

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und
Kinderkardiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Ertan Mayatepek

**Modulation der zellulären Eisen- und Hämhomöostase
durch die mitochondrialen Proteine ATAD-3 und Frataxin in
*Caenorhabditis elegans***

Dissertation

zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Gesine Friederike Müting

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med Felix Distelmaier

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Reichert

Für Friederike, Cara, Malin und Helena
In Erinnerung an Rolf, Gisela und Peter

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

van den Ecker, D., Hoffmann, M., Müting, G., Maglioni, S., Herebian, D., Mayatepek, E., Ventura, N., Distelmaier, F., (2015), *Caenorhabditis elegans* ATAD-3 modulates mitochondrial iron and heme homeostasis. Biochemical and Biophysical Research Communications 2015 Nov 13;467(2):389-94 DOI: [10.1016/j.bbrc.2015.09.143](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.143) Epub 2015 Sep 30. PMID: 26427876

Zusammenfassung der Arbeit

Hintergrund dieser molekularbiologischen Untersuchungen zum Eisenstoffwechsel sind die beim Menschen selten vorkommenden, meist genetisch bedingten Mitochondriopathien. Diese Stoffwechselerkrankungen sind durch eine Fehlfunktion der Mitochondrien bedingt, deren Ursache in fehlenden oder fehlerhaft ausgebildeten mitochondrialen Proteinen liegt. Durch molekularbiologische Methoden ist das Wissen um die Funktionsweise und das Zusammenwirken mitochondrialer Proteine in den letzten Jahren enorm gewachsen.

Mit Frataxin ist ein humanes mitochondriales Protein gefunden worden, das durch Ausfall oder Fehlfunktion ursächlich für die Friedreich-Ataxie ist, eine angeborene neurodegenerative Erkrankung. Frataxin spielt eine wichtige Rolle im mitochondrialen Eisenstoffwechsel, ein Fehlen dieses Proteins führt zu einer Eisenüberladung der Zellen. ATAD3 ist ein weiteres humanes mitochondriales Protein, bei dem eine Beteiligung am mitochondrialen Eisenstoffwechsel vermutet wird. Beide Proteine zeigen eine mitochondriale Lokalisation. In der Literatur wurde zudem eine mögliche Beeinflussung des Häm-Metabolismus durch diese Proteine für das humane System beschrieben.

Caenorhabditis elegans, ein erstmals 1974 durch S. Brenner beschriebener und gut untersuchter Modellorganismus, weist eine hohe Sequenzidentität verschiedener Proteine zu ihren Homologa beim Menschen auf. Er ist für das Studium einzelner Proteine und ihrer Wirkungsweise gut geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurden die homologen Proteine ATAD-3 und Frataxin unter den Fragen (1.) welche Rolle sie im Eisen- und Hämstoffwechsel spielen und (2.) ob Eisenchelatoren oder Flavonoide eine Wirkung auf erhöhte Eisenspiegel in *C. elegans* haben, studiert.

Mit Hilfe der Ribonukleinsäure vermittelten Interferenz (RNAi) wurden die Proteine in *C. elegans* ausgeschaltet. Die Eisenaufnahme der so modifizierten Würmer wurde – im Vergleich zu einer Kontrollgruppe unveränderter Würmer – mit Zn(II)-MesoporphyrinIX (ZnMp), einem fluoreszenzmarkierten Häminanalogon in Kurzzeit- (6h) und Langzeit-Studien (1d) untersucht und durch Messung der Fluoreszenz quantifiziert. Mit dem Iron Colorimetric Assay Kit K 390 (BioVision, Inc.) und dem Hemin Assay Kit, Kat. Nr. MAK036 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurden direkte Eisen- und Häminmessungen durchgeführt und untersucht, ob die Ausschaltung der Proteine zu erhöhten Eisenkonzentrationen in den Nematoden führte. In Fecundity-Assays wurde die Fertilität und Entwicklung studiert.

Bei den ZnMp-Assays zeigten sich sowohl im Kurzzeit (6h) als auch im Langzeitversuch (1d) bei den *frh*(RNAi) eine Erhöhung der Fluoreszenz gegenüber der Kontrollgruppe, für *atad-3*(RNAi) konnte dies nicht analog gezeigt werden. Die direkte Messung von Eisen im Wurmlysat hatte ihre methodischen Limitationen und ergab keine verwertbaren Ergebnisse. In den Häminassays konnte eine signifikante Erhöhung des Hämins bei *atad-3*(RNAi) im Wurmlysat nachgewiesen werden. Die Entwicklung der *atad-3* defizienten Würmer ist deutlich reduziert, sie verharren im Larvenstadium L1 bis L2 und zeigen keine Fortpflanzungstendenz. Die Gabe von Deferoxamin und der Flavonoide Quercetin und Myricetin zeigt keinen Rescueeffekt bei *atad-3*(RNAi).

Die Ergebnisse zeigen, dass ATAD-3 und Frataxin eine wichtige Rolle im Eisen- und Häminstoffwechsel von *C. elegans* spielen. Ihre Ausschaltung führt zu einer Erhöhung von Eisen im Wurm mit Hinweisen auf Toxizität. Deferoxamin, Quercetin und Myricetin als Eisenbinder zeigen in diesem Modell allerdings keinen „therapeutischen“ Effekt

Abstract

The background to this molecular biological research on the iron metabolism are mitochondrial diseases, which rarely occur in humans and are mostly of genetical origin. These metabolic diseases occur due to a malfunction of mitochondrial respiration, the cause of which lies in missing or defectively formed mitochondrial proteins. Molecular biological methods have led to an increase in knowledge about the functioning and interaction of mitochondrial proteins in recent years. Amongst others, human frataxin is a mitochondrial protein whose failure or malfunction can cause Friedreich's ataxia, a congenital neurodegenerative disease. Frataxin plays a critical role in mitochondrial iron metabolism. A lack of this protein leads to cellular iron overload. ATAD3 is another human mitochondrial protein that is suspected to be involved in the mitochondrial iron metabolism. Both proteins have a mitochondrial localization. In addition, possible influence on hem metabolism in the human system was postulated for both proteins.

Caenorhabditis elegans is a well-established model organism that was first described by S. Brenner in 1974. Several of its proteins show a high level of sequence identity with their homologous counterparts in humans. It is suitable for studying singular proteins and their mode of action. In the present work, the homologous proteins ATAD-3 and Frataxin were studied with regard to the questions of (1.) which role they play in the iron and hem metabolism and (2.) whether iron chelators or flavonoids have an effect on increased iron levels in *C. elegans*.

RNA-mediated interference (RNAi) was used to inactivate the proteins in *C. elegans*. The iron uptake of modified worms – compared to a control group of unmodified worms – was examined with Zn(II)-MesoporphyrinIX (ZnMp), a fluorescently labelled hemin analogue, in short-term (6h) and in long-term (1d) studies and quantified by measuring fluorescence. Additionally, direct iron and hemin measurements were performed with Iron Colorimetric Assay Kit K 390 (BioVision, Inc.) and Hemin Assay Kit, Kat. Nr. MAK036 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). It was examined whether inactivation of the proteins led to higher concentrations of iron in the nematodes. Fecundity assays were used to study fertility and development of the RNAi-worms.

In both the short-term (6h) and long-term (1d) experiments, ZnMp assays indicated an increase in fluorescence for *frh*(RNAi) compared to the control group, but this could not be shown analogously for *atad-3*(RNAi). The direct measurement of iron in the worm lysate had its methodological limitations and did not yield any usable results. In the hemin assays, a significant increase in hemin for *atad-3*(RNAi) in the worm lysate was detected. The development of the worms that are *atad-3*-deficient was significantly reduced. They remain in larval stage L1 to L2 and show no reproductive tendency. Adding deferoxamine and the flavonoids quercetin and myricetin showed no rescue effect in *atad-3*(RNAi).

These results indicate that both proteins play an important role in the iron and hemin metabolism of *C. elegans*. Disabling them leads to an increase in iron in the worm with signs of toxicity. Deferoxamine, quercetin and myricetin as iron binders show no therapeutic effect.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp.	Ampicillin
ATAD3	humanes mitochondriales Protein aus der Familie der ATPasen
ATAD-3	homologes mitochondriales Protein aus der Familie der ATPasen bei <i>C. elegans</i>
atad-3	Genequenz für das Protein ATAD-3
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl₂	Kalziumchlorid
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cm	Zentimeter
con	Kontrolle
d	Tag(e)
DF	Deferoxamin Mesylate Salt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d. h.	das heißt
dH₂O	destilliertes Wasser
ddH₂O	bidestilliertes Wasser (s. MQ Wasser)
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i> , doppelsträngige Ribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>

EtOH	Ethanol
FAC	<i>Ferric ammonium citrate</i>
Fe, Fe²⁺, Fe³⁺	Eisen und Eisenoxidationsstufen
fg	Femtogramm
fmol	femtomol
FRDA	Friedreich Ataxie
frh	Genssequenz für das Protein Frataxin
FUDR	5-Fluoro-2'-deoxyuridine
g	Gramm
h	Stunde(n)
H₂O	Wasser
HT115	Bakterienstamm <i>E. coli</i> für RNAi
IMM	Innere Mitochondrienmembran
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
K₂HPO₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
L1 - L4	Larvalstadien 1 bis 4 von <i>C. elegans</i> (s. auch Abb.3)
LB	<i>lysogeny broth</i> , Luria-Bertani Medium
LHON	Lebersche hereditäre Optikusneuropathie
Lsg.	Lösung
M	mol/Liter
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> , Polylinker
MG	Molgewicht
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
MgSO₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure

MQ	Milliquwasser, bidestilliertes H ₂ O
mRNA	<i>messenger ribonuclein acid</i> , Botenribonukleinsäure
MSME	Lösung aus 220 mM Mannitol + 70 mM Sucrose + 5 mM MOPS + 2 mM EDTA, pH 7.4
MRT	Magnetresonanztomografie
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
N2	<i>C. elegans</i> Wildtyp Stamm N2 (Varietät Bristol)
N₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxyd
NaOCl	Natriumhypochlorid
nDNA	nukleäre Desoxyribonukleinsäure
NGM	<i>nematode growth medium</i>
NH₄OH	Ammoniumhydroxid
NF-κB	Nukleärer Faktor κB, Transkriptionsfaktor
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
Nr.	Nummer
n. t.	<i>no treatment</i>
OD	optische Dichte
o. g.	oben genannt
OH	Hydroxid
OMM	äußere Mitochondrienmenbran
oN	<i>overnight</i> , über Nacht
ORPHA95	Orpha-Kennnummer für die Friedreich Ataxie im europäischen Referenz-Portal für Informationen über seltene Erkrankungen, Orphanet
OXPHOS	Oxydative Phosphorylierung
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatge-pufferte Salzlösung
PC	Computer
pH	potentia Hydrogenii

PIC	<i>Complete Mini Proteasen Inhibitor</i>
RM	<i>reaction mix</i> , Reaktionsgemisch
RNA	<i>ribonuclein acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAi	<i>ribonuclein acid induced interferens</i> , Ribonukleinsäure- vermittelte Interferenz
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
T3	3. Tochtergeneration
s	Sekunde
s.	siehe
Tab.	Tabelle
Tet.	Tetracyclin
u. a.	unter anderem
u. a. m.	und anderes mehr
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
Vol	Volumen
V/V	<i>Volume to volume</i>
Wp	Wurmpellet
WT	Wildtyp
YFH1	<i>yeast frataxin homolog</i>
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZnMp	Zink (II)-Mesoporphyrin IX

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Hintergrund – Mitochondriopathien	4
1.2. Friedreich Ataxie als Beispiel für mitochondriale Veränderungen bei neurodegenerativen Erkrankungen.....	5
1.3. Eisen- und Hämstoffwechsel.....	6
1.3.1. Eisen.....	6
1.3.2. Mitochondriale Proteine ATAD3 und Frataxin	7
1.4. <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus	9
2. Ziele der Arbeit.....	14
3. Material und Methoden	16
3.1. Zellbiologische Methoden.....	16
3.1.1. <i>Caenorhabditis elegans</i> und seine Haltung.....	16
3.1.2. Herstellung der Glycerol-Stocks.....	16
3.1.3. Wurmhaltung auf angereicherten NGM-Platten (OP50-Platten)	16
3.1.4. Herstellung der Feeding-Platten	17
3.1.5. RNA vermittelte Interferenz (RNAi).....	17
3.1.5.1. RNAi Gensequenzen	18
3.1.6. Wurmpreinigung und Synchronisation	18
3.1.6.1. 4 h-Synchronisation	19
3.1.6.2. Chemische Synchronisation	19
3.2. Assays	20
3.2.1. Zink-Mesoporphyrin (ZnMp)-Assays	21
3.2.1.1. Präparation von ZnMp	22
3.2.1.2. Präparation von Hämin	22
3.2.1.3. Vorbereitung der Feeding-Platten	22
3.2.1.4. Herstellung von Agarose-beschichteten Objektträger zur Fluoreszenzmikroskopie.....	22
3.2.1.5. Fluoreszenz-Mikroskopie und Bildverarbeitung	23
3.2.2. Eisen- und Häminmessung	23
3.2.2.1. Herstellung von Wurmpellets für biochemische Assays.....	23
3.2.2.2. Erstellen einer Standard-Eichreihe zur Messung des Proteingehaltes einer Probe mit dem Bicinchoninsäure(BCA)-Protein-Assay-Kit (Thermo Scientific Pierce).....	25
3.2.3. Messung des Eisengehalts der Würmer	26
3.2.3.1. Herstellung eines Lysats	26

3.2.3.2.	Proteinbestimmung im Lysat	26
3.2.3.3.	Eisen-Assay	27
3.2.4.	Hämin-Assay	28
3.2.5.	Fecundity-Assays	29
3.2.6.	Assays mit Eiseninaktivatoren.....	30
3.2.6.1.	Deferoxamin.....	30
3.2.6.2.	Quercetin	31
3.2.6.3.	Myricetin	33
3.3.	Statistische Auswertung.....	34
4.	Ergebnisse.....	35
4.1.	ZnMp-Assays mit <i>atad-3</i> (RNAi).....	35
4.1.1.	Kurzzeitassay (6 h)	35
4.1.2.	Langzeitassay (1 d).....	37
4.2.	ZnMp-Assays mit <i>frh</i> (RNAi)	38
4.2.1.	Kurzzeitassay (6 h).....	38
4.2.2.	Langzeitassay (1 d).....	40
4.2.3.	Vergleich der <i>atad-3</i> (RNAi) und <i>frh</i> (RNAi).....	42
4.3.	Eisen-Assays	44
4.4.	Hämin-Assays.....	45
4.5.	Fecundity-Assays	47
4.6.	Assays mit Eiseninaktivatoren.....	49
4.6.1.	Deferoxamin	49
4.6.2.	Quercetin	51
4.6.3.	Myricetin	53
5.	Diskussion der Ergebnisse	55
5.1.	Die Ausschaltung des <i>atad-3</i> Gens durch RNAi führt zu einem erhöhten Hämingehalt in <i>C. elegans</i>	55
5.2.	Die Ausschaltung des <i>frh</i> -Gens durch RNAi führt in <i>C. elegans</i> zu einer erhöhten Fluoreszenz im ZnMp-Assay	56
5.3.	Die Ausschaltung des Gens <i>atad-3</i> führt zu einer starken Reduktion des Legeverhaltens.....	57
5.4.	Die Gabe von Eisenchelatoren oder Radikalfängern (Flavonoide) führt zu keiner Erholung des Legeverhaltens in <i>atad-3</i> (RNAi) und <i>frh</i> (RNAi)	58
5.5.	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse.....	61
5.6.	Methodendiskussion und Limitationen.....	61
5.6.1.	ZnMp-Assays.....	62
5.6.2.	Eisen-Assay.....	64

5.6.3. Zusammenfassung der Limitationen	64
6. Schlussfolgerung und Ausblick.....	65
7. Literatur- und Quellenverzeichnis.....	66
Anhang	72
1. Chemikalien, Materialien, Geräte und Software.....	72
1.1. Verbrauchskemikalien	72
1.2. Allgemeine Geräte	72
1.3. Kit-Systeme	72
1.4. Mikroskopie.....	72
1.5. Sonstige Materialien	73
1.6. Bakterienstämme.....	73
1.7. Vektor.....	73
2. Standardverfahren in der Haltung von <i>C. elegans</i>.....	74
2.1. Herstellung der angereicherten NGM-Platten (OP50-Platten).....	74
2.2. Herstellung der Feeding-Platten.....	75
2.3. Herstellung der Glycerol-Stocks	76
2.4. Herstellung von LB-Amp/Tet Agarplatten mit Einzelkolonien der HT115 Feeding-Klone	76
Danksagung	77

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

- Abb. 1a:** Schematische Darstellung von *C. elegans* (modifiziert nach www.wormatlas.org)
- Abb. 1b:** *C. elegans* unter dem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop (20 x Objektiv)
- Abb. 2:** Lebenszyklus von *C. elegans* (modifiziert nach www.wormatlas.org)
- Abb. 3:** Schematische Darstellung der RNAi mit atad-3 (Bsp.) als Zielsequenz
- Abb. 4:** Struktur- und Summenformel und Molekulargewicht von Zink-Mesoporphyrin (<https://frontierspecialtychemicals.com/>)
- Abb. 5:** Struktur- und Summenformel und Molekulargewicht von Deferoxamin (<https://www.sigmaaldrich.com/DE/de>)
- Abb. 6:** Struktur- und Summenformel und Molekulargewicht von Quercetin (<https://www.sigmaaldrich.com/DE/de>)
- Abb. 7:** Struktur- und Summenformel und Molekulargewicht von Myricetin (<https://www.sigmaaldrich.com/DE/de>)
- Abb. 8:** Gemessene Fluoreszenz der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (con) 6 h nach Gabe von 40 µM Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin im Vergleich zu Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 µM, 10 µM und 20 µM
- Abb. 9:** Vergleich der Fluoreszenz der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) in Prozentwerten 6 h nach Gabe von 40 µM Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin und Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 µM, 10 µM und 20 µM
- Abb. 10:** Gemessene Fluoreszenz der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (con) 1 d nach Gabe von 40 µM Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin im Vergleich zu Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 µM und 10 µM
- Abb. 11:** Vergleich der Fluoreszenz der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) in Prozentwerten 1 d nach Gabe von 40 µM Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin und Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 µM und 10 µM

- Abb. 12:** Gemessene Fluoreszenz der Frataxin (RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (frh) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (con) 6 h nach Gabe von 40 μ M Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin im Vergleich zu Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μ M und 10 μ M
- Abb. 13:** Vergleich der Fluoreszenz der Frataxin (RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (frh) in Prozentwerten 6 h nach Gabe von 40 μ M Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne Hämin und Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μ M und 10 μ M
- Abb. 14:** Gemessene Fluoreszenz der Frataxin (RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (frh) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (con) 1 d nach Gabe von 40 μ M Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin im Vergleich zu Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μ M und 10 μ M
- Abb. 15:** Vergleich der Fluoreszenz der Frataxin (RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (frh) in Prozentwerten 1 d nach Gabe von 40 μ M Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin und Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μ M und 10 μ M
- Abb. 16:** Vergleich der Fluoreszenz der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) mit den Frataxin (RNAi) modifizierten Tieren (frh) in Prozentwerten 6 h nach Gabe von 40 μ M Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin und Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μ M und 10 μ M
- Abb. 17:** Vergleich der Fluoreszenz der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) mit den Frataxin (RNAi) modifizierten Tieren (frh) in Prozentwerten 1 d nach Gabe von 40 μ M Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin und Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μ M und 10 μ M
- Abb. 18:** Gesamtauswertung der durchgeführten Eisenassays (Iron Colorimetric Assay Kits (Iron Colorimetric Assay Kit K 390, Biovision, Inc.), Darstellung der Messergebnisse für Fe^{2+} , Fe^{3+} und $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ in Wurmlysaten von atad-3(RNAi) und Kontrollen. Alle Proben wurden doppelt geführt (Probe 1 und 2)

