget* 2017; **8**(13): 21663-73.
243. Xue GL, Zhang C, Zheng GL, Zhang LJ, Bi JW. Annexin A13 predicts poor prognosis for lung adenocarcinoma patients and accelerates the proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells by modulating epithelial-mesenchymal transition. *Fundam Clin Pharmacol* 2020; **34**(6): 687-96.
244. Arur S, Uche UE, Rezaul K, et al. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell* 2003; **4**(4): 587-98.
245. Nix P, Hammarlund M, Hauth L, Lachnit M, Jorgensen EM, Bastiani M. Axon regeneration genes identified by RNAi screening in *C. elegans*. *J Neurosci* 2014; **34**(2): 629-45.
246. Judy ME, Nakamura A, Huang A, et al. A shift to organismal stress resistance in programmed cell death mutants. *PLoS Genet* 2013; **9**(9): e1003714.
247. Amrit FR, Ratnappan R, Keith SA, Ghazi A. The *C. elegans* lifespan assay toolkit. *Methods* 2014; **68**(3): 465-75.
248. Cornwell AB, Samuelson AV. Analysis of Lifespan in *C. elegans*: Low- and High-Throughput Approaches. *Methods Mol Biol* 2020; **2144**: 7-27.
249. Cornwell AB, Llop JR, Salzman P, Thakar J, Samuelson AV. The Replica Set Method: A High-throughput Approach to Quantitatively Measure *Caenorhabditis elegans* Lifespan. *J Vis Exp* 2018; (136).
250. Hansen M, Chandra A, Mitic LL, Onken B, Driscoll M, Kenyon C. A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS Genet* 2008; **4**(2): e24.
251. Hansen M, Hsu AL, Dillin A, Kenyon C. New genes tied to endocrine, metabolic, and dietary regulation of lifespan from a *Caenorhabditis elegans* genomic RNAi screen. *PLoS Genet* 2005; **1**(1): 119-28.
252. Mitchell DH, Stiles JW, Santelli J, Sanadi DR. Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *J Gerontol* 1979; **34**(1): 28-36.
253. Wang H, Zhao Y, Zhang Z. Age-dependent effects of floxuridine (FUdR) on senescent pathology and mortality in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 2019; **509**(3): 694-9.
254. Zhang Y, Shao Z, Zhai Z, Shen C, Powell-Coffman JA. The HIF-1 hypoxia-inducible factor modulates lifespan in *C. elegans*. *PLoS One* 2009; **4**(7): e6348.

255. Chen D, Thomas EL, Kapahi P. HIF-1 modulates dietary restriction-mediated lifespan extension via IRE-1 in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 2009; **5**(5): e1000486.
256. Ewald CY, Landis JN, Porter Abate J, Murphy CT, Blackwell TK. Dauer-independent insulin/IGF-1-signalling implicates collagen remodelling in longevity. *Nature* 2015; **519**(7541): 97-101.
257. Hwang AB, Jeong DE, Lee SJ. Mitochondria and organismal longevity. *Curr Genomics* 2012; **13**(7): 519-32.
258. Jensen MB, Jasper H. Mitochondrial proteostasis in the control of aging and longevity. *Cell Metab* 2014; **20**(2): 214-25.
259. Martin IV, MacNeill SA. ATP-dependent DNA ligases. *Genome Biol* 2002; **3**(4): REVIEWS3005.
260. Vincent JA, Kwong TJ, Tsukiyama T. ATP-dependent chromatin remodeling shapes the DNA replication landscape. *Nat Struct Mol Biol* 2008; **15**(5): 477-84.
261. Choe KP, Przybysz AJ, Strange K. The WD40 repeat protein WDR-23 functions with the CUL4/DDB1 ubiquitin ligase to regulate nuclear abundance and activity of SKN-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* 2009; **29**(10): 2704-15.
262. Inoue H, Hisamoto N, An JH, et al. The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes Dev* 2005; **19**(19): 2278-83.
263. Detienne G, Van de Walle P, De Haes W, Schoofs L, Temmerman L. SKN-1-independent transcriptional activation of glutathione S-transferase 4 (GST-4) by EGF signaling. *Worm* 2016; **5**(4): e1230585.