- Abb. 19:** Gesamtauswertung der durchgeführten Häminassays (Hemin Assay Kit, (Cat. Nr. MAK036, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Darstellung der Messergebnisse für die doppelte geführten atad-3-Proben (Probe 1 bzw. Probe 2) und die dazugehörigen Kontrollen (con Probe 1 bzw. con Probe 2) in fg Hämin/ μ g Protein.
- Abb.20** Hämingehalt der doppelte geführten atad-3-Proben (Probe 1 bzw. Probe 2) im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollen (con Probe 1 bzw. con Probe 2) in Prozent. Der Durchschnittswert der unbehandelten Kontrolltiere (con) wurde auf 100% gesetzt.
- Abb. 21:** Anzahl der Embryonen der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (con) über 4 d auf Feeding-Platten
- Abb. 22:** Gesamtzahl aller Embryonen der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (con) über 4 d auf Feeding-Platten
- Abb. 23:** Gesamtzahl aller Embryonen der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) im Vergleich zu Kontrolltieren (con) nach 3 d ohne Behandlung (No Treatment) und unter der Gabe von Deferoxamin in den Konzentrationen 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M
- Abb. 24:** Vergleich der Anzahl der Embryonen der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) in Prozent 3 d ohne Behandlung (No Treatment) und unter der Gabe von Deferoxamin in den Konzentrationen 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M
- Abb. 25:** Gesamtzahl aller Embryonen der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) und Frataxin (RNAi) modifizierten Tiere (frh) jeweils im Vergleich zu Kontrolltieren (con) nach 3 d ohne Behandlung (No Treatment) und unter der Gabe von 100 μ M und 200 μ M Quercetin
- Abb. 26:** Vergleich der Anzahl der Embryonen der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) und Frataxin (RNAi) modifizierten Tiere (frh) in Prozent nach 3 d ohne Behandlung (No Treatment) und unter der Gabe von 100 μ M und 200 μ M Quercetin
- Abb. 27:** Gesamtzahl aller Embryonen der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) und Frataxin (RNAi) modifizierten Tiere (frh) jeweils im Vergleich zu Kontrolltieren (con) nach 3 d ohne Behandlung (No Treatment) und unter der Gabe von 100 μ M und 200 μ M Myricetin

Abb. 28: Vergleich der Anzahl der Embryonen der *atad-3*(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (*atad-3*) und Frataxin (RNAi) modifizierten Tiere (*frh*) in Prozent nach 3 d ohne Behandlung (No Treatment) und unter der Gabe von 100 μ M und 200 μ M Myricetin

Tabellen

Tab. 1: Ansätze für eine Pierce BCA–Standard Reihe

Tab. 2: Zusammensetzung der Reaktionsgemische für Häm-in-Assay (Sigma-Aldrich)

1. Einleitung

Ein physiologischer Eisen- und Hämstoffwechsel ist für das Funktionieren der Zellen im menschlichen Organismus unerlässlich. Beide spielen bei der Zellproliferation und dem Überleben von Zellen eine wichtige Rolle. Störungen in diesen Signalwegen haben gravierende Auswirkungen auf den gesamten Organismus. Sowohl ein Zuwenig (Eisenmangelzustände) als auch ein Zuviel (Eisenüberladung der Zellen) ist gleichermaßen schädlich. Es gibt ein weites Spektrum verschiedener Erkrankungen einzelner Organsysteme des Menschen, die ursächlich auf eine Störung des Eisenstoffwechsels zurückzuführen sind. Zu nennen sind hier als Beispiele u. a. die hereditäre Hämochromatose, bei der es durch eine Überladung des Organismus mit Eisen zu lebensbedrohlichen Organschäden kommt, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und die Endometriose. Auch verschiedene Krebsarten werden mit einer Dysregulation des Eisenstoffwechsels in Verbindung gebracht (Kaluza et al., 2014).

Auf der zellulären Ebene führt eine Eisenüberladung zu oxidativem Stress. Der Begriff „Oxidativer Stress“ beschreibt ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung von reaktionsfreudigen Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*; ROS) und deren Abbau durch zelluläre Schutzsysteme (Sies, 1993). Das dabei entstehende Übermaß an ROS kann zu Schädigung der DNA führen und eine Modifikation von zellulären Proteinen auslösen. Des Weiteren können ROS eine Lipidperoxidation verursachen. Bei diesem chemischen Prozess entstehen durch Elektronen-Abgabe an ROS Fettsäuren-Radikale. Diese lösen eine mehrstufige Kettenreaktion aus, die zur Schädigung der Zellmembran und sekundär zum Zelluntergang führen kann (Jomova et al., 2011). Die durch ROS ausgelösten Prozesse können zu einer chronischen Entzündungsreaktion im Gewebe führen und hierüber auch kanzerogen wirken (Cross et al., 2003, Knöbel et al., 2007, Ruder et al., 2014, Zhang et al., 2015).

ATAD3 ist ein humanes mitochondriales Protein und in den letzten Jahren zunehmend in den wissenschaftlichen Fokus geraten. Es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in seiner Expression mit verschiedenen Tumorerkrankungen des Menschen assoziiert sind. Zu nennen sind hier beispielsweise Adenokarzinome der Lunge, Cervixkarzinome, Prostatakarzinome und Karzinome im Kopf-Hals-Bereich (Chen et al., 2011, Fang et al., 2010, Huang et al., 2011, Li et al., 2012, Schaffrik et al., 2006). Als Ursache wird vermutet, dass ATAD3 die Apoptose, d. h. den programmierten

Zelltod, stört und durch diese anti-apoptotische Wirkung unkontrolliertes Zellwachstum unterstützt. Es gibt Hinweise, dass ATAD3 an der Organisation von Nucleoiden in menschlichen Mitochondrien beteiligt ist (He et al., 2007).

Insbesondere die Arbeiten von He und Mitarbeitern zur Isolierung und Charakterisierung menschlicher mitochondrialer Nucleoide haben die Bedeutung von ATAD3 auf die mitochondriale Proteinbiosynthese in den Fokus wissenschaftlichen Interesses gerückt (He et al., 2012). Es konnte mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Messmethoden gezeigt werden, dass das Protein ATAD3 in den humanen Mitochondrien lokalisiert und mit den mitochondrialen Nucleoiden assoziiert ist. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass ATAD3 eine Rolle bei der mitochondrialen Translation oder dem RNA-Metabolismus spielen könnte. Durch experimentelle Ausschaltung von ATAD3 konnte eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Proteinbiosynthese beobachtet werden (He et al., 2012).

Es gibt Hinweise darauf, dass die in den Mitochondrien lokalisierte Proteine eine wichtige Rolle in der Häm- und Eisenhomöostase spielen (Swenson et al., 2020, Dutt et al., 2022). Dysfunktionen in diesen Stoffwechselwegen scheinen auch ein pathophysiologischer Aspekt bei Entstehung von Tumoren zu sein (Was et al., 2010, Wang et al., 2010, Van den Ecker et al., 2015). Inwieweit diese Prozesse durch das Protein ATAD3 mit beeinflusst werden, wurde bisher noch nicht untersucht.

Die Rolle des Proteins Frataxin – ein Protein der inneren Mitochondrienmembran humaner Mitochondrien – im menschlichen Eisenstoffwechsel ist hingegen deutlich besser untersucht. Es konnte in *in vitro*-Untersuchungen gezeigt werden, dass eine Ausschaltung des Frataxin-Gens zu einer Überladung der Mitochondrien mit Eisenionen führt (Pandolfo, 1998). In Form freier Ionen ist Eisen toxisch und führt zu Veränderungen auf zellulärer Ebene. Die neurodegenerative Erkrankung Friedreich-Ataxie kann heute ursächlich mit einem Frataxin-Mangel in Verbindung gebracht werden (Campuzano et al., 1996, 1997).

Interessanterweise sind die den Eisenstoffwechsel regulierenden Gene und Stoffwechselfade neben dem Menschen in verschiedenen Spezies in ähnlicher Weise präsent (Anderson et al., 2014). Diese evolutionäre Stabilität des Eisenstoffwechsels ermöglicht eine experimentelle Untersuchung in geeigneten

Modellorganismen und erlaubt Rückschlüsse und den Vergleich mit dem humanen System. Unter dieser Voraussetzung wurde für die Experimente dieser Arbeit der Modellorganismus *C. elegans* gewählt, der mit ATAD-3 und Frataxin zwei Homologa zu den humanen Proteinen besitzt.

In dieser Arbeit werden die Wirkungen der beiden mitochondrialen Proteine ATAD-3 und Frataxin auf die Eisen- und Hämhomöostase im Mitochondrium untersucht. Als *in vivo*-Modell für die durchgeführten Versuche wurde der Nematode *Caenorhabditis elegans* gewählt, ein gut untersuchter und im Labor etablierter Modellorganismus. *C. elegans* besitzt in seinen Mitochondrien das Protein Frataxin und mit ATAD-3 ein Homolog hoher Sequenzidentität zum ATAD3 humaner Mitochondrien. Hoffmann et al. konnten zeigen, dass die Gensequenz F54B3.3 das Homolog des humanen Proteins ATAD3 in *C. elegans* kodiert (Hoffmann et al., 2009). Die RNA vermittelte Interferenz (RNAi) ist ein etabliertes molekularbiologisches Verfahren zur Inaktivierung bestimmter Genabschnitte (Timmons, 1998). Für das Protein ATAD-3 wurde die RNAi Gensequenz *atad-3* (F54B3.3) und für Frataxin die Sequenz *frataxin(frh)* Variante IV verwendet. Mit Hilfe der RNAi wurden die für diese beiden Proteine codierenden Gensequenzen gezielt ausgeschaltet und so modifizierte *C. elegans* Populationen erzeugt, die dieses Protein nicht exprimierten. Es wurde untersucht, welche Auswirkung diese Proteindefizienz auf den Eisenstoffwechsel des Wurmes hat.

Die Eisenhomöostase in *C. elegans* ist eng mit dem Häm-Metabolismus verbunden. Studiert wurde sowohl die Eisen- und Hämaufnahme als auch der Eisengehalt im Wurmlysat, bzw. in den Mitochondrien als Zellkompartiment, in dem die beiden untersuchten Proteine lokalisiert sind. In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die erhöhten Eisenkonzentrationen in den RNAi-Würmern mit Hilfe von Eisenchelatoren (Deferoxamin) und Antioxidantien (Flavonoide Myricetin und Quercetin) vermindert oder aufgehoben werden kann. In der Therapie mitochondrialer Erkrankungen werden heutzutage in Abhängigkeit der zugrundeliegenden Defekte neben symptomatischen Therapieansätzen auch kausal orientierte interventionelle therapeutische Prinzipien verfolgt, u.a. antioxidative Strategien (Kornblum et al., 2021).

Das Verständnis der Mechanismen des Eisen- und Hämtransports in dem Modellorganismus *C. elegans* kann Einblicke in menschliche Störungen des Häm-Metabolismus ermöglichen und Anstöße für die Entwicklung neuer Therapieoptionen

geben.

1.1. Hintergrund – Mitochondriopathien

Mitochondriopathien sind selten vorkommende, meist genetisch bedingte Erkrankungen des Menschen, die ihre Ursache in einer Fehlfunktion der Mitochondrien haben. In der Regel sind hierfür fehlende oder fehlerhaft ausgebildete mitochondriale Proteine verantwortlich, die eine Störung der verschiedenen Stoffwechselprozesse verursachen. Diese Defekte führen zu einem weiten Spektrum klinischer Phänotypen. Die Krankheitssymptome manifestieren sich typischerweise im Bereich energieintensiver Organsysteme, wie dem Nervensystem und dem Muskelapparat, und führen nicht selten zu einer deutlich reduzierten Lebenserwartung. Die Behandlung erfolgt symptomorientiert, eine Heilung ist aktuell nicht möglich.

Die Heterogenität der Mitochondriopathien in ihrem klinischen Erscheinungsbild macht eine einheitliche Klassifizierung schwierig. Die für eine Erkrankung ursächlichen Mutationen werden häufig autosomal-rezessiv vererbt. Theoretisch ist aber jeder Erbgang denkbar (Klopstock et al., 2021).

Als Besonderheit verfügen Mitochondrien als einzige Zellorganellen über eine eigene mitochondriale DNA (mtDNA), bestehend aus 16. 569 Basenpaaren. Sie kodiert mit 37 Genen für Strukturproteine der Atmungskette (13), ribosomale RNAs (2) und Transfer-RNAs (22). Mutationen der mtDNA werden ausschließlich maternal vererbt, da bei der Befruchtung einer Eizelle die im Spermium enthaltenen Mitochondrien eliminiert werden (Klopstock et al., 2021). Die Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA) können in ihrem klinischen Bild verschiedenste Ausprägungen zeigen. Im Jahr 1988 konnten erstmals drei definierte pathogene Mutationen der mtDNA und der dadurch verursachten Funktionsstörung im Komplex I der Atmungskette einer bestimmten neurologischen Erkrankung zugeordnet werden: die ausschließlich maternal vererbten Lebersche hereditäre Optikusneuropathie (LHON) (Wallace et al., 1988). Durch die zunehmend differenzierten diagnostischen Möglichkeiten sind bisher krankheitsverursachende Defekte auf über 400 Genen beschrieben. Die exakte Lokalisation eines genetischen Defektes ist bei Mitochondriopathien für die Diagnosefindung und Therapie wie auch die Beratung Betroffener und ihrer Familien von großer Bedeutung (Klopstock et al., 2021).

1.2. Friedreich Ataxie als Beispiel für mitochondriale Veränderungen bei neurodegenerativen Erkrankungen

Die Friedreich-Ataxie (FRDA), erstmals durch den Pathologen Nicolaus Friedreich 1863 (Friedreich, 1863) beschrieben, ist eine neurodegenerative Erkrankung mit autosomal-rezessivem Erbgang. Der ursächliche Gendefekt wurde 1996 entdeckt und auf dem langen Arm von Chromosom 9, Genlocus: 9q13-21.1 identifiziert (Campuzano et al., 1996, 1997). Die FRDA gehört zu den seltenen Erkrankungen und hat eine geschätzte Prävalenz von etwa 1: 50.000 (www.orpha.net, ORPHA95). Die Symptome betreffen insbesondere das Nervensystem (Ataxie, Dysarthrie, Demenz u. a.) und das muskuloskeletale System (Bewegungsstörungen, Muskelatrophien, Skoliose, Pes cavus „Friedreich Fuß“ u. a. m.). Gehäuft treten assoziiert auch Diabetes mellitus, die Atrophie des Sehnervs und hypertrophe Kardiomyopathien auf, letztere sind lebenslimitierend. Der Krankheitsverlauf ist progredient, eine Heilung ist bislang nicht möglich.

Heute weiß man, dass die klinischen Symptome der FRDA Folge eines Frataxin-Mangels sind (Campuzano et al., 1996, 1997). Frataxin ist ein mitochondriales Protein, das sich beim Menschen hauptsächlich im zentralen Nervensystem in den Zellen des Kleinhirns und in den Motoneuronen findet, aber auch in den Zellen von Pankreas und Herzmuskel. Frataxin-Mangel bewirkt eine Störung des Eisenstoffwechsels in den Mitochondrien und führt zu einer Überladung der Zellorganellen mit freien Eisenionen. In Muskelbiopsien von FRDA-Patienten lassen sich histologisch erhöhte Eisen-Werte nachweisen (Payne et al., 2012). Therapeutische Ansätze bei der FRDA versuchen den oxidativen Stress durch frühes Abfangen der toxisch wirkenden freien Radikale mittels verschiedener Antioxidantien zu verringern und dadurch die mitochondriale Funktion zu verbessern. In Pilotstudien von Lodi et al. (2002) zeigten FRDA-Patienten nach Gabe von Coenzym Q10 und Vitamin E nach drei bis sechs Monaten eine verbesserte ATP-Produktion in der Skelettmuskulatur und im Herzen. Eine antioxidative Therapie mit Coenzym Q10 und Vitamin E über 47 Monate führte zu verbesserter Bioenergetik und Herzfunktion bei zehn FRDA-Patienten (Hart et al. 2005). Studien zur Wirkung von Eisenchelatoren als eine Therapieoption der mitochondrialen Eisenüberladung zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Boddaert et al. (2007) konnten für den Eisenchelator Deferipron nach oraler Gabe eine Reduktion von

Eisen im Nucleus dentatus cerebellaris mittels MRT-Messung bei FRDA-Patienten nachweisen. In einer 6-monatigen randomisierten placebokontrollierten Doppelblindstudie zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von Deferipron bei FRDA wurden hämatotoxische Effekte und eine Verschlechterung der Ataxie beobachtet (Pandolfo et al., 2014).

1.3. Eisen- und Hämstoffwechsel

1.3.1. Eisen

Eisen (Fe) ist für den Menschen ein lebensnotwendiges Element. Es ist für die Blutbildung essentiell und Bestandteil vieler Enzyme im menschlichen Körper. In den roten Farbstoff Häm ist es als zentrales Ion in ein Porphyrin-Molekül eingebaut und Bestandteil des Hämoglobins. Auch das im Muskel lokalisierte Protein Myoglobin enthält große Mengen Häm. Eisen liegt im menschlichen Körper in den Oxidationsstufen Fe^{2+} und Fe^{3+} vor. Es ist aufgrund seiner chemischen Struktur ein sehr reaktionsfreudiges Molekül. Diese Eigenschaft ermöglicht es, die Aufgaben von Sauerstofftransport und Sauerstoffspeicherung wahrzunehmen. Eisen findet sich auch in den Komplexen der Atmungskette in den Mitochondrien (z.B. als Eisen-Schwefel-Cluster) (Koleini et al., 2021, Dutt et al., 2022).

Mit dem Begriff der Eisenhomoöstate wird ein dynamisches Gleichgewicht der an der Eisenaufnahme und Eisenverstoffwechslung beteiligten Komponenten in einem Organismus beschrieben. Ziel ist die Aufrechterhaltung weitgehend konstanter Verhältnisse in einem offenen System, um so seine Funktionsweise sicherzustellen. Die Eisenhomoöstate ist eng mit dem Hämstoffwechsel verbunden. Ein funktionierender Eisenhaushalt und, daran gekoppelt, Hämstoffwechsel sind von entscheidender Bedeutung für eine einwandfreie Funktion einer Zelle im Organismus. Der Häm-Stoffwechsel ist abhängig von der Eisenaufnahme in den Körper und funktionierenden Resorptions- und Transportwegen, da Eisen als essentielles Spurenelement mit der Nahrung dem menschlichen Organismus zugeführt werden muss.

Die Eisen-Aufnahme aus der Nahrung und der Transport von Eisen im menschlichen Körper erfolgt durch spezialisierte Transport- und Speicherproteine (v.a. Ferritin und Transferrin). Über die Enterozyten der Duodenalschleimhaut und des oberen

Jejunums wird das mit der Nahrung aufgenommene Eisen resorbiert. Eisen wird zum einen in Form freier zweiwertiger Eisenionen (Fe^{2+}) oder wasserlöslicher Fe^{2+} -Chelatkomplexe aufgenommen, zum anderen erfolgt die Aufnahme als lipophiler Porphyrin-Eisen-Komplex (Gao et al., 2019, Dutt et al., 2022). Die Regulation der Eisen-Aufnahme wird durch das in der Leber produzierte Protein Heparin übernommen (Nicolas et al., 2002). Ein fein austariertes Gleichgewicht zwischen den beteiligten Mitspielern sichert einen funktionierenden Eisen- und Energiestoffwechsel im menschlichen Körper.