264. Liu G, Rogers J, Murphy CT, Rongo C. EGF signalling activates the ubiquitin proteasome system to modulate *C. elegans* lifespan. *EMBO J* 2011; **30**(15): 2990-3003.
265. Venkatesh SR, Singh V. G protein-coupled receptors: The choreographers of innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog* 2021; **17**(1): e1009151.
266. Wei Y, Kenyon C. Roles for ROS and hydrogen sulfide in the longevity response to germline loss in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; **113**(20): E2832-41.
267. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; **11**(3): 298-300.
268. Miranda-Vizuete A, Veal EA. *Caenorhabditis elegans* as a model for understanding ROS function in physiology and disease. *Redox Biol* 2017; **11**: 708-14.
269. Crombie TA, Tang L, Choe KP, Julian D. Inhibition of the oxidative stress response by heat stress in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol* 2016; **219**(Pt 14): 2201-11.
270. Zecic A, Braeckman BP. DAF-16/FoxO in *Caenorhabditis elegans* and Its Role in Metabolic Remodeling. *Cells* 2020; **9**(1).

271. Hannenhalli S, Kaestner KH. The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nat Rev Genet* 2009; **10**(4): 233-40.
272. Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrcikapa N, Jiang F, Davis RJ, Tissenbaum HA. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(12): 4494-9.
273. Horikawa M, Sakamoto K. Fatty-acid metabolism is involved in stress-resistance mechanisms of *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **390**(4): 1402-7.
274. Lee ZW, Zhou J, Chen CS, et al. The slow-releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits novel anti-cancer effects in vitro and in vivo. *PLoS One* 2011; **6**(6): e21077.
275. Corvino A, Frecentese F, Magli E, et al. Trends in H₂S-Donors Chemistry and Their Effects in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel)* 2021; **10**(3).
276. Ibrahim H, Serag A, Farag MA. Emerging analytical tools for the detection of the third gasotransmitter H₂S, a comprehensive review. *J Adv Res* 2021; **27**: 137-53.
277. Zhang Y, Weiner JH. A simple semi-quantitative in vivo method using H₂S detection to monitor sulfide metabolizing enzymes. *Biotechniques* 2014; **57**(4): 208-10.
278. DeLeon ER, Stoy GF, Olson KR. Passive loss of hydrogen sulfide in biological experiments. *Anal Biochem* 2012; **421**(1): 203-7.
279. Hughes MN, Centelles MN, Moore KP. Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radic Biol Med* 2009; **47**(10): 1346-53.
280. Kolluru GK, Shen X, Bir SC, Kevil CG. Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide* 2013; **35**: 5-20.
281. Nagy P, Palinkas Z, Nagy A, Budai B, Toth I, Vasas A. Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1840**(2): 876-91.
282. Jeong DE, Lee Y, Lee SV. Western Blot Analysis of *C. elegans* Proteins. *Methods Mol Biol* 2018; **1742**: 213-25.
283. Guthmueller KL, Yoder ML, Holgado AM. Determining genetic expression profiles in *C. elegans* using microarray and real-time PCR. *J Vis Exp* 2011; (53).