1.3.2. Mitochondriale Proteine ATAD3 und Frataxin

Für die Regulation mitochondrialer Prozesse spielen die Proteine ATAD3 und Frataxin eine wichtige Rolle. Beide sind auf der inneren Mitochondrienmembran humaner Mitochondrien lokalisiert. In der Literatur ist eine mögliche Beeinflussung des Eisen- und Häm-Metabolismus durch diese Proteine für das humane System beschrieben (Was et al., 2010, Wang et al., 2010).

ATAD3 gehört zur Familie der ATPasen und ist ein AAA Protein (**A**TPase **a**ssoziiert mit verschiedenen zellulären **A**ktivitäten). Es ist ein ubiquitäres Protein, das in den Mitochondrien von mehrzelligen Eukaryonten zu finden ist. Es wurde im Jahre 2003 erstmalig beschrieben. Gefunden wurde es bei der Untersuchung einer proteomischen Analyse von Mitochondrien aus Rattenlebern (Mootha et al., 2003). Seitdem ist man durch intensive Forschung dem Verständnis der physiologischen Funktionen von ATAD3 nähergekommen.

ATAD3 ist auf der inneren Mitochondrienmembran (IMM) lokalisiert (Bogenhagen et al., 2008, Da Cruz et al., 2003, Hoffmann et al., 2009). Der C-Terminus des Proteins (Carboxy-Terminus, enthält eine freie Carboxgruppe, COOH) ist an der Innenseite der IMM lokalisiert und dem Matrixraum zugewandt. Mit dem N-Terminus (Amino-Terminus, enthält eine freie Aminogruppe, NH_2) ragt es in den Intermembranraum zwischen IMM und OMM (Hubstenberger et al., 2010, Gilquin et al., 2010, Baudier, 2018). Aufgrund dieser membranübergreifenden Lokation wurde über die Einbindung in Stoffwechselforgängen zwischen Mitochondrienmatrix und Zytoplasma spekuliert (Li et al., 2012).

Beim Menschen besteht ATAD3 aus einem Cluster, der drei Paralogen mit weitgehender Sequenzhomologie enthält, ATAD3A, ATAD3B und ATAD3C. Die durch segmentale Duplikation entstandenen Gene sind im Tandem angeordnet (Gunning et al., 2020). Mutationen in ATAD3A und zwischen den ATAD3-Paralogen werden mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Harel et al., 2016, Desai et al., 2017, Gunning et al., 2020, Frazier et al., 2021). Sie betreffen häufig das Nervensystem mit Entwicklungsstörungen, Enzephalopathie und Kleinhirnatrophie (Harel et al., 2016; Cooper et al., 2017). Weitere klinische Symptome sind Kardiomyopathien und Hornhauttrübungen des Auges (Frazier et al., 2021). Auf Grundlage der Genomdiagnose bei Mitochondrienerkrankungen von über 500 Kindern aus Australien und Neuseeland kommen Frazier et al. zu dem Schluss, dass der ATAD3-Genlocus zu den fünf häufigsten gehört, die mit mitochondrialen Erkrankungen im Kindesalter in Verbindung gebracht werden können (Frazier et al., 2021).

Humanes ATAD3 ist in verschiedenen Tumoren überexprimiert, so z.B. in Adenokarzinomen der Lunge und Cervixkarzinomen. *In vitro* konnte es in Gliom-Zelllinien nachgewiesen werden (Chen et al., 2011, Fang et al., 2010, Hubstenberger et al., 2008). ATAD3 beeinflusst das Zellwachstum und die Apoptose. Es ist an der Synthese von Steroidhormonen beteiligt (Issop et al., 2015).

Der Nematode *C. elegans* besitzt mit ATAD-3 ein Homolog zum humanen ATAD3. Dieses Protein spielt bei der frühen Embryogenese von *C. elegans* und der Maus, *mus musculus*, eine entscheidende Rolle (Goller et al., 2013, Hoffmann et al., 2009). Wird die Expression von ATAD-3 in *C. elegans* unterdrückt, kommt es zu verzögertem Wachstum und Larvenarrest und einer hohen embryonalen Letalität. Trotz dieser vielfältigen Aspekte ist die genaue Funktion von ATAD3 im Mitochondrium nicht abschließend geklärt.

Frataxin ist ein nukleär codiertes mitochondriales Protein (Koutnikova, 1997, Priller, 1997) und befindet sich beim Menschen auf Chromosom 9q21.11 (www.orpha.net). Es wird aus 210 Aminosäuren gebildet und ist wie auch ATAD3 auf der IMM lokalisiert. Frataxin spielt beim mitochondrialen Eisenstoffwechsel eine wichtige Rolle und ist an der Biogenese von Proteinen mit Fe-S-Clustern beteiligt (Martelli und Puccio, 2014; Fox et al., 2019). Ein Frataxin-Mangel führt über die Beeinträchtigung der Fe-S-Cluster-Bildung zu erheblichen Störungen des mitochondrialen Stoffwechsels (Rotig

et al., 1997; Poburski et al., 2016). Durch *in vitro*-Untersuchungen an Hefezellen, die ein Frataxin-Homolog besitzen, konnte gezeigt werden, dass eine Ausschaltung des Frataxin-Gens zu einer erhöhten Eisenkonzentration in den Mitochondrien und einer erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativem Stress führt (Babcock et al., 1997, Foury et al., 1997, Koutnikova et al., 1997, Pandolfo, 1998). Die freien Eisen-Ionen fördern die Bildung toxisch wirkender freier Sauerstoffradikale (ROS) und lassen oxidativen Stress entstehen (Napier, 2005). Es gibt Hinweise, dass der durch Frataxin-Mangel verursachte oxidative Stress einer der Auslöser der Neurodegeneration bei der FRDA ist (Armstrong et al., 2010, Gomes et al., 2013).

1.4. *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* (lat. caeno-, griech. rhabdos = Stab, lat. elegans = fein) ist ein 1 mm langer, zur Gruppe der Rhabditia gehörender Fadenwurm, der ubiquitär in gemäßigten Klimazonen vorkommt. Er lebt nicht-parasitär im Boden, wo er sich von Bakterien ernährt. Unter optimalen Bedingungen hat dieser Wurm eine extrem kurze Generationszeit von nur drei Tagen und eine hohe Anzahl von Nachkommen (etwa 300-350 pro adultem Tier).

Erstmalig um 1900 von dem französischen Biologen Émile Maupas beschrieben (Maupas, 1900) wurde *C. elegans* seit Mitte der 60er-Jahre von Sydney Brenner intensiv erforscht. Seine Arbeiten trugen wesentlich dazu bei, dass *C. elegans* heute als ein prädestinierter Modellorganismus in vielen Bereichen der naturwissenschaftlichen Forschung (Neurowissenschaften, Genetik, Zell- und Entwicklungsbiologie, Physiologie u. a. m.) etabliert ist (Brenner, 1974).

C. elegans ist für das Studium einzelner Proteine und ihrer Wirkungsweise gut geeignet. Aufgrund einer hohen Sequenzidentität vieler Proteine zu ihren Homologa beim Menschen bietet es sich für Untersuchungen an. Mehr als 60 % der humanen Gene haben Homologe in *C. elegans* (Kuwabara, 1998). Die in den Mitochondrien von *C. elegans* lokalisierten Proteine ATAD-3 und Frataxin finden ihr humanes Homolog in den Proteinen ATAD3 und Frataxin.

Die Kultivierung von *C. elegans* im Labor ist sehr leicht und erfolgt auf Agarplatten, die mit einem Bakterienrasen aus *Escherichia coli* als Nahrungsquelle beimpft sind. Auch

Flüssigkulturen sind möglich. Die Entwicklung erfolgt in Abhängigkeit von der Temperatur und dauert zwischen 3,5 Tagen (20 °C) und 6 Tagen (15 °C). Die einfache Kultivierung, eine hohe Reproduktionsrate und kurze Generationszeiten erlauben das rasche Anzüchten von großen Wurmpopulationen. Eine Kryokonservierung über längere Zeiträume ist möglich (Lewis et al., 1995).

C. elegans kommt in zwei Formen vor: Als selbstbefruchtender Hermaphrodit und – sehr viel seltener – als Männchen (ca. 0,05 %). Ausschlaggebend hierfür ist die Anzahl der X-Chromosomen im adulten Tier. Hermaphroditen besitzen 12 Chromosomen, 5 Paare Autosomen und 2 XX-Geschlechtschromosomen. Geht ein X-Chromosom in der Entwicklung verloren, führt dies zur Ausbildung eines männlichen Nematoden (Hodgkin et al., 1977). Ein adulter Hermaphrodit erzeugt ca. 300-350 Nachkommen (Riddle et al., 1997).

Die Anatomie eines adulten Hermaphroditen ist einfach (Abb.1 a und 1 b). Der Körper ist unsegmentiert, zylindrisch und verjüngt sich zu den beiden Enden hin. Apikal befindet sich eine Mundöffnung mit Pharynx, am caudalen Ende liegt der Anus. Die äußere Körperhülle ist eine widerstandsfähige, dreischichtige Kollagen-Cuticula. Direkt darunter liegt die Hypodermis, gefolgt von der Körpermuskulatur und den Nervenzellen. Vier Muskelstränge ziehen sich als Längsbänder durch den Körper (Schierenberg, 1986) und ermöglichen durch abwechselnde Kontraktion und Relaxation eine wellenförmige Bewegung des Wurmes (Riddle, 1997). Im Inneren befindet sich das Pseudocoelom, eine mit Flüssigkeit gefüllte Höhle, die als Atmungs- und Kreislauforgan dient und durch den hydrostatischen Druck die Körperform des Wurmes aufrechterhält. In dieser Höhle liegt der Verdauungstrakt, gegliedert in die Abschnitte Pharynx, Darm und Hinterdarm und die Gonade. Der Darmtrakt beginnt hinter der Mundöffnung mit dem dreiteiligen Pharynx (Corpus, Isthmus, terminaler Bulbus). Durch Pumpbewegungen der Muskulatur nimmt der *C. elegans* seine Nahrung (Bakterien) auf. Diese wird im Bulbus des Pharynx zermahlen und über die pharyngeal-intestinale Klappe in den Darm weitergeleitet (White, 1988). Die Cuticula des Wurmes ist transparent, was einen einfachen Blick in das Wurminnere erlaubt. Diese Transparenz ist ein großer Vorteil, den *C. elegans* gegenüber anderen

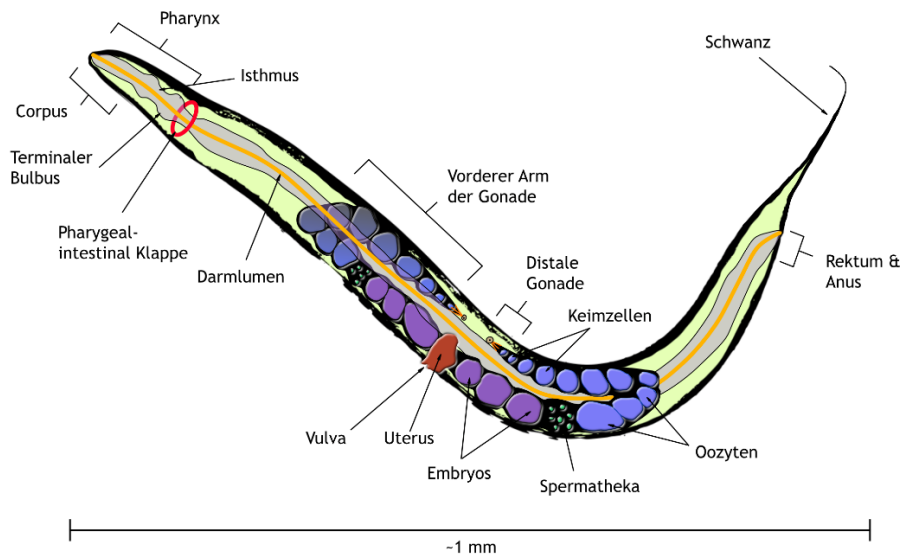


Abb. 1 a): Schematische Darstellung von *C. elegans* (modifiziert nach www.wormatlas.org)

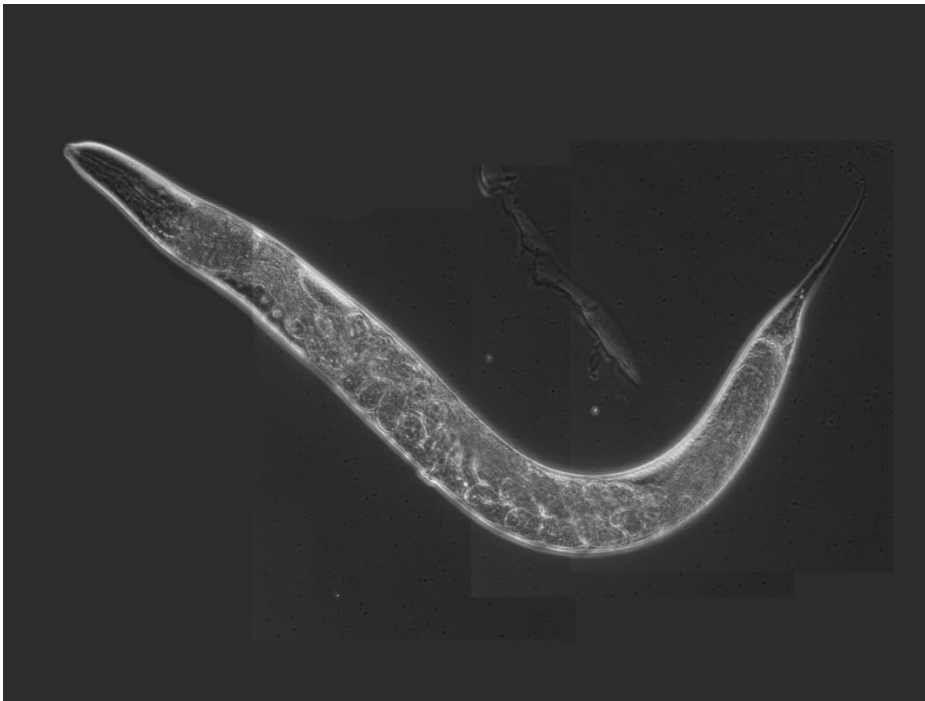


Abb. 1b): *C. elegans* unter dem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop (20 x Objektiv)

Modellorganismen hat. Entwicklungsstörungen von Organen und/oder Geweben können in den verschiedenen Phasen des Lebenszyklus direkt beobachtet werden, Fluoreszenz-gekoppelte Marker können appliziert und ihre Verteilungsmuster im Wurm

unter zeitlichen und räumlichen Aspekten beurteilt werden.

Bei der Entwicklung unterscheidet man die Embryogenese von der postembryonalen Entwicklung. Die Dauer der beiden Abschnitte hängt von der Temperatur ab. Unmittelbar nach der in utero Befruchtung beginnt die Proliferationsphase, in deren ersten 100 Minuten sich die fünf somatischen Gründerzellen AB, MS, E, C und D sowie die Keimbahnvorläuferzelle P4 durch inäquale Zellteilungen bilden (Labouesse, 1999, Sulston, 1983). Aus den Gründerzellen gehen die späteren Gewebe und Organe hervor, aus der Keimbahnvorläuferzelle die Gonaden. Es folgt die Eiablage und Morphogenese-Phase, bei der sich der Embryo durch Wachstum und Elongation in seiner Gestalt dem späteren adulten Wurm annähert. Der Wurm schlüpft und durchläuft anschließend die vier Larvalstadien L1-L4 der postembryonalen Entwicklung. Dabei kommt es zu Wachstum mit einer Erhöhung der Zellzahl von 558 Zellen zum Abschluss der Embryogenese auf 959 Zellen bei adulten Hermaphroditen und 1.031 bei adulten Männchen. Das Ende eines jeden Larvalstadiums ist durch eine Häutung des Wurmes gekennzeichnet.

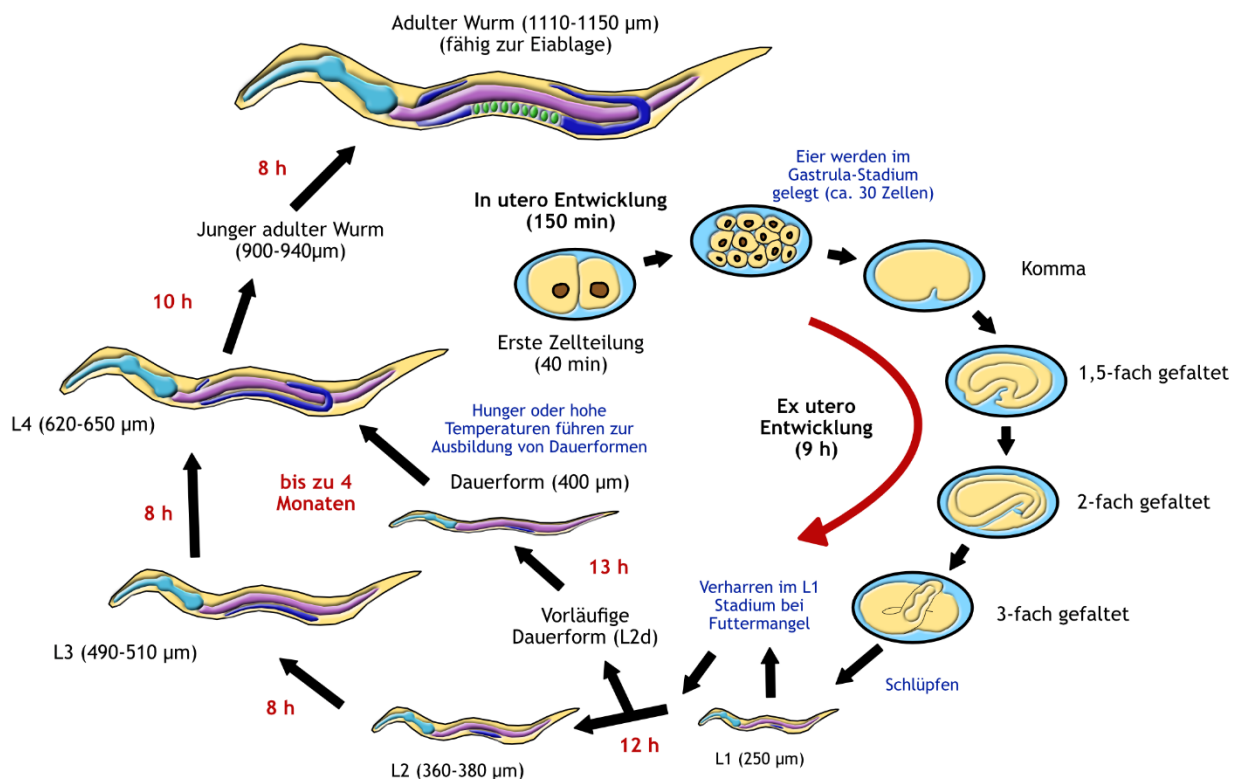


Abb. 2: Lebenszyklus von *C. elegans* (Hermaphroditen) bei 22 °C (modifiziert nach www.wormaltas.org)

Sind die Umgebungsbedingungen ungünstig (z.B. Nahrungsmangelsituation, hohe Populationsdichte), bildet *C. elegans* nach der zweiten Larvalhäutung eine Dauerform aus. Diese ist in der Lage, auch ohne Nahrung längere Zeit zu überleben. Normalisiert sich das Nahrungsangebot wieder, entwickeln sich die Dauerformen zu normalen L4-Larven weiter (Wood 1988).

2. Ziele der Arbeit

Die wissenschaftliche Fragestellung dieser Arbeit umfasst folgende Aspekte:

1. Welche Auswirkungen hat das Ausschalten der Proteine ATAD-3 und Frataxin durch RNAi auf den Eisenstoffwechsel des Nematoden *C. elegans*?
2. Hat die Gabe von Eisenchelatoren oder Antioxidantien einen Einfluss auf den Eisenstoffwechsel in *atad-3*(RNAi) bzw. *frh*(RNAi)?

Zur Beantwortung der ersten Frage wurden verschiedene Assays mit *C. elegans* durchgeführt, bei denen mit Hilfe von RNAi die Proteine ATAD-3 bzw. Frataxin ausgeschaltet wurden. Der Vergleich erfolgte in den durchgeführten Experimenten jeweils zu gesunden Kontrollwürmern. Eisen wurde *C. elegans* in verschiedenen Konzentrationen in Form von Hämin angeboten, das den Agarplatten zugesetzt wurde.

In einem ersten Schritt wurden ZnMp-Assays mit Messung von Fluoreszenz zur Visualisierung einer hypothetisch vermuteten Blockierung der Eisenaufnahme aus dem Darmlumen bei fehlender weiterer Verstoffwechslung durchgeführt. Gemessen wurde die Fluoreszenz in einem definierten Feld unmittelbar hinter der Pharyngealklappe des Wurmes. Eine Erhöhung der Fluoreszenz spricht für eine verminderte Aufnahme von Eisen aus dem Darmlumen und somit für eine Unterbrechung der Stoffwechselwege bei Ausschaltung der Proteine.

In einem zweiten Schritt wurde mit Hilfe von Hämin-Assays bzw. Eisen-Assays der Eisengehalt in den Würmern selbst quantifiziert. Die Untersuchungen erfolgten mit dem Hemin Assay Kit, Kat. Nr. MAK036, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA und dem Iron Colorimetric Assay Kit K 390 (BioVision, Inc.). Eine Erhöhung des Hämins bzw. der Eisenkonzentration im Wurm indiziert eine fehlende Verstoffwechslung.

Zur Untersuchung möglicher therapeutischer Effekte von Eisenchelatoren und Antioxidantien wurde der Eisenchelator Deferoxamin und die Flavonoide Myricetin und Quercetin eingesetzt. Deferoxamin bindet als Chelator Eisen direkt und sorgt für seine Inaktivierung, die Flavonoide wirken als Antioxidantien, fangen freie Radikale und reduzieren oxidativen Stress. Als Maß für die Erholung eines Wurmes wurde seine Fertilität gewählt. Die untersuchten Substanzen wurden in unterschiedlichen

Konzentrationen eingesetzt und mit Würmern ohne Behandlung verglichen. Auch hier wurden gesunde Würmer als Kontrollgruppe mitgeführt.

3. Material und Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. *Caenorhabditis elegans* und seine Haltung

Für die Experimente in dieser Arbeit wurde der Wildtyp Stamm N2 (Varietät Bristol) verwendet. Die Würmer wurden nach S. Brenner (Brenner, 1974) unter Standardbedingungen bei 18 °C bzw. 20 °C auf mit Hefe angereicherten Agarplatten, *nematode growth medium* (NGM)-Agar, gehalten. Der *E. coli* Stamm OP50, eine Uracil-Mangelmutante deren Wachstum ausschließlich auf angereicherte NGM-Platten beschränkt ist (Wormbook, maintenance of *C. elegans*), diente als Futterquelle. Die RNAi erfolgte auf Feeding-Platten, NGM-Agarplatten ohne Hefe, die darüber hinaus noch IPTG und zwei Antibiotika (Ampicillin und Tetracyclin) enthielten.

3.1.2. Herstellung der Glycerol-Stocks

Von beiden verwendeten Bakterienstämmen OP50 und HT115 wurden Glycerol-Stocks angelegt, aus denen bei Bedarf Bakterienkulturen zur Beimpfung der Platten hochgezogen wurden. Eine Beschreibung der Herstellung findet sich im Anhang.

Das Hochziehen der Bakterienkulturen für die Feeding-Platten erfolgte im Falle der Feeding-Klone durch Bakterienkolonien von LB-Amp/Tet-Platten. Im Gegensatz dazu wurden die OP50 Bakterienkulturen immer vom Glycerol-Stock aus angeimpft. Die Herstellung von LB-Amp/Tet-Agarplatten mit Einzelkolonien der HT115 Feeding-Klone ist im Anhang beschrieben.

3.1.3. Wurmhaltung auf angereicherten NGM-Platten (OP50-Platten)

Die Herstellung ist im Anhang I unter 2.1. im Detail mit den benutzten Zutaten beschrieben. *C. elegans* wurde auf diesen Platten bei 18 °C im Brutschrank gehalten und regelmäßig auf frische Platten umgesetzt.

3.1.4. Herstellung der Feeding-Platten

Die durch Fütterung vermittelte RNAi erfolgte auf Feeding-Platten. Die Herstellung der Feeding-Platten ist im Anhang beschrieben.

3.1.5. RNA vermittelte Interferenz (RNAi)

Um in *C. elegans* gezielt die für die Proteine ATAD-3 und Frataxin kodierenden Gensequenzen auszuschalten und so ihre Funktionsweise studieren zu können, wurde RNAi über Fütterung durchgeführt. Hierfür wurden *E. coli* HT115 als Nahrungsquelle verwendet. HT115 sind RNase III defiziente Bakterien mit einer durch IPTG induzierbaren T7-Polymerase Aktivität. Sie tragen die gewünschte Zielsequenz in Form einer cDNA in einen Vektor (pPD 129.36) in ihr Genom eingebaut. Diese Zielsequenz muss mindestens 21 Nucleotide besitzen, damit sie erkannt wird. Das IPTG führt in HT115 zu einer Aktivierung der T7-Polymerasen. Die zwischen zwei T7-Polymerase Bindungsstellen eingebaute Zielsequenz (hier: *atad-3* bzw. *frh*) wird in beide Richtungen abgelesen. Es entsteht in dem Bakterium HT115 eine doppelsträngige RNA der Zielsequenz, die von *C. elegans* über die Zellen des Darmes mit Hilfe von Transporterproteinen aufgenommen wird. Die dsRNA der gewünschten Zielsequenz löst vermutlich antivirale Abwehrvorgänge in der Zelle aus und verhindert so in *C. elegans* die Expression des durch sie kodierten Proteins. In Bakterien eingeschleuste Vektoren können bei ihrer Vermehrung auch verloren gehen. Um sicher zu stellen, dass nur dsRNA enthaltende Bakterien als Futterquelle dienen, wird in den Vektor zusätzlich eine Tet/Amp-Resistenz eingebaut. Sowohl in den Bakterienkulturen bei der Anzucht als auch den Feeding-Platten wurden die Antibiotika Ampicillin und Tetracyclin zugesetzt. Nur die den Vektor mit der Antibiotikaresistenz tragenden Bakterien überleben. Eine effektive RNAi wird auf diese Weise sichergestellt.

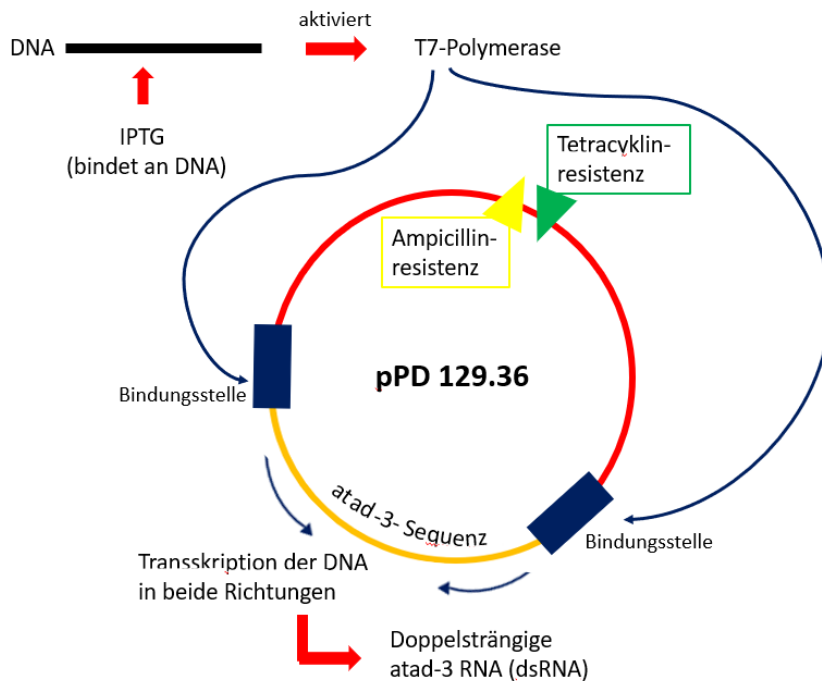


Abb. 3: Schematische Darstellung der RNAi mit atad-3 (Bsp.) als Zielsequenz

3.1.5.1. RNAi Gensequenzen

Folgende RNAi Gensequenzen wurden verwendet:

atad-3 (F54B3.3)

frataxin (frh) Variante IV

Kontrolle (con) Leervektor L4440

Die RNAi Sequenz atad-3 wurde über die Dr. Julie Ahringer Library, Cambridge, Großbritannien bezogen, die für frh wurde freundlicherweise von Dr. Natascia Ventura, IUF, Leibniz Research Institute for Environmental Medicine, Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

3.1.6. Wurmreinigung und Synchronisation

Für die einzelnen Experimente war es notwendig, Würmer gleichen Alters zu erzeugen. Wurde nur eine geringe Anzahl Würmer benötigt, wurden sie im Rahmen einer 4 h-Synchronisation erzeugt (Eisen- und Häminassays). Waren große Wurmengen erforderlich (Herstellung von Wurmpellets), wurden sie chemisch

synchronisiert.

Die Ein- und Umsetzung einzelner Würmer auf frische Platten erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle mittels Wurmpicker, einer dünnen Glaspipette, in deren Ende – über einem Bunsenbrenner erhitzt und ausgezogen – ein dünner Platindraht eingeschmolzen wurde. Das Drahtende wurde etwas abgeplattet, um Verletzungen der Würmer oder des Agars zu vermeiden. Um eine mögliche Kontamination zu unterbinden, wurde der Draht nach jedem Umsetzungsvorgang über einer offenen Flamme abgeflammt.

3.1.6.1. 4 h-Synchronisation

Unter dem Mikroskop wurden ca. 20 reife, trüchtige L4 Würmer ausgewählt und mit dem Wurmpicker auf eine frische NGM-Platte mittlerer Größe gesetzt. Ausgehend von einer Legerate von etwa 2 Eiern pro Wurm und Stunde wurden sie für 4 h bei 18 °C inkubiert. Anschließend wurden die adulten Würmer von der Platte entfernt und diese für 3 Tage bei 18 °C im Brutschrank gehalten.

3.1.6.2. Chemische Synchronisation

Bei der chemischen Synchronisation macht man sich die starke Resistenz der Eihülle gegenüber ätzenden Substanzen zu Nutze, die die reifen Würmer selbst nicht besitzen. Als Ausgangsmaterial wurde eine große NGM-Platte mit vielen trüchtigen adulten Wümmern gewählt. Diese wurden mit 3 ml 1x PBS-Puffer abgespült. Die Suspension wurde in je 1,5 ml fassende Eppendorf-Tubes überführt und bei 18 °C mit 3.000 rpm 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, die Wurmpellets pro Tube in 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert und mit je 500 µl immer frisch angesetzter NaOH/NaOCl Lösung versetzt. Hierfür wurden jeweils 2 Volumenanteile 4 M NaOH mit 3 Volumenanteilen 3 % NaOCl gemischt. 5 bis maximal 10 min wurden die Würmer in dieser Lösung inkubiert, dabei wurden sie intensiv gevortext und zwischendurch im Mikroskop beobachtet. Sobald die Embryonen freigesetzt waren, erfolgte eine erneute Zentrifugation (3.000 rpm, 3 min, 18 °C). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets erneut in 1 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und in kleinem Volumen auf frischen Platten ausplattiert.

Lösung (pro Liter):

1x PBS (pH 7,4) 8 g NaCl
 0,2 g KCl
 2,68 g Na₂HPO₄ *7H₂O
 0,24 g KH₂PO₄

Dieser Ansatz wurde mit MQ-H₂O aufgefüllt und der pH-Wert eingestellt.

3.2. Assays

Mit Hilfe verschiedener Assays wurde die Rolle der Proteine ATAD-3 und Frataxin im Eisenstoffwechsel und bei der Häminaufnahme in *C. elegans* studiert. Untersucht wurde auch, ob die Gabe von Flavonoiden (Quercetin, Myricetin) als Antioxidantien oder Eisenchelatoren (Deferoxamin) einen positiven Effekt auf den Eisenstoffwechsel bei den durch RNAi veränderten Würmern hat.

Ausgangsmaterial der im Folgenden durchgeführten Assays waren immer synchronisierte Wurmembryonen, die für 3 Tage bei 18 °C auf OP50 Platten gehalten wurden. Die resultierenden Larven wurden anschließend auf Feeding-Platten (für RNAi) transferiert und für weitere 3 Tage bei 18 °C gehalten. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, um eine möglichst homogene RNAi-Wurmpopulation zu erhalten. Im Experiment wurde die daraus hervorgegangene 3. Tochtergeneration (T3) untersucht.

3.2.1. Zink-Mesoporphyrin (ZnMp)-Assays

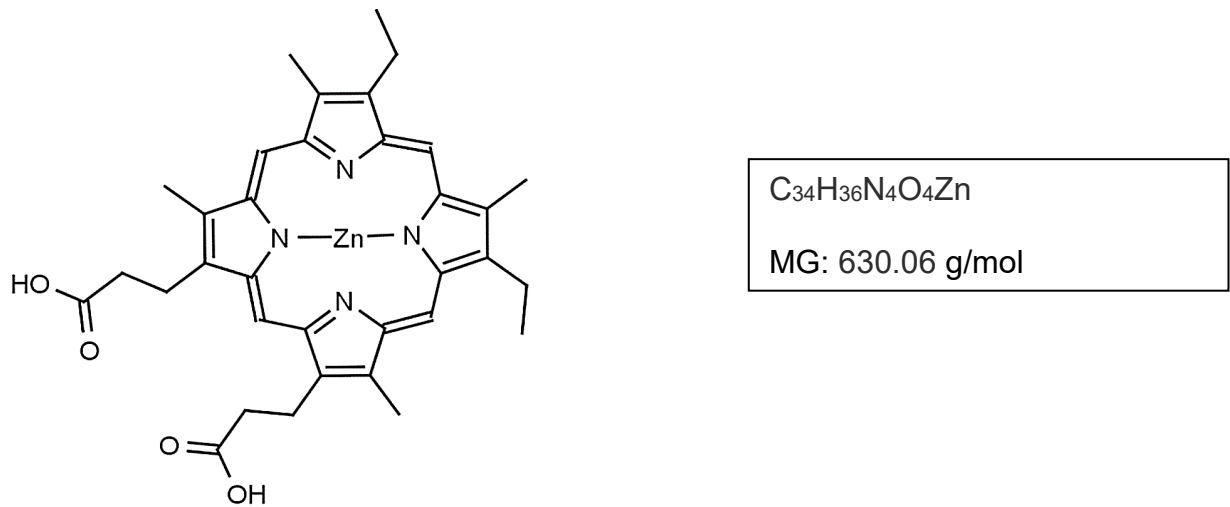


Abb. 4: Struktur- und Summenformel und Molekulargewicht von Zink-Mesoporphyrin
(<https://frontierspecialtychemicals.com/>) (zuletzt geprüft am 29.04.2023)

Zink(II)-Mesoporphyrin (ZnMp) ist ein Häm-Analog, das anstelle des Eisenions ein Zinkion im Porphyrinring enthält und über fluoreszierende Eigenschaften verfügt. So wie andere Würmer auch ist *C. elegans* Häm auxotroph, d. h. der Wurm muss Häm aus seiner Umgebung aufnehmen, er kann es nicht de novo selbst synthetisieren. Die Aufnahme des Häm-Analogons ZnMp kann als Maß für die Häm-Aufnahme betrachtet werden. Untersucht wurde die Häm-Aufnahme bei *atad-3*- und *frh*(RNAi) mit Hilfe des fluoreszierenden Häm-Analogs Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten, die kein Hämin enthielten versus Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μ M, 10 μ M und 20 μ M. Die Messungen wurden nach einer Exposition von 6 h (Kurzzeitassay) und 24 h (= 1 d) (Langzeitassay) durchgeführt. Eine Quantifizierung erfolgte über die Messung der Fluoreszenz in einer definierten Region of Interest (ROI) direkt hinter der Pharyngeal-Intestinal-Klappe des Wurmes.

Mit Hilfe dieser Assays sollen mögliche Veränderungen im Eisenmetabolismus bei *atad-3*- und *frh*(RNAi) untersucht werden. Das Hämin in den Feeding-Platten konkurriert dabei mit dem ZnMp als Häm-Analogon um den gleichen Aufnahmeweg. Gleichzeitig soll ermittelt werden, welche Laufzeiten und Häminkonzentrationen in den Assays für die Untersuchung der Fragestellung besonders geeignet sind.

3.2.1.1. Präparation von ZnMp

ZnMp (MG 630,083 g/mol) wurde nach dem Protokoll von J. Walston (Walston 2010) in 0.3 M NH₄O gelöst und der pH 8 eingestellt. Aliquots einer 4 mM ZnMp-Lsg. wurden hergestellt und bei -20 °C lichtgeschützt gelagert.

3.2.1.2. Präparation von Hämin

Hämin-Chlorid (MG 652 g/mol) wurde nach dem Protokoll von J. Walston (Walston 2010) hergestellt.

Stock: 10 mM (pH 8)

0,0652 g Hämin-Chlorid wurden in 10 ml 0,3 M NH₄OH gelöst, anschließend erfolgte das Einstellen des pH-Wertes durch Zugabe von 5N HCl. Die Aliquots wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.1.3. Vorbereitung der Feeding-Platten

Für die Versuche wurden Feeding-Platten in kleinen Petrischalen (Ø 50 mm) benutzt. Es wurden Feeding-Platten ohne und mit Zusatz von Hämin in den Konzentrationen 2 µM, 10 µM und 20 µM verwendet. Pro Platte wurden 40 µM ZnMp eingesetzt. Das ZnMp wurde kurz vor Beginn des Experimentes auf die Platte gegeben und konnte anschließend lichtgeschützt für 10 min einziehen. Synchronisierte RNAi-Würmer (atad-3 und frh) wurden wie oben beschrieben erzeugt und für 6 h bzw. 1 d auf die ZnMP-Platten gesetzt. Auch während der Versuchslaufzeit wurden die Platten vor Licht geschützt. Eine Kontrolle wurde mitgeführt. Anschließend wurde die Fluoreszenz gemessen.