284. Tissenbaum HA. Using *C. elegans* for aging research. *Invertebr Reprod Dev* 2015; **59**(sup1): 59-63.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Aufbau der Niere (in Anlehnung an ³) | 11 |
| Abb. 2: Regulation der intrazellulären HIF-Aktivität | 14 |
| Abb. 3: Interaktionsmöglichkeiten von RNAs und RBPs (in Anlehnung an ⁶¹) | 17 |
| Abb. 4: Regulation der renalen H ₂ S-Konzentration (in Anlehnung an ¹⁰³) | 19 |
| Abb. 5: H ₂ S-Stoffwechsel in <i>C. elegans</i> (in Anlehnung an ¹⁰⁶) | 20 |
| Abb. 6: Entwicklungszyklus von <i>C. elegans</i> bei 20 °C. (in Anlehnung an ^{137,138}) | 22 |
| Abb. 7: Thermotoleranz von RBP LOF-Mutanten | 51 |
| Abb. 8: Generierung eines <i>cysl-2</i> RNAi-Plasmids | 52 |
| Abb. 9: Thermotoleranz von WT-Würmern nach Fütterung mit HT115 RNAi-Bakterien | 53 |
| Abb. 10: Thermotoleranz von WT-Würmern nach OP50 oder HT115 <i>EV</i> Diät | 54 |
| Abb. 11: GFP-Expression in <i>sur-5::GFP</i> -Würmern nach Fütterung mit GFP RNAi-Bakterien | 56 |
| Abb. 12: Thermotoleranz von WT-Würmern nach Diät mit OP50 oder OP50(xu363) <i>EV</i> Bakterien | 57 |
| Abb. 13: Thermotoleranz von WT-Würmern nach Fütterung mit OP50(xu363) RNAi-Bakterien | 58 |
| Abb. 14: Lebensspanne von RBP LOF-Mutanten | 61 |
| Abb. 15: Thermotoleranz von WT-Würmern unter Exposition mit Mesna oder Kala namak | 62 |
| Abb. 16: Thermotoleranz von <i>hif-1(ia4)</i> , <i>daf-16(mu86)</i> und <i>daf-16(mu86);hif-1(ia4)</i> LOF-Mutanten unter Exposition mit Kala namak und Mesna | 64 |
| Abb. 17: H ₂ S-Messung in WT-Wurmlysaten mittels konventioneller H ₂ S-Teststreifen | 65 |
| Abb. 18: H ₂ S-Messung in Reinkonzentraten verschiedener H ₂ S-Donatoren mittels konventioneller H ₂ S-Teststreifen | 66 |
| Abb. 19: Endogene H ₂ S-Produktion von WT-Würmern und <i>eat-2(ad1116)</i> LOF-Mutanten | 67 |
| Abb. 20: Endogene H ₂ S-Produktion von WT-Würmern und <i>daf-16(mu86);hif-1(ia4)</i> LOF-Mutanten unter Exposition mit Kala namak und Mesna | 69 |

7.2. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tabelle 1: Schweregradeinteilung des ANV (KDIGO) ¹⁴ | 13 |
| Tabelle 2: Chemikalien | 25 |
| Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien | 28 |
| Tabelle 4: Laborgeräte | 30 |
| Tabelle 5: Primer zur Genotypisierung | 32 |
| Tabelle 6: Primer zur Klonierung | 32 |
| | 109 |

| | |
|---|----|
| Tabelle 7: Primer zur Sequenzierung | 32 |
| Tabelle 8: <i>Caenorhabditis elegans</i> Stämme | 33 |
| Tabelle 9: OP50 Bakterien | 34 |
| Tabelle 10: HT115 Bakterien | 34 |
| Tabelle 11: DH10 Bakterien | 34 |
| Tabelle 12: OP50(xu363) Bakterien | 34 |
| Tabelle 13: Computerprogramme | 35 |
| Tabelle 14: Online-Tools | 35 |
| Tabelle 15: Basislösung, pH 12 | 36 |
| Tabelle 16: Gefrierlösung | 36 |
| Tabelle 17: Lämmli-Probenpuffer | 36 |
| Tabelle 18: Laufpuffer | 36 |
| Tabelle 19: Lysierpuffer | 37 |
| Tabelle 20: M9-Puffer | 37 |
| Tabelle 21: Natriumhypochlorit-Lysierlösung | 37 |
| Tabelle 22: Neutralisierungslösung, pH 5 | 37 |
| Tabelle 23: PBS-Puffer | 37 |
| Tabelle 24: Polyacrylamid-Sammelgel | 38 |
| Tabelle 25: Polyacrylamid-Trenngel | 38 |
| Tabelle 26: Protein-Waschpuffer | 38 |
| Tabelle 27: PSI-Medium | 38 |
| Tabelle 28: SOB-Medium | 39 |
| Tabelle 29: TAE-Puffer | 39 |
| Tabelle 30: TFB-1-Puffer | 39 |
| Tabelle 31: TFB-2-Puffer | 39 |
| Tabelle 32: Transferpuffer | 40 |
| Tabelle 33: DNA-Polymerasen | 41 |
| Tabelle 34: DNA-Sequenzierung | 42 |
| Tabelle 35: NGM-Platten | 44 |
| Tabelle 36: Vergleich der relativen Überlebensraten nach Hitzeschock | 54 |
| Tabelle 37: Zensierte Würmer bei der Lebensspannenbestimmung | 59 |
| Tabelle 38: Mittlere Lebensspanne von <i>Caenorhabditis elegans</i> Stämmen | 59 |