3.2.1.4. Herstellung von Agarose-beschichteten Objektträger zur Fluoreszenzmikroskopie

Für *in vivo*-Beobachtungen von RNAi-Tieren wurden mit Agarose beschichtete Objektträger benötigt. Zu ihrer Herstellung wird eine 2-5 %ige Agarose-Lösung (in H₂O) in der Mikrowelle kurz aufgekocht und ein paar Tropfen auf einen Objektträger gegeben. Anschließend legt man einen zweiten Objektträger auf und spreizt mit seiner Hilfe die Agarose. Nach dem Erhärten der Agarose werden die beiden Objektträger vorsichtig gegeneinander verschoben. So bleibt an einem der Objektträger ein dünnes

Agarosekissen hängen. Dieses wird mit einem Skalpell quadratisch zugeschnitten. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden 9 µl dH₂O auf die Agaroseschicht pipettiert und in diesen Tropfen ca. 30 Würmer mit dem Wurmpicker gesetzt. Anschließend wurde 1 µl Levamisol hinzugegeben. Levamisol gehört in die Gruppe der Imidazothiazole ((S)-6-Phenyl-2,3,5,6-tetrahydroimidazol[2,1-b][1,3]thiazol) und bewirkt in der verwendeten Konzentration eine Bewegungshemmung und Immobilisation der Würmer, sodass eine gute Mikroskopie möglich ist. Unmittelbar nach der Zugabe von Levamisol erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung.

3.2.1.5. Fluoreszenz-Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Würmer wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M aufgenommen und mit Hilfe der ImageJ Software (developed by Wayne Rasband at the National Institutes of Health, verfügbar unter <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) quantifiziert. Für jedes Tier wurde die Fluoreszenzintensität in einer gegebenen Region (*region of interest*, ROI) welche die ersten anterioren Darmzellen umfasste und eine Größe von 2,55 x 0,8 mm besaß, analysiert. Die einzelnen Bilder wurden korrigiert vom Hintergrundsignal. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Microsoft EXCEL.

3.2.2. Eisen- und Häminmessung

Für die Messung des Eisen- bzw. Hämingehaltes sind größere Mengen von Würmern erforderlich. Ausgangsmaterial für alle diese Untersuchungen waren daher Wurmpellets à ca. 5.000 Würmern. Untersucht wurden atad-3(RNAi).

3.2.2.1. Herstellung von Wurmpellets für biochemische Assays

Zur Herstellung von Wurmpellets wurden synchrone Populationen von atad-3(RNAi) bzw. Kontrollen auf NGM-Platten verwendet. Nach chemischer Synchronisation (s. 3.1.6.2.) wurden die Eier für 3 d auf Feeding-Platten gehalten. Anschließend erfolgte die Umsetzung auf 5-Fluoro-2'-deoxyuridine (FUDR)-haltige Feeding-Platten (FUDR-Konzentration 25 µM in den Platten) mit der gewünschten RNAi (atad-3) für 3 d. FUDR unterbindet die Reproduktion und erzeugt bei adulten Würmern Sterilität.

Auf diese Weise erhält man Wurmpellets mit gleichaltrigen Würmern.

FUDR-Präparation:

5-Fluoro-2'-deoxyuridine (FUDR) (MG 246,19 g/mol)

Stock: 25 mM

100 mg FUDR mit 16,26 ml ddH₂O mischen und sterilfiltrieren (Filter mit Porengröße 0,45 µm). Die Aliquots wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert

Die Generierung der Wurmpellets muss zügig erfolgen, da die Prozedur bei den Würmern Stress und Hunger erzeugt und damit eine Veränderung des Metabolismus bewirken kann. Das Zeitlimit lag bei 30-40 Minuten. Alle verwendeten Wurmpellets wurden in diesem Zeitraum hergestellt.

Die Würmer wurden mit ca. 3 ml MQ-Wasser (Reinstwasser; Milli-Q System, Merck) von den Platten heruntergewaschen und über ein Zellsieb (40 µm Nylon-Zellsieb) in ein 50 ml Falcon Tube überführt. Das mit den Würmern gefüllte Sieb wurde umgedreht auf einen neuen Falcon Tube gestellt und die Würmer mit MQ-Wasser aus dem Sieb gespült. Die Würmer mussten anschließend gereinigt werden, weshalb der Falcon Tube mit MQ-Wasser auf 20 ml aufgefüllt und bei 3.000 rpm 3 min bei RT zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abpipettiert und die Würmer erneut in 20 ml MQ-Wasser suspendiert. Es erfolgte die erneute Zentrifugation. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Falcon Tube mit 5 ml MQ-Wasser aufgefüllt und erneut herunterzentrifugiert (3 min bei 3.000 rpm und RT). Der Überstand wurde vorsichtig auf maximal 2 ml abpipettiert und erneut mit den herunterzentrifugierten Würmern gemischt. Zur Bestimmung der Anzahl der Würmer wurden 10 µl der Suspension auf einen Objektträger gegeben, unter dem Lichtmikroskop gezählt und so die im Falcon Tube enthaltene Wurmanzahl bestimmt (Hochrechnen auf 5 ml Wurmssuspension, dann Anzahl Würmer/ml). Um das Nassgewicht des Wurmpellets berechnen zu können, wurde das Leergewicht eines 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tube bestimmt, anschließend wurde jeweils die gleiche Anzahl Würmer in den Tube pipettiert. Angestrebt wurden Wurmpellets mit einer Größe von ca. 5.000 Würmern. Um den Verlust von Wurmmaterial durch Adhäsion zu minimieren, wurde zur Überführung der Würmer eine abgesättigte Pipettenspitze verwendet. Die Spitze wurde hierfür vor dem Wurmtransfer mit 0,5 % Gelatine und anschließend mit MQ-Wasser gespült. Es folgte die Zentrifugation der Eppendorf-

Tubes. Der Überstand wurde so weit wie möglich abgenommen und der Tube mit Wurmpellet erneut gewogen. Auf diese Weise wurde das Nassgewicht des Wurmpellet ermittelt. Die fertigen Wurmpellets wurden in flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert. Auf diese Weise wurden für alle in dieser Arbeit verwendeten Genotypen (atad-3, frh, con) Wurmpellets hergestellt.

3.2.2.2. Erstellen einer Standard-Eichreihe zur Messung des Proteingehaltes einer Probe mit dem Bicinchoninsäure(BCA)-Protein-Assay-Kit (Thermo Scientific Pierce)

Der BCA-Assays ist eine etablierte Methode zur quantitativen Proteinbestimmung in einer Probe. Es ist ein kolorimetrischer Test, bei dem der zu untersuchende Proteingehalt einer Probe nach Zugabe von bestimmten Farbstoffen durch Messung der optischen Dichte mit der Verfärbung einer Eichlösungsreihe bekannter Proteinkonzentrationen verglichen wird. Die zugrundeliegende chemische Reaktion ist die Reduktion von Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen, die dann mit BCA einen Farbkomplex bilden. Gemessen wird im Photometer bei 562 nm.

Es wurde eine Standardreihe hergestellt, die eine Messung von Proteinmengen in einem Bereich von 0-1000 µg/ml erlaubte.

Beschriftung der Tubes	Diluent (µl) MQ-Wasser	BCA (µl)	Finale BCA-Konzentration (µg/ml)
A	400	0	0
B	400	100 von C	5
C	400	400 von D	25
D	450	300 von E	50
E	400	400 von F	125
F	700	100 vom Stock	250
G	325	325 von I	500
H	250	150 vom Stock	750
I	325	325 vom Stock	1000

Tab. 1: Ansätze für eine Pierce BCA-Standard Reihe

Stock = im Kit enthaltene 1ml Ampulle mit BCA in einer Konzentration von 2 mg/ml.

Berechnung der einzusetzenden Menge Stock:

$$\frac{\text{Volumen (Soll)} (\mu\text{l})}{\text{Volumen (Haben)}(\mu\text{l})} \times \text{Volumen} (\mu\text{l}) = xy (\mu\text{l}) \text{ Stock}$$

Die Standardreihe wurde für die durchgeführten biochemischen Assays (Eisen/Häminbestimmung) verwendet. Sie wurde bei -20 °C gelagert und jeweils vor der Verwendung aufgetaut.

3.2.3. Messung des Eisengehalts der Würmer

Die Eisenmessung wurde mit dem Kit-System Iron Colorimetric Assay Kit K 390 (BioVision, Inc.) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden Wurmpellets von -80 °C atad-3(RNAi) und Kontrollen verwendet.

3.2.3.1. Herstellung eines Lysats

Die Wurmpellets wurden in einen mit EtOH und dH₂O gereinigten, gut vorgekühlten Möser pulverisiert. Hierfür wurde das Wurmpellet in den Möser gegeben, mit flüssigem N₂ bedeckt und mit einem ebenfalls vorgekühlten Pistill zermahlen. Dieser Vorgang wurde mehrfach (3-4x) wiederholt, solange, bis das Pellet vollständig pulverisiert war. Es wurde darauf geachtet, dass das Wurmpellet während des gesamten Vorgangs nicht auftaute. Das Wurmpulver wurde in einen vorgekühlten 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tube überführt und mit frischem 1x PBS auf 100 µl aufgefüllt. Nach gutem Vortexen wurde der Eppendorf Tube bei 4 °C für 3 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (Lysat) wurde in einen neuen, vorgekühlten Tube überführt und auf Eis gestellt.

3.2.3.2. Proteinbestimmung im Lysat

Für die Kontrollen und die verschiedenen Genotypen wurden jeweils zwei Eppendorf Tubes mit je 9 µl frisch hergestelltem MQ-Wasser (Assay MQ) befüllt und auf Eis gestellt. Das Lysat wurde kurz gevortext, herunterzentrifugiert und je 1µl in die vorbereiteten Röhrchen gegeben.

Von dem BSA-Standard wurden pro Messkonzentration je 2x (Doppelbestimmung) 10 µl in eine Mikrotiterplatte mit U-Boden gegeben. Auch von den Proben wurden jeweils 10 µl vorgelegt. Die Menge des benötigten *working reagent* wurde mit oben genannter Formel ermittelt. Unter Verwendung einer Multikanalpipette wurden je 200 µl in die einzelnen Vertiefungen (engl.= *wells*) pipettiert. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie abgedeckt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Unmittelbar danach wurde die Proteinmenge der Proben mittels eines Tecan-Gerätes bestimmt. Dazu wurde die Software Magellan verwendet – eine universelle Lasersteuerungs- und Datenreduktionssoftware zur Analyse von Daten aus Mikrotiterplatten-Tests mit dem Tecan-Messgerät.

3.2.3.3. Eisen-Assay

Der Iron Colorimetric Assay Kit kann Eisen in einem linearen Bereich von 0,4 bis 20 nmol in einer 50-µl-Probe oder 8 µM bis 400 µM messen. In dem Assay wird durch einen Säurepuffer das Eisen (Fe^{3+}) aus dem Eisen (Fe^{3+})-Proteinkomplex abgespalten. Nach der Reduktion zu Eisen (Fe^{2+}) reagiert Eisen mit Ferene S unter Bildung eines stabilen gefärbten Komplexes und ergibt eine Absorption bei 593 nm. Der Puffer enthält eine spezielle Chelatchemikalie, um die Interferenz von Kupferionen (Cu^{2+}) zu blockieren.

Die Durchführung der Eisenmessung erfolgte gemäß der Arbeitsanleitung des Kits. Gemessen wurde Fe^{2+} und total $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Zunächst wurde ein Stock einer 1 mM Standard-Eisenlösung hergestellt. Dazu wurden 10 µl der im Iron Kit (Bio Version) enthaltenen Eisen-Lösung mit 990 µl MQ-Wasser versetzt. Anschließend wurde eine Eisenstandardreihe (0 µl, 2 µl, 4 µl, 6 µl, 8 µl, 10 µl) erstellt, mit Assay-Buffer auf 100 µl gebracht und in eine 96er Wellplatte pipettiert. Die zu untersuchenden Lysatproben von atad-3 RNAi- Würmern und der Kontrolle mit dem Leervektor L4440 wurden mit Hilfe der Proteinbestimmung auf den gleichen Wert adjustiert und in die Wellplatte pipettiert. Je 5 µl Iron-Reducer wurden hinzugegeben. Die Platte wurde lichtgeschützt bei 25 °C für 30 min inkubiert. Nach dieser ersten Inkubationszeit wurden 100 µl Iron-Probe aus dem Kit in jedes Well (Standard und Proben) pipettiert und die Platte erneut lichtgeschützt bei 25 °C für 60 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung und Auswertung im Tecan-Gerät bei 593 nm. Alle Proben wurden doppelt geführt.

3.2.4. Hämin-Assay

Der Hämingehalt der Würmer wurde mit dem Hemin Assay Kit, (Cat. Nr. MAK036, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gemessen. Als Ausgangsmaterial wurden Wurmpellets von -80 °C der atad-3(RNAi) und Kontrollen verwendet. Alle Proben wurden doppelt geführt. Die Akkumulation von Hämin in den Mitochondrien wurde für Frataxin bereits beschrieben (Pandolfo, 1998) und daher nicht erneut untersucht.

Wie unter 3.2.3.1. beschrieben wurde ein Lysat der Würmer gewonnen. Im letzten Schritt wurde das Wurmpulver statt mit 1x PBS mit 4 Vol. eiskalten Hämin-Assay-Puffer auf ca. 100µl aufgefüllt, gevortext und bei 9500 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert, um die unlöslichen Wurmbestandteile abzutrennen. Anschließend wurde der Proteingehalt der Lysate mittels Pierce BCA ermittelt (s. 3.2.3.2.) und die für jede Probe einzusetzende Menge bestimmt. Der Hämin-Assay wurde gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden 100 nM einer Hämin-Standard-Lsg. hergestellt. Hierfür wurden 10 µl der 10 µM Hämin-Standard Lsg. in 990 µl Hämin-Assay Puffer gegeben. In einem zweiten Verdünnungsschritt wurden anschließend 100 µl der 100 nM Hämin-Standard-Lsg. in 900 µl des Hämin-Assay Puffer gegeben, um eine 10 nM Hämin-Standard-Lsg. zu erhalten (10 fmole/µl). In einer 96 Well-Platte wurden durch Zugabe von 0 µl, 4 µl, 8 µl, 12 µl, 16 µl und 20 µl der 10 nM Hämin-Standard Lsg. eine finale Standardkonzentration von 0, 40, 80, 120, 160 und 200 fmol/well erzeugt. Jede Konzentration wurde mit Hämin-Assay Puffer auf 50 µl aufgefüllt.

Hämoproteine in der Probe können ein Hintergrundsignal erzeugen, das einen Messfehler verursacht. Um diesen zu kontrollieren, wurde zu jeder Probe eine „blank“-Probe mitgeführt. Diese enthielt das Reaktionsgemisch (RM) ohne den Enzym-Mix. Von jeder Probe wurde ein dreifacher Ansatz untersucht (2x RM mit Enzym-Mix, 1x RM ohne Enzym-Mix).

Für den Hämin-Assay werden zwei verschiedene Reaktionsgemische benötigt (s. Tab. 1). Für die Lysatproben und den Standard wurde das Reaktionsgemisch mit Enzym verwendet, für die „blank“-Proben das Reaktionsgemisch ohne Enzym. Beide Gemische wurden nach Herstellervorgaben in ausreichender Menge hergestellt.

Reagenz	"blank"- Probe	Lysatproben u. Standards
Hämin-Assay-Puffer	46 µl	43 µl
Hämin Probe	2µl	2 µl
Hämin Substrat	2 µl	2 µl
Enzym Mix	- / -	3 µl

Tab. 2: Zusammensetzung der Reaktionsgemische für Hämin-Assay (Sigma-Aldrich)

Je 50 µl des passenden Reaktionsgemisches wurden zu den jeweiligen Proben gegeben und die Platte 30 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung im Tecan-Gerät bei 570 nm.

3.2.5. Fecundity-Assays

Zur Charakterisierung des atad-3(RNAi)-Phänotyps wurden Fecundity-Assays mit atad-3(RNAi) durchgeführt. Ausgangsmaterial waren jeweils die aus einer 4 h-Synchronisation hervorgegangenen Würmer.

Die synchronisierten Würmer wurden vereinzelt und auf kleine Feeding-Platten (Ø 35 mm, Herstellung wie im Anhang beschrieben) mit RNAi für atad-3 gesetzt. Eine Kontrolle wurde immer mitgeführt. Pro Platte wurden zwei Würmer eingesetzt. Von diesen Würmern wurde die Nachkommenschaft für insgesamt 96h erfasst und unter dem Mikroskop ausgezählt (Auszählung erfolgte jeweils nach 24 h, 48 h, 72 h und 96h). Die Platten wurden hierfür bei 18 °C für 24 h inkubiert, dann erfolgte die erste Zählung der Nachkommen unter dem Mikroskop. Anschließend wurde der Wurm auf eine frische Feeding-Platte gesetzt und für weitere 24 h bei 18 °C inkubiert. Nach erneuter Zählung wurde der Vorgang zwei weitere Male wiederholt. Zur besseren Orientierung wurde mit Filzstift von unten ein Raster auf die Platten gemalt. Die Unterteilung in einzelne Felder ermöglichte eine leichtere und genauere Zählung der Eier und Larven.

3.2.6. Assays mit Eiseninaktivatoren

Chelatoren sind reaktionsfreudige organische, selten auch anorganische Verbindungen, die aufgrund von freien Elektronenpaaren in der Lage sind, freie Ionen zu binden und damit zu inaktivieren. Sie bilden hierbei stabile ringförmige Komplexe, die Chelate. Sie werden in der Medizin therapeutisch eingesetzt, um toxische Wirkungen von z. B. Metallionen (Eisen, Blei) zu neutralisieren. Untersucht wurde, ob sich die Würmer unter Zugabe des Eisenchelators Deferoxamin und der dadurch erfolgenden Bindung und Inaktivierung des Eisens erholten und phänotypisch veränderten.

Flavonoide sind sekundäre Pflanzenstoffe, die in vielen Gemüsesorten und Getreidearten vorkommen. Sie sind in der Lage, freie Radikale zu binden und so zu inaktivieren. Auch sie finden Anwendung in der Medizin. Untersucht wurde, ob die beiden Flavonoide Quercetin und Myricetin einen Rescueeffektes auf die atad-3(RNAi) ausüben können, indem sie freie Radikale binden, die durch den mit der Eisenakkumulation verbundenen oxidativen Stress entstanden sind.

3.2.6.1. Deferoxamin

Deferoxamin ist ein Chelatbildner mit einer starken Bindungsaffinität zu Eisen(III)-Ionen über drei Hydroxamgruppen. In der Medizin wird es als ein Antidot bei Eisenüberladung des Organismus eingesetzt und ermöglicht die renale Ausscheidung des Eisens. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Deferoxamin eine Auswirkung auf den Phänotyp, der atad-3(RNAi) hat. Als Maß wurde die Fertilität eines Wurmes beurteilt und die Nachkommenschaft studiert. Für die Assays wurde Deferoxamin Mesylate Salt (DF) von der Fa. Sigma-Aldrich verwendet.

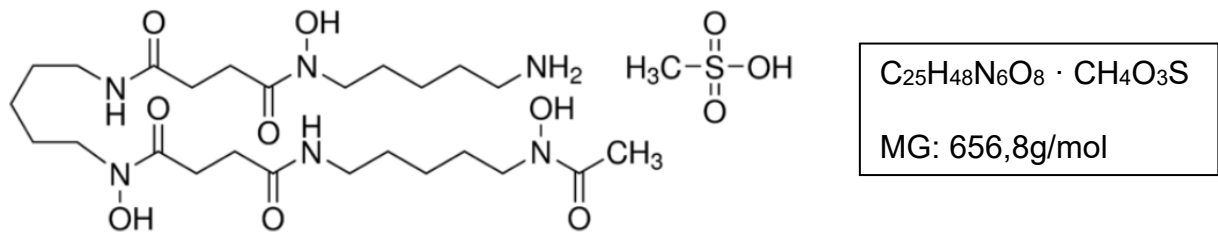


Abb. 5: Struktur- und Summenformel und Molekulargewicht von Deferoxamin
(<https://www.sigmaaldrich.com/DE/de>)(zuletzt geprüft am 29.04.2023)

Es wurde zunächst ein 10 mM Stock von DF hergestellt. Hierfür wurden 0,006568 g des pulverigen DF auf einer Feinwaage abgemessen und in 100 μ l frisch hergestelltem MQ gelöst.

Anschließend wurden je 3 ml einer OP50-Bakterienkultur (s. Anhang 2.1.) in den drei working-Konzentrationen 100 μ M DF, 10 μ M DF und 1 μ M DF hergestellt. Die hierfür benötigte Menge Stock wurde nach der Formel

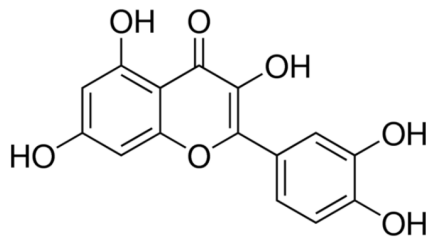
$$\frac{\text{Volumen (Soll)}}{\text{Volumen (Haben)}} \times \text{Volumen} = \text{benötigte Menge Stock}$$

ermittelt.

Durch 4 h-Synchronisation (s. 3.1.6.1.) gewonnene N2-Embryonen wurden für zwei Tage bei 18 °C auf normalen OP50-Platten inkubiert. Anschließend wurden die L2/3-Wurmlarven auf atad-3-RNAi Feeding-Platten gesetzt und für einen Tag bei 18 °C gehalten. Nach der RNAi wurden die Würmer auf mit DF in den drei zu untersuchenden Konzentrationen (100 μ M DF, 10 μ M DF und 1 μ M DF) supplementierten OP50-Platten gebracht und für einen weiteren Tag inkubiert. Im Anschluss daran wurde ein Fecundity-Assay (wie unter 3.2.5. beschrieben) über 3x 24 h durchgeführt und nach 24 h, 48 h und 72 h die Zahl der Nachkommen bestimmt. Kontrollwürmer ohne RNAi wurden jeweils parallel mitgeführt.

3.2.6.2. Quercetin

Für die Assays wurde Quercetin von der Fa. Sigma-Aldrich verwendet.



$C_{15}H_{10}O_7$

MG: 302,24 g/mol

Abb. 6: Struktur- und Summenformel und Molekulargewicht von Quercetin
(Kopustinskiene et al., 2020)

Für die Assays wurden kleine OP50-Platten (Ø 35 mm) verwendet, pro Platte wurden zwei Würmer eingesetzt. Untersucht wurden die Effekte von Quercetin auf die Fertilitätsrate von *C. elegans* als *atad-3(RNAi)* und *frh(RNAi)* in den Dosierungen 200 µM und 100 µM. Verglichen wurden sie mit Kontrollen ohne Chelatorenbehandlung (= n. T., *no treatment*). Pro Platte wurden jeweils 60 µl Quercetin in den festgelegten Workingkonzentrationen eingebracht. Da das Quercetin in DMSO gelöst wurde, und DMSO-Effekte auf *C. elegans* haben kann, wurde, um gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen, auch auf die n. T.- Platten DMSO in 10 %iger BSA-Lsg. aufgebracht (8 µl DMSO in 4 ml 10 % BSA = 0,3 %ige DMSO). Kontrollen wurden immer mitgeführt. Die Auswertung erfolgte nach 24 h, 48 h und 72 h. Hierfür wurde die Nachkommenschaft (Larven und Eier) unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Würmer wurden nach jeder Zählung jeweils auf frische Platten gesetzt.

Zunächst wurde ein 100 mM Quercetin-Stock hergestellt (0,03224 g/ml Quercetin in DMSO (100 %) gelöst, anschließend eine 10 %ige BSA-Lösung (1,5 g BSA in 15 ml frisch hergestelltem MQ gelöst). Nach der Formel

$$\frac{\text{Volumen (Soll)}}{\text{Volumen (Haben)}} \times \text{Volumen} = \text{benötigte Menge Stock}$$

wurde die benötigte Menge Stock, die für die jeweiligen working-Konzentrationen in 10 % BSA zu lösen ist, berechnet.

Durch 4 h-Synchronisation (s. 3.1.6.1.) gewonnene N2-Embryonen wurden für einen Tag bei 20 °C auf OP50-Platten inkubiert. Anschließend wurden die L2/3-

Wurmlarven auf atad-3- bzw. frh-RNAi Feeding-Platten gesetzt und für einen Tag bei 20 °C gehalten. Nach Abschluss der RNAi wurden die Würmer auf Quercetin-Platten gesetzt. Das Quercetin wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn auf die Platten aufgebracht und ca. 10 min einziehen lassen. Anschließend wurden die Würmer auf die Platten gesetzt und nach 24 h ausgewertet. Unter dem Mikroskop wurde die Anzahl der Nachkommen ausgezählt und die Würmer auf frische Quercetin-Platten, bzw. n. T.-Platten gesetzt. Nach weiteren 24 h erfolgte ein erneutes Auswerten und Umsetzen, und nach erneuten 24 h ein drittes Auswerten.

3.2.6.3. Myricetin

Für die Assays wurde Myricetin von der Fa. Extrasynthese verwendet.

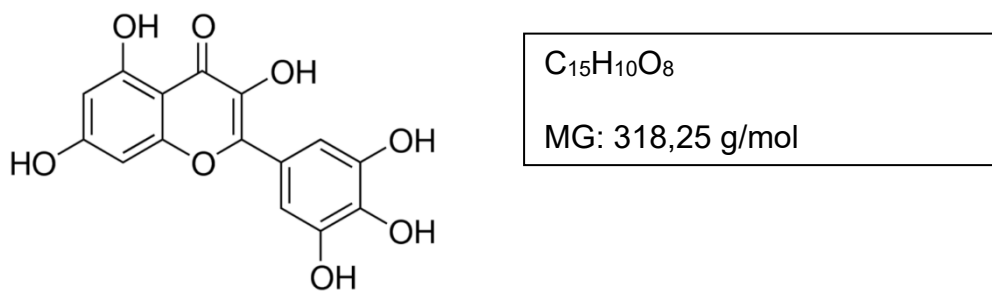


Abb. 7: Struktur- und Summenformel und Molekulargewicht von Myricetin (Kopustinskiene et al., 2020)

Ein 100 mM Myricetin-Stock wurde hergestellt (0,031825 g/ml Myricetin in DMSO (100 %) gelöst) und in 10 % BSA gelöst. Für die n. T.-Platten wurde 0,3 % DMSO in 10 % BSA verwendet.

Die Myricetin-Assays wurden analog zu den unter 3.2.6.2. beschriebenen Quercetin-Assays durchgeführt.

3.3. Statistische Auswertung

Um die Unterschiede zwischen den Ergebnissen in den verschiedenen Assays auf ihre Signifikanz zu prüfen, wurde der t-Test eingesetzt. Die Signifikanz-Niveaus lagen hierbei bei $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

4. Ergebnisse

4.1. ZnMp-Assays mit atad-3(RNAi)

4.1.1. Kurzzeitassay (6 h)

ZnMp 40 μ M für 6 h auf Platten ohne (wo) und mit 2 μ M, 10 μ M und 20 μ M Hämin

In den Kurzzeitassays war die Fluoreszenz nach 6 h Inkubation insgesamt schwach ausgeprägt. Sowohl bei den Platten ohne Hämin als auch unter Häminkonzentrationen von 2 μ M und 10 μ M zeigten die atad-3(RNAi) eine reduzierte Fluoreszenz (Abb. 8 und 9). Bei einer Konzentration von 2 μ M zeigen t-Tests signifikante Unterschiede (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***). War kein oder nur 2 μ M Hämin in den Platten vorhanden, lag die Fluoreszenz der atad-3(RNAi) nur bei etwa 60 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 9). Es zeichnete sich bei beiden Populationen, den modifizierten und den nicht modifizierten Würmern, eine Abnahme der Fluoreszenz mit steigender Häminkonzentration ab.

Hohe Häminkonzentrationen (20 μ M) führten zum Absterben von Kontroll- und atad-3(RNAi) Würmern. Die Fluoreszenzmessung konnte hier nicht valide durchgeführt werden, da bei diesen Konzentrationen deutlich weniger Individuen zur Verfügung standen (Abb. 8). Bei nachfolgenden Assays wurden deshalb keine weiteren Versuche mit Konzentrationen von 20 μ M Hämin durchgeführt.

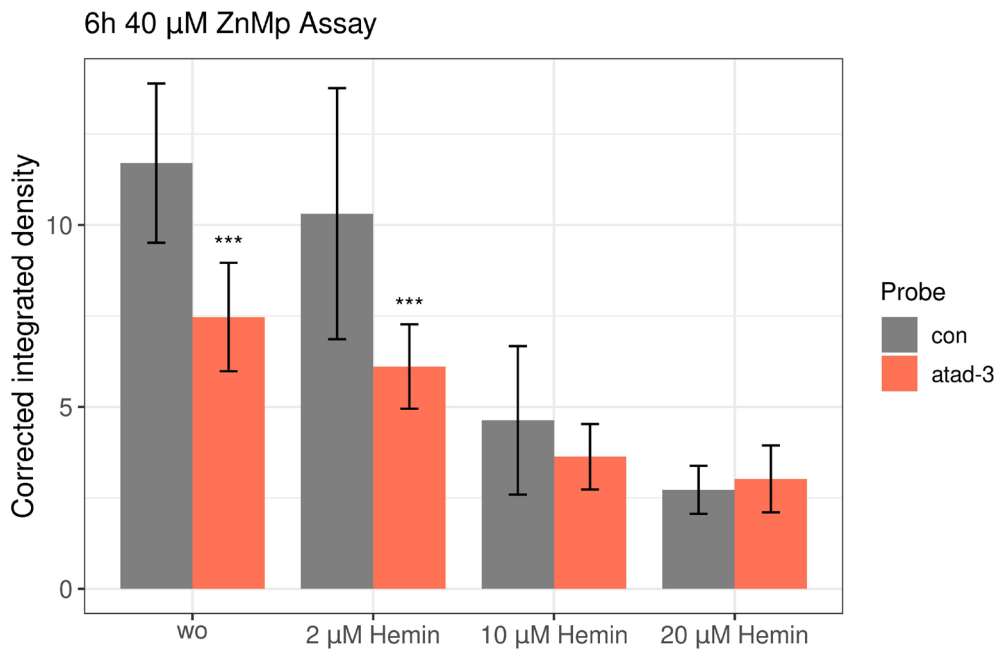


Abb. 8: Gemessene Fluoreszenz der *atad-3*(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (*atad-3*) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (con) 6 h nach Gabe von 40 μM Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin im Vergleich zu Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μM , 10 μM und 20 μM . Anzahl der durchgeführten Experimente: 3, Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,001^{***}$).

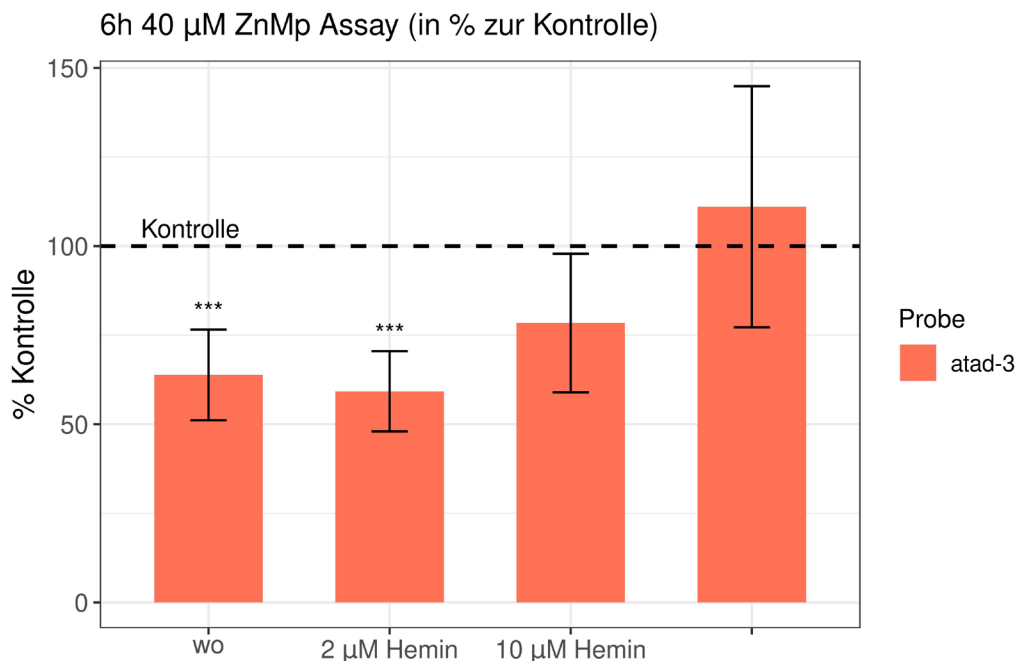


Abb. 9: Vergleich der Fluoreszenz der *atad-3*(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (*atad-3*) in Prozentwerten 6 h nach Gabe von 40 μM Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin und Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μM , 10 μM und 20 μM . Der

Durchschnittswert der unbehandelten Kontrolltiere (con) wurde auf 100% gesetzt. Anzahl der durchgeführten Experimente: 3, Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,001^{***}$).

4.1.2. Langzeitassay (1 d)

ZnMp 40 μM für 1 d auf Platten ohne (wo) und mit 2 μM und 10 μM Hämin

In den Langzeitassays (1 d) zeigte sich auf den Platten ohne Hämin- Zusatz (wo) eine geringradig schwächere Fluoreszenz bei den atad(RNAi) modifizierten Würmern im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Abb. 10). Die Differenz zwischen diesen beiden war nicht mehr so stark ausgeprägt (~80% im Vergleich zur Kontrolle) (Abb. 11) im Vergleich zu den Ergebnissen der 6 h-Assays (Abb. 9). Auf den 2 μM -Häminplatten war – im Unterschied zu der 6 h-Inkubation – nach einem Tag die Fluoreszenz der atad-3(RNAi) geringfügig stärker als die der Kontrolle, wobei der Unterschied nicht signifikant war (Abb. 10). Die 10 μM -Häminplatten zeigten wiederum, ähnlich wie nach 6 h, eine signifikant schwächere Fluoreszenz als die Kontrolle (~70 %) (Abb. 11). Ein Zusammenhang von Fluoreszenz und Häminkonzentration äußerte sich nicht so deutlich wie in den 6 h-Assays.

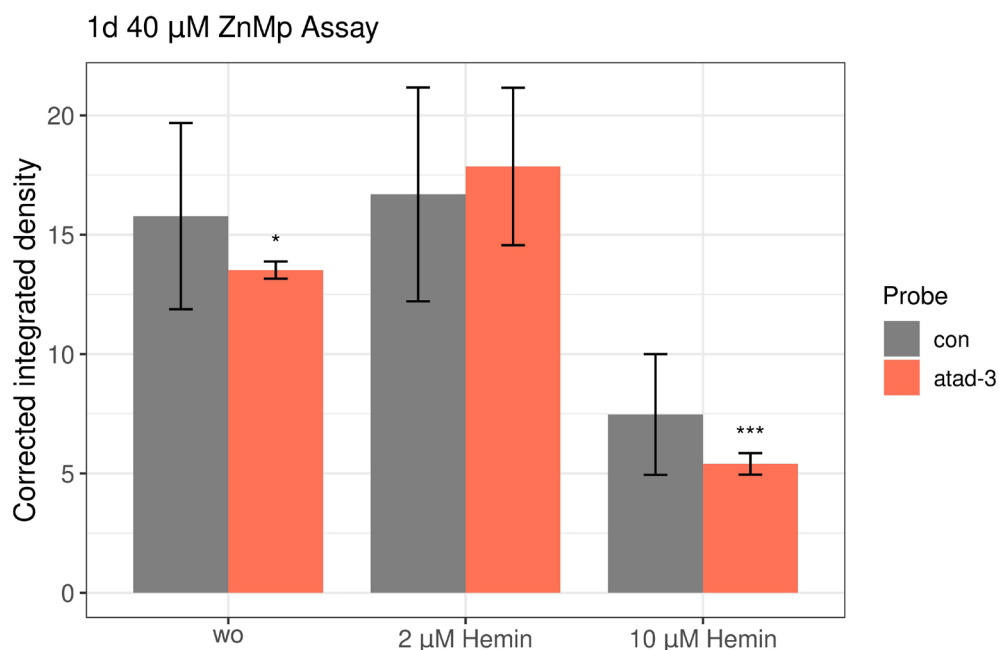


Abb.10: Gemessene Fluoreszenz der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (con) 1 d nach Gabe von 40 μM Zink-Mesoporphyrin

(ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin im Vergleich zu Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μM und 10 μM . Anzahl der durchgeführten Experimente: 3, Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz Niveaus: $p < 0,05$ *, $p < 0,001$ ***).

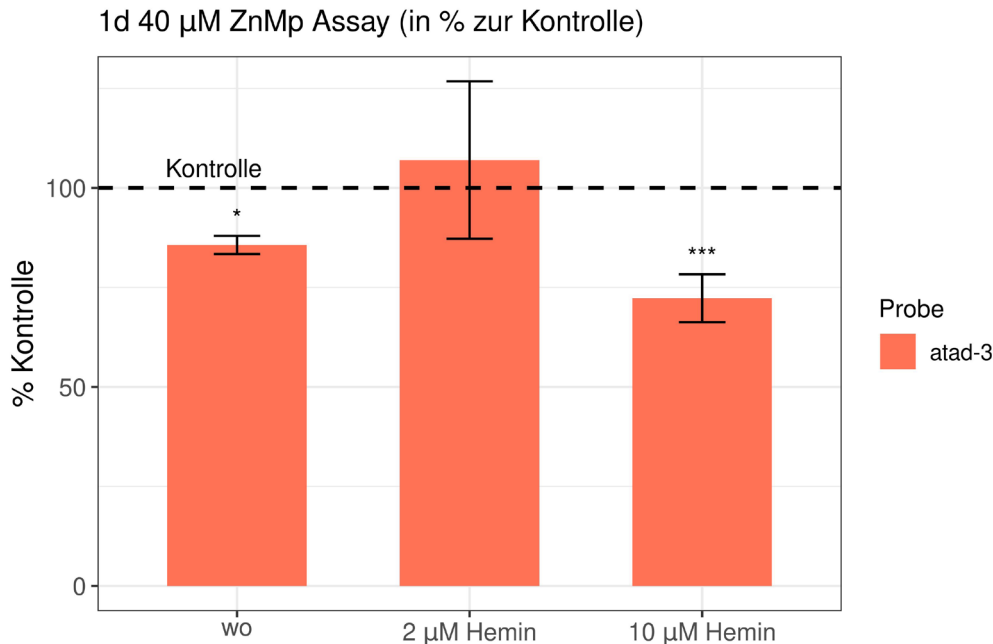


Abb.11: Vergleich der Fluoreszenz der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) in Prozentwerten 1 d nach Gabe von 40 μM Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin und Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μM und 10 μM . Der Durchschnittswert der unbehandelten Kontrolltiere (con) wurde auf 100% gesetzt. Anzahl der durchgeführten Experimente: 3, Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,05$ *, $p < 0,001$ ***).

Zusammenfassend zeigte sich in den Experimenten bei den atad-3(RNAi) Würmern im Vergleich zu den Kontrollen im Kurzzeitassay (6 h) bei ohne Hämin und 2 μM Häminzusatz und im Langzeitassay (1 d) bei 10 μM Häminzusatz eine verminderte Fluoreszenz.

4.2. ZnMp-Assays mit frh(RNAi)

4.2.1. Kurzzeitassay (6 h)

ZnMp 40 μM für 6 h auf Platten ohne (wo) und mit 2 μM und 10 μM Hämin

Wie auch bei den ZnMp-Assays mit *atad-3*(RNAi) zeigte die Kontrolle in diesem Kurzzeit-Assay über 6 h mit *frh*(RNAi) mit zunehmenden Häminkonzentrationen in den Platten eine Reduktion der Fluoreszenz (Abb. 12). Die gemessene Fluoreszenz reduzierte sich um etwa die Hälfte. Auf den Platten ohne Häminzusatz zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Fluoreszenz von *frh*(RNAi) und der Kontrolle. Auch bei der niedrigen Häminkonzentration (2 μ M) war kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Bei 10 μ M-Häminzusatz emittierten die *frh*(RNAi) eine signifikant stärkere Fluoreszenz als die Kontrolle (Abb. 12). Die Darstellung der Werte in % zur Kontrolle zeigte tendenziell eine höhere Fluoreszenz der *frh*(RNAi) im Vergleich zur Kontrolle, bei einer Häminkonzentration von 10 μ M zeigte sich eine signifikante Fluoreszenzerhöhung (Abb. 13).

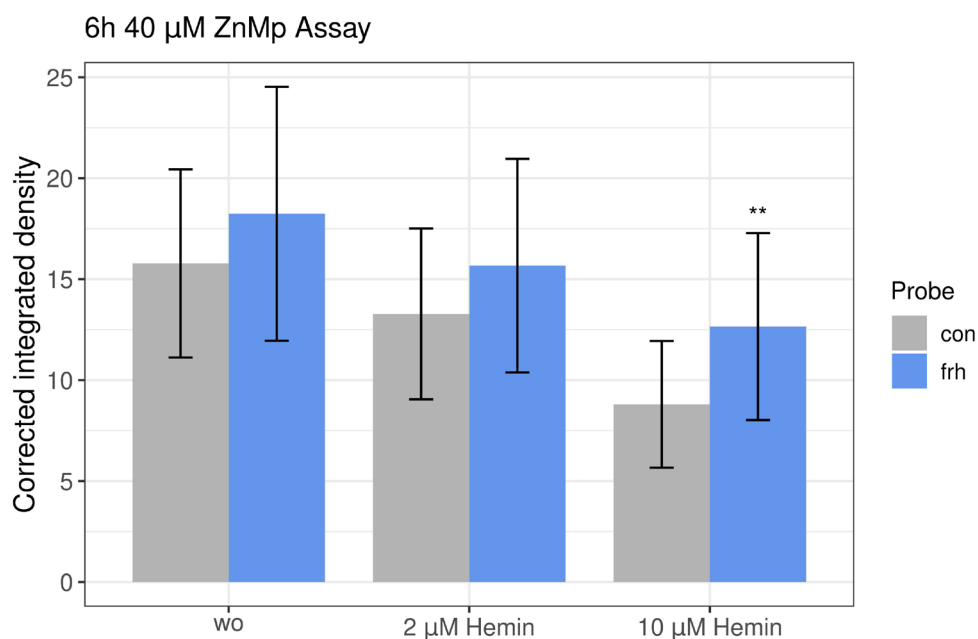


Abb.12: Gemessene Fluoreszenz der Frataxin (RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (*frh*) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (*con*) 6 h nach Gabe von 40 μ M Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (*wo*) Häm in im Vergleich zu Feeding-Platten mit Häm in den Konzentrationen 2 μ M und 10 μ M. Anzahl der durchgeführten Experimente: 1, Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,01$ **).

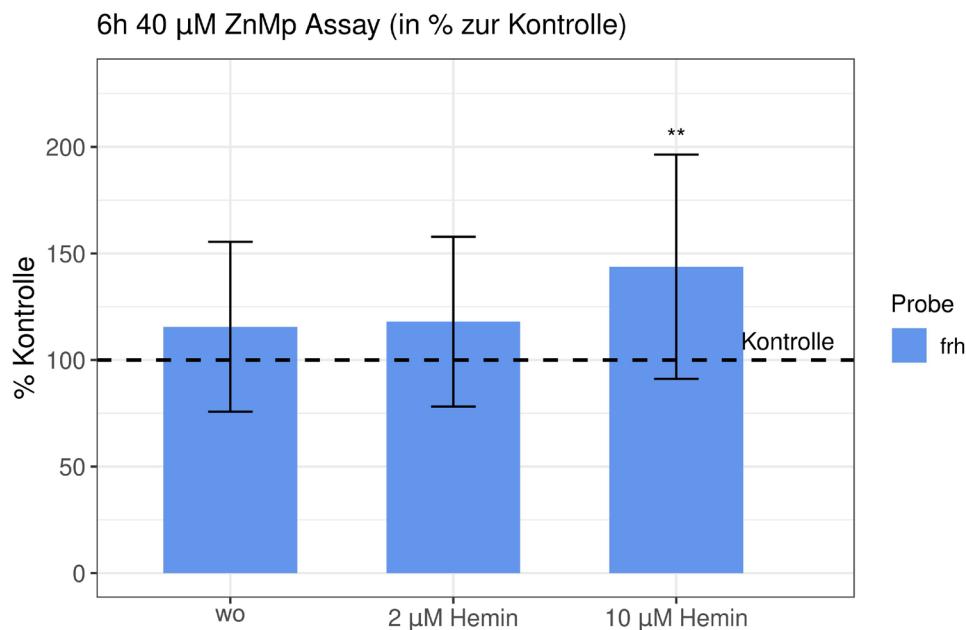


Abb.13: Vergleich der Fluoreszenz der Frataxin (RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (frh) in Prozentwerten 6 h nach Gabe von 40 μM Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin und Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μM und 10 μM . Der Durchschnittswert der unbehandelten Kontrolltiere (con) wurde auf 100% gesetzt. Anzahl der durchgeführten Experimente: 1, Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,01$ **).

4.2.2. Langzeitassay (1 d)

ZnMp 40 μM für 1 d auf Platten ohne (wo) und mit 2 μM und 10 μM Hämin

Die Kontrollen verhielten sich bei dem 1 d–Assay in ihrer Fluoreszenz wie die Kontrollgruppen in den vorangegangenen Assays. Die Fluoreszenz war auf den Platten ohne Häminzusatz am höchsten und nahm mit Zugabe von Hämin ab, da das Hämin mit ZnMp um die Stoffwechselwege konkurriert. Mit zunehmenden Häminangebot wurde weniger ZnMp aufgenommen, was einer Reduktion der Fluoreszenz entsprach (Abb. 14). Bei einer Konzentration von 10 μM Hämin betrug sie bei 1 d Exposition ein knappes Viertel der Ausgangsfluoreszenz auf Platten ohne Hämin.

Die frh(RNAi) zeigten auf Platten ohne Hämin gegenüber der Kontrolle eine signifikant reduzierte Fluoreszenz. Wurde den Platten Hämin zugesetzt, zeigte sich sowohl bei der niedrigen Häminkonzentration (2 μM) als auch bei der hohen Konzentration

(10 μM) eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenz (Abb. 14). Deutlich ist dies auch in der Darstellung der Prozentwerte im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15) zu sehen.

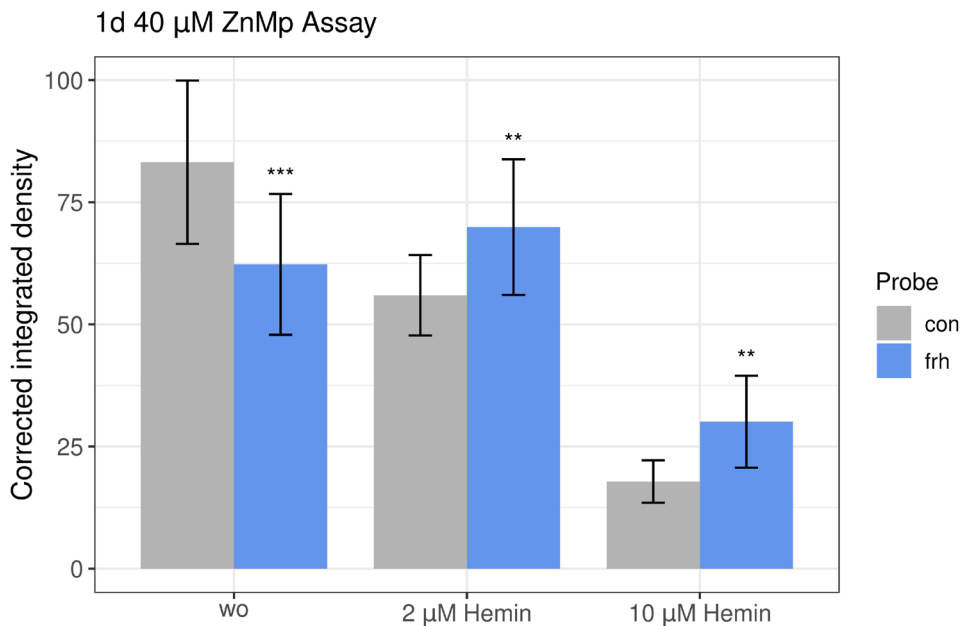


Abb.14: Gemessene Fluoreszenz der Frataxin (RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (frh) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (con) 1 d nach Gabe von 40 μM Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin im Vergleich zu Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μM und 10 μM . Anzahl der durchgeführten Experimente: 1, Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).

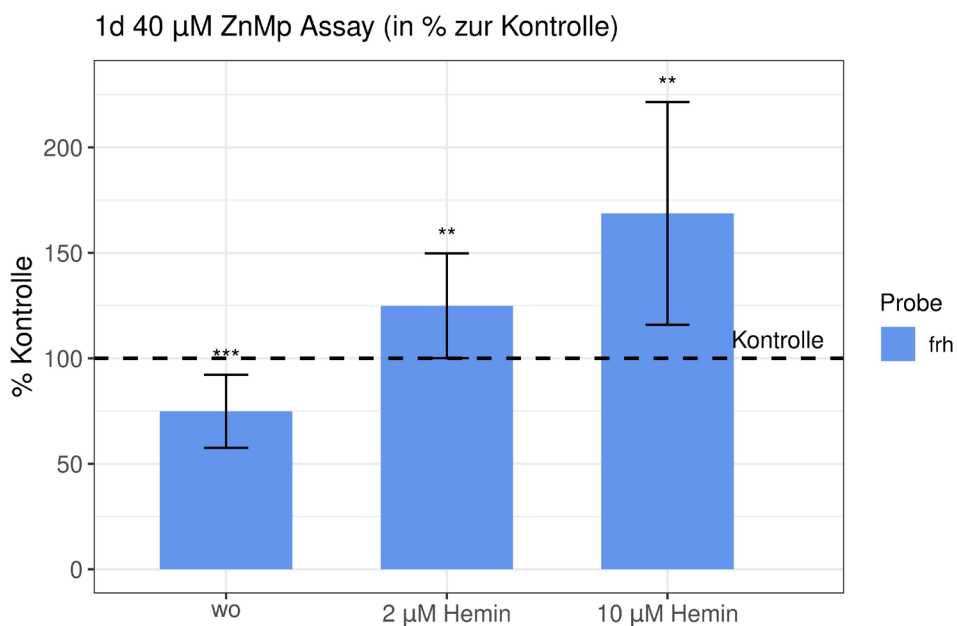


Abb.15: Vergleich der Fluoreszenz der Frataxin (RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (frh) in Prozentwerten 1 d nach Gabe von 40 μ M Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin und Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μ M und 10 μ M. Der Durchschnittswert der unbehandelten Kontrolltiere (con) wurde auf 100% gesetzt. Anzahl der durchgeführten Experimente: 1, Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).

Zusammenfassend ergaben sich bei den frh(RNAi) Würmern im Vergleich zu den Kontrollen somit Hinweise auf eine verminderte Eisenaufnahme aus dem Darmlumen als Ausdruck der hohen Fluoreszenz. Die Eisenakkumulation in frh(RNAi) wurde bereits in der Literatur beschrieben (Pandolfo, 1998). Es wurde deshalb nur ein einzelnes Experiment im Sinne einer Validierung durchgeführt.

4.2.3. Vergleich der atad-3(RNAi) und frh(RNAi)

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der Experimente mit atad-3(RNAi) und frh(RNAi) im Kurzzeit-Assay (6 h) und Langzeit-Assay (1 d) fällt auf, dass die Fluoreszenz der frh(RNAi) und der dazugehörigen Kontrollen deutlich höher ist, als die gemessene Fluoreszenz in den Experimenten mit atad-3(RNAi) (Abb. 16). Das entspricht einer Anreicherung von Eisen im Darmlumen des Wurmes bei fehlender bzw. gestörter Eisenaufnahme durch die Darmzellen bei frh(RNAi). Bei atad-3(RNAi) ist dies nicht so deutlich. Auch im Vergleich der Prozentwerte zur Kontrolle zeigen die frh(RNAi), mit Ausnahme der Platte ohne Hämin (wo) des Langzeitassays, eine höhere Fluoreszenz als atad-3(RNAi) (Abb. 17)

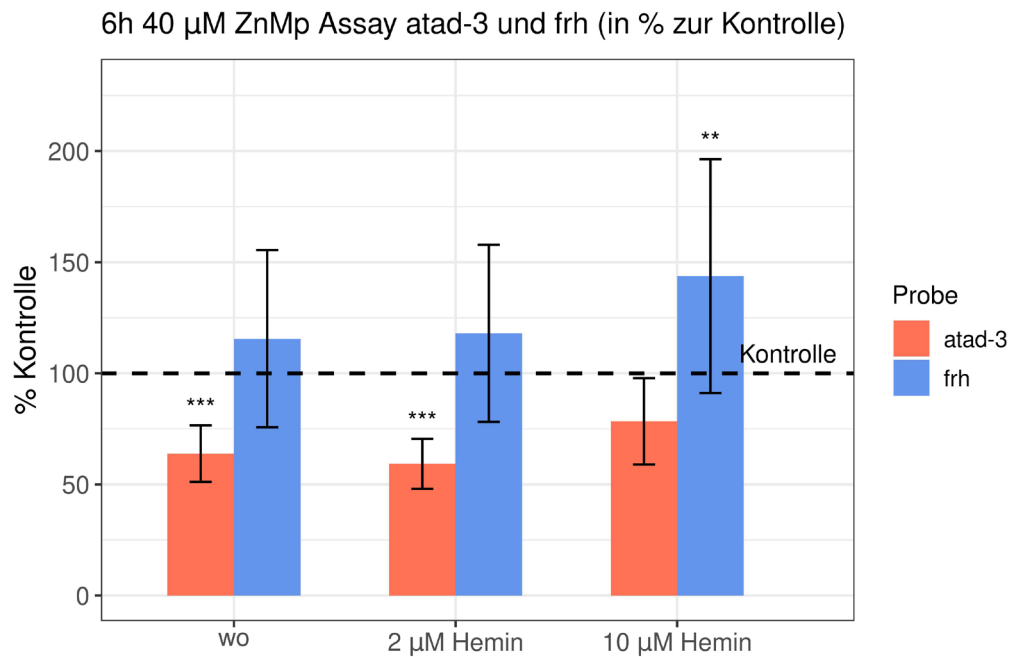


Abb.16: Vergleich der Fluoreszenz der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) mit den Frataxin (RNAi) modifizierten Tieren (frh) in Prozentwerten 6 h nach Gabe von 40 μ M Zink-Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin und Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μ M und 10 μ M. Der Durchschnittswert der unbehandelten Kontrolltiere (Kontrolle) wurde auf 100% gesetzt. Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).

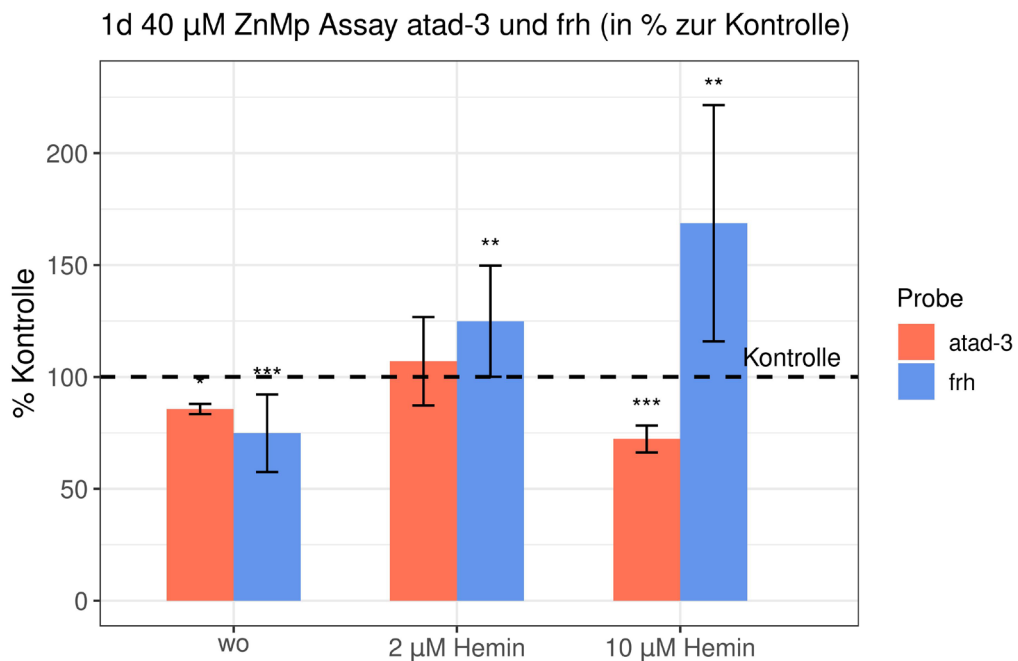


Abb.17: Vergleich der Fluoreszenz der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) mit den Frataxin (RNAi) modifizierten Tieren (frh) in Prozentwerten 1 d nach Gabe von 40 μ M Zink-

Mesoporphyrin (ZnMp) auf Platten ohne (wo) Hämin und Feeding-Platten mit Hämin in den Konzentrationen 2 μM und 10 μM . Der Durchschnittswert der unbehandelten Kontrolltiere (Kontrolle) wurde auf 100% gesetzt. Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).

4.3. Eisen-Assays

Die Messung des Eisengehaltes erfolgte in Wurmlysaten aus Wurmpellets von atad-3(RNAi) und Kontrollen mit dem Leervektor L4440 unter Einsatz des Iron Colorimetric Assay Kits (Iron Colorimetric Assay Kit K 390, Biovision, Inc.). Für diese Assays wurden Wurmpellets einer Größe von ca. 5.000 Würmern eingesetzt, die Herstellung ist unter 3.2.2.1. beschrieben. Es wurden insgesamt drei unabhängige Eisen-Assays durchgeführt, alle Proben wurden in jedem Assay doppelt geführt. Mit Hilfe des Iron Colorimetric Assays kann nach Angaben des Herstellers Eisen in einem linearen Bereich von 0,4 bis 20 nmol in einer 50- μl -Probe oder 8 μM bis 400 μM gemessen werden.

Abb. 18 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse aller drei Assays. Die experimentell erhobenen Messwerte sämtlicher Proben lagen mit $<0,2$ ng/ μl für Fe^{2+} , $<0,65$ ng/ μl für Fe^{3+} und $<0,7$ ng/ μl $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ deutlich unterhalb des Detektionslimits des Kits, so dass eine Beurteilung der Ergebnisse nicht möglich ist.

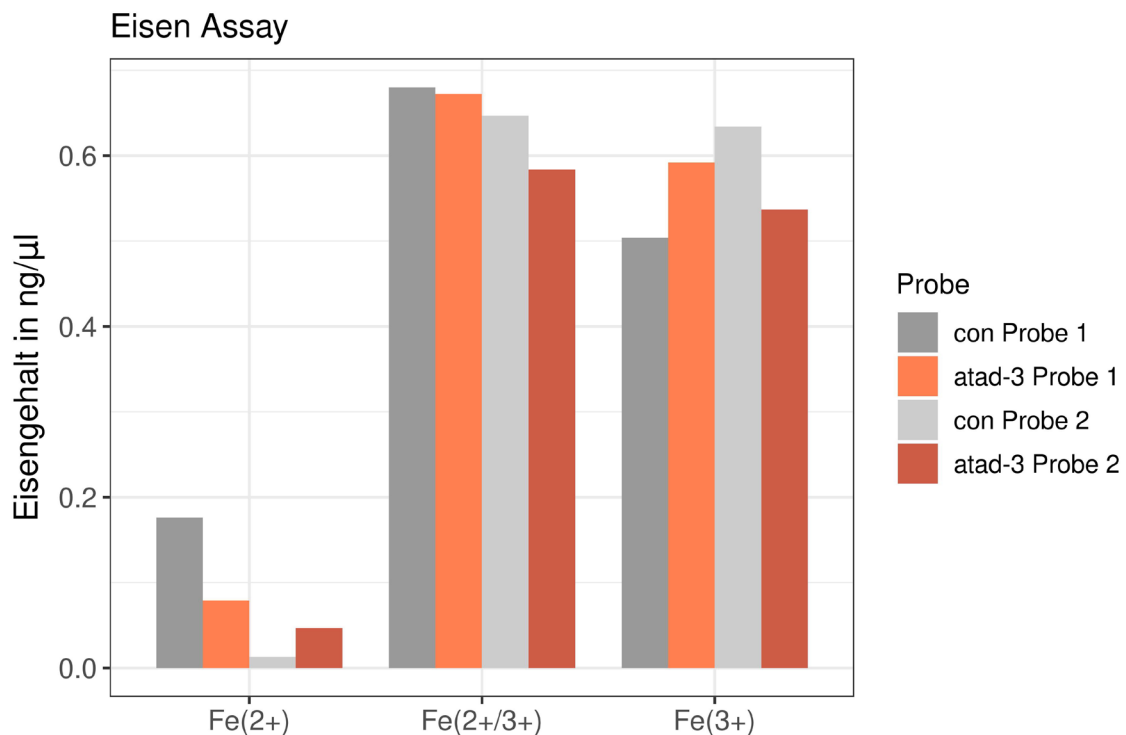


Abb.18: Gesamtauswertung der durchgeführten Eisenassays (Iron Colorimetric Assay Kits (Iron Colorimetric Assay Kit K 390, Biovision, Inc.), Darstellung der Messergebnisse für Fe²⁺, Fe³⁺ und Fe²⁺/Fe³⁺ in Wurmlysaten von atad-3(RNAi) und Kontrollen. Alle Proben wurden doppelt geführt (Probe 1 und 2). Anzahl der durchgeführten Experimente: 3. Die statistische Auswertung mittels t-Test ergab sehr große Standardabweichungen, die aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet sind. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gesehen.

Wir haben zur Kontrolle den Gesamteisengehalt unserer Wurmpellets von atad-3(RNAi) und Kontrollen mit dem Leervektor L4440 nach dem Protokoll des Iron Colorimetric Assay Kit durch ein externes Referenzlabor (Metabolomic Discoveries GmbH, Am Mühlenberg 11, 14476 Potsdam) bestimmen lassen. Auch bei den dort durchgeführten Messungen lagen die Ergebnisse unterhalb des Detektionslimits (<0,6 µg/ml) (Befundnummer MD 11140 vom 21.03.2014).

4.4. Hämin-Assays

Der Hämingehalt wurde in Wurmpellets von atad-3(RNAi) und unbehandelten Kontrollwürmern (Herstellung s. 3.2.2.1.) unter Verwendung des Hemin Assay Kit,

(Cat. Nr. MAK036, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) bestimmt. Die Wurmpellets hatten eine Größe von ca. 5.000 Würmern (Herstellung s. 3.2.2.1.). Es wurden sechs unabhängige Hämin-Assays durchgeführt. Alle Proben wurden in den Assays doppelt geführt. Da die Akkumulation von Hämin in den Mitochondrien für Frataxin bereits von Pandolfo (1998) beschrieben wurde, wurden in diesen Assays frh(RNAi) modifizierte Würmer nicht erneut untersucht.

In Abb. 19 sind die kumulativen Ergebnisse für die doppelten atad-3(RNAi)- Proben und die zugehörigen Kontrollen dargestellt. Es zeigte sich in beiden Probenansätzen eine signifikante Erhöhung des Hämingehaltes in atad-3(RNAi)-modifizierten *C. elegans* im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Sie liegt in beiden Probenansätzen mit ca. 70% bzw. 60 % deutlich über dem Hämingehalt der Kontrolltiere (Abb. 20).

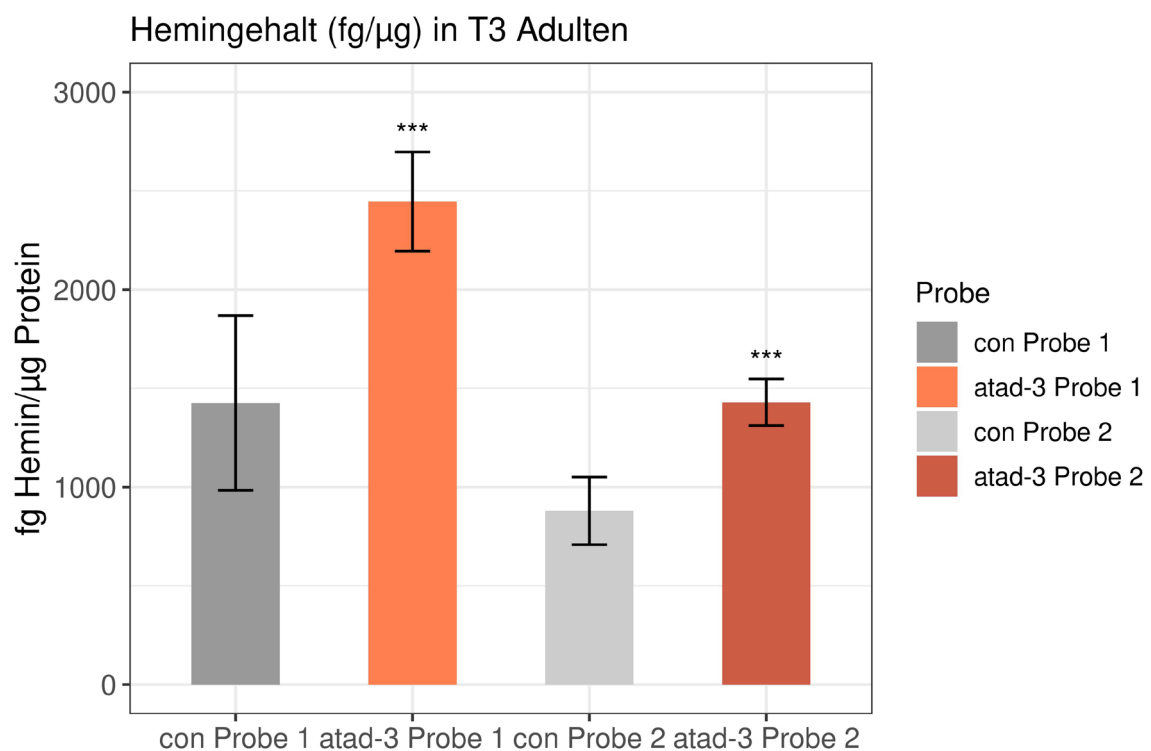


Abb.19: Gesamtauswertung der durchgeführten Häminassays (Hemin Assay Kit, (Cat. Nr. MAK036, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Darstellung der Messergebnisse für die doppelte geführten atad-3-Proben (Probe 1 bzw. Probe 2) und die dazugehörigen Kontrollen (con Probe 1 bzw. con Probe 2) in fg Hämin/μg Protein. Anzahl der durchgeführten Experimente: 6. Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,001^{***}$)

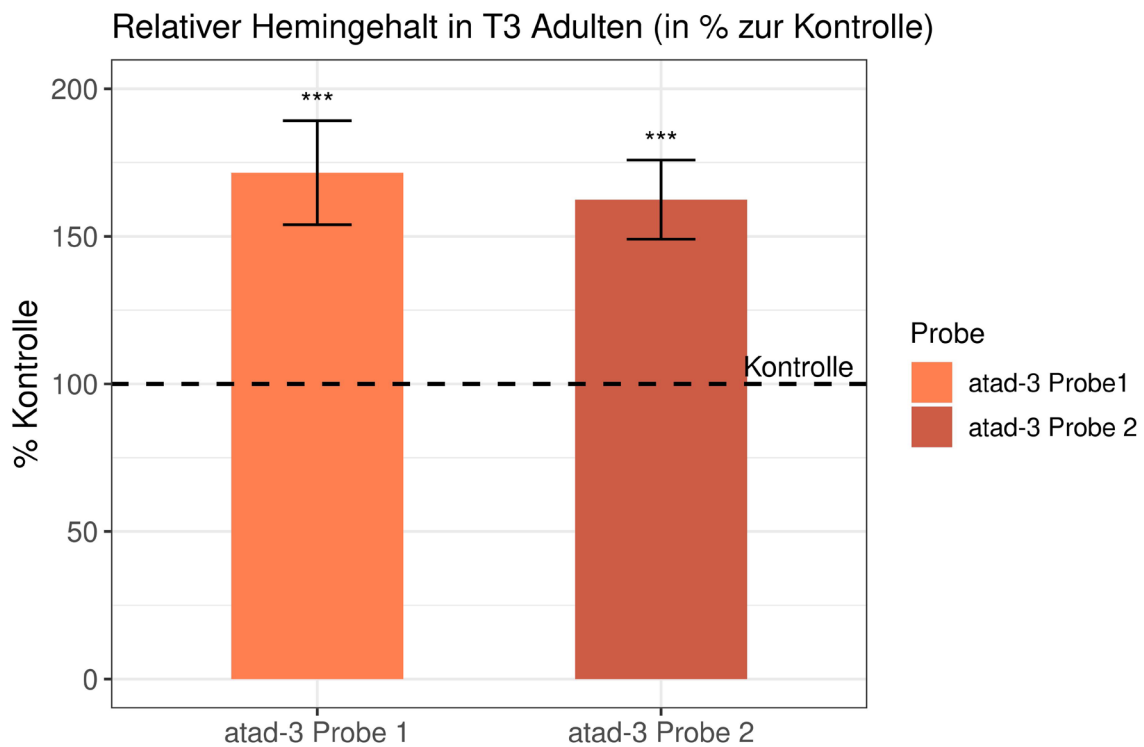


Abb.20: Hämingehalt der doppelte geführten atad-3-Proben (Probe 1 bzw. Probe 2) im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollen (con Probe 1 bzw. con Probe 2) in Prozent. Der Durchschnittswert der unbehandelten Kontrolltiere (con) wurde auf 100% gesetzt. Anzahl der durchgeführten Experimente: 6. Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,001^{***}$)

4.5. Fecundity-Assays

In 11 unabhängigen Experimenten wurde das Legeverhalten von *C. elegans* in verschiedenen RNAi-Formen über einen Zeitraum von vier Tagen studiert. Diese Assays dienen zum einen der Untersuchung der Auswirkung der Ausschaltung des Gens atad-3 mittels RNAi auf die Fertilität der Würmer und damit der Charakterisierung des atad-3-RNAi-Phänotypes bei *C. elegans*. Zum anderen sollte in Vorbereitung der Chelatoren-Assays (Quercetin, Myricetin, Deferoxamin) die optimale Beobachtungsdauer der Fertilität ermittelt werden.

Das Ausschalten des Proteins ATAD-3 durch RNAi in *C. elegans* führte zu einer signifikanten Minderung der Fertilität des Wurmes und Reduktion der Reproduktionsrate. Während die Kontrollen an Tag 2 ein Maximum an Nachkommenschaft zeigten, war das Legeverhalten der atad-3(RNAi) an Tag 2 bereits

deutlich reduziert, nach drei Tagen hatte es sich erschöpft (Abb. 21). Betrachtet man die Gesamtzahl aller Embryonen von *atad-3*(RNAi) über den Zeitraum von vier Tagen im Vergleich zu den Kontrollen so ist dieser Unterschied sehr deutlich und signifikant zu erkennen (Abb. 22).

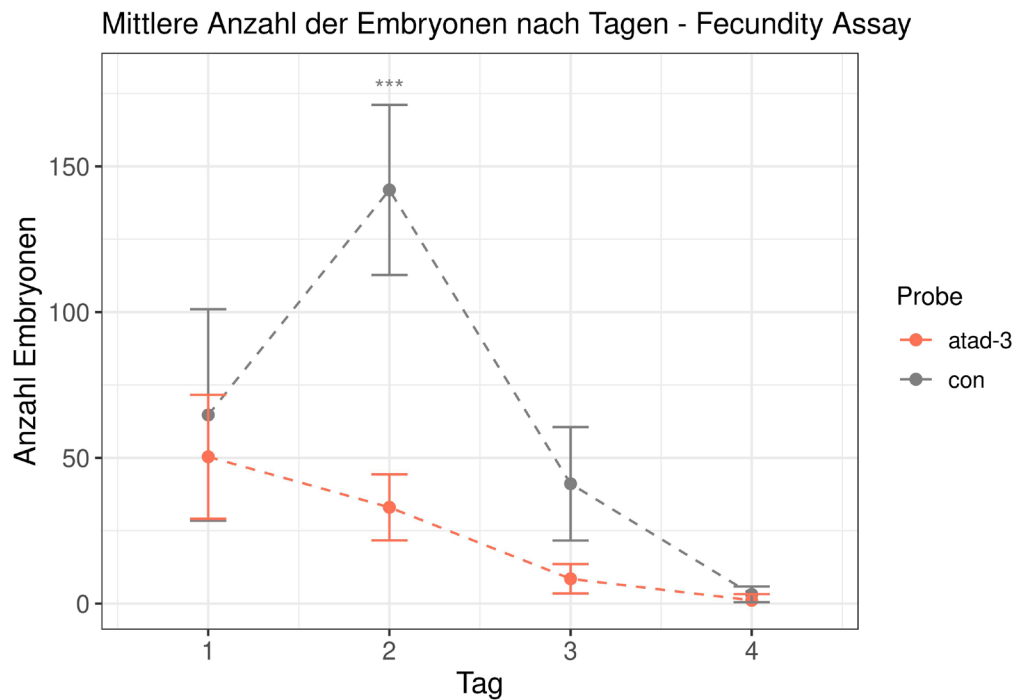


Abb.21: Anzahl der Embryonen der *atad-3*(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (*atad-3*) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (*con*) über 4 d auf Feeding-Platten. Anzahl der durchgeführten Experimente: 11. Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,001^{***}$).

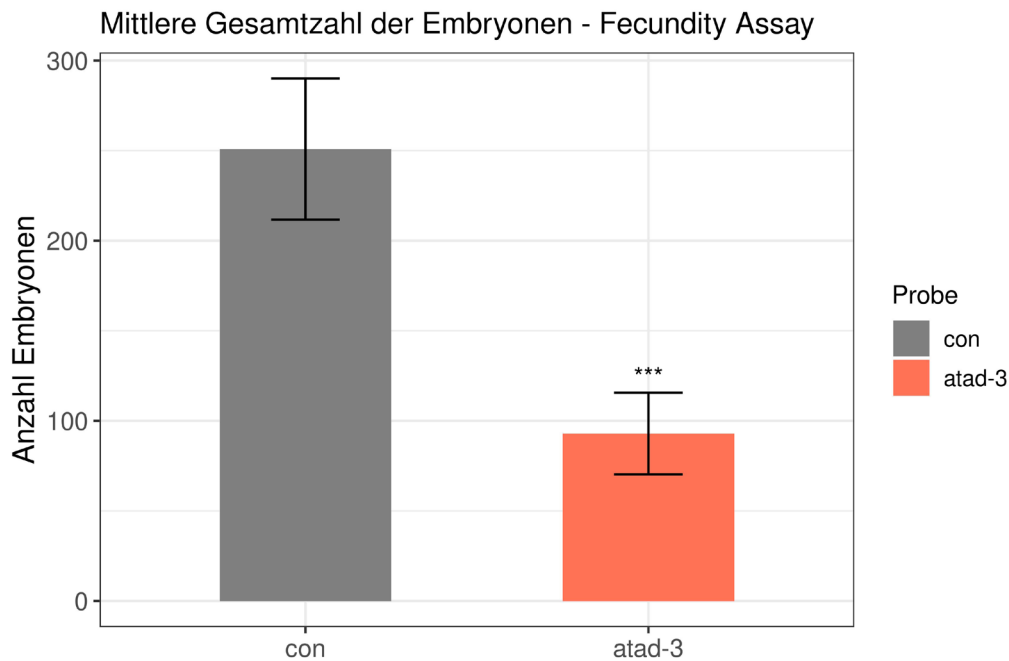


Abb.22: Gesamtzahl aller Embryonen der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (con) über 4 d auf Feeding-Platten. Anzahl der durchgeführten Experimente: 11. Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,001^{***}$).

4.6. Assays mit Eiseninaktivatoren

4.6.1. Deferoxamin

Es wurden in zwei unabhängigen Experimenten die Effekte des Eisenchelators Deferoxamin in den Konzentrationen 1 μM , 10 μM und 100 μM auf das Legeverhalten von *C. elegans* atad-3(RNAi) im Vergleich zum Legeverhalten der Tiere ohne Behandlung durch Deferoxamin (n. T.) untersucht. Kontrollen wurden jeweils mitgeführt. Da keine Informationen zu einer geeigneten Wirkkonzentration von Deferoxamin zur Verfügung standen, wurden Konzentrationen in abgestuften Zehnerpotenzen gewählt. Anhand der Gesamtembryonenzahl über einen Zeitraum von drei Tagen wurde geprüft, ob eine Bindung des Eisens durch Deferoxamin die negativen Effekte der Eisenüberladung infolge des ausgeschalteten Proteins ATAD-3 mindern oder sogar aufheben kann.

Es zeigte sich sehr deutlich, dass der Eisen-Chelator Deferoxamin in allen gewählten

Konzentrationen keinen Effekt auf die Fertilität der *atad-3*(RNAi) Würmer hat (Abb. 23). Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle keine Verbesserung der Reproduktionsrate der Würmer (Abb. 24). Daher wurden nach zwei unabhängigen Versuchen keine weiteren Experimente durchgeführt.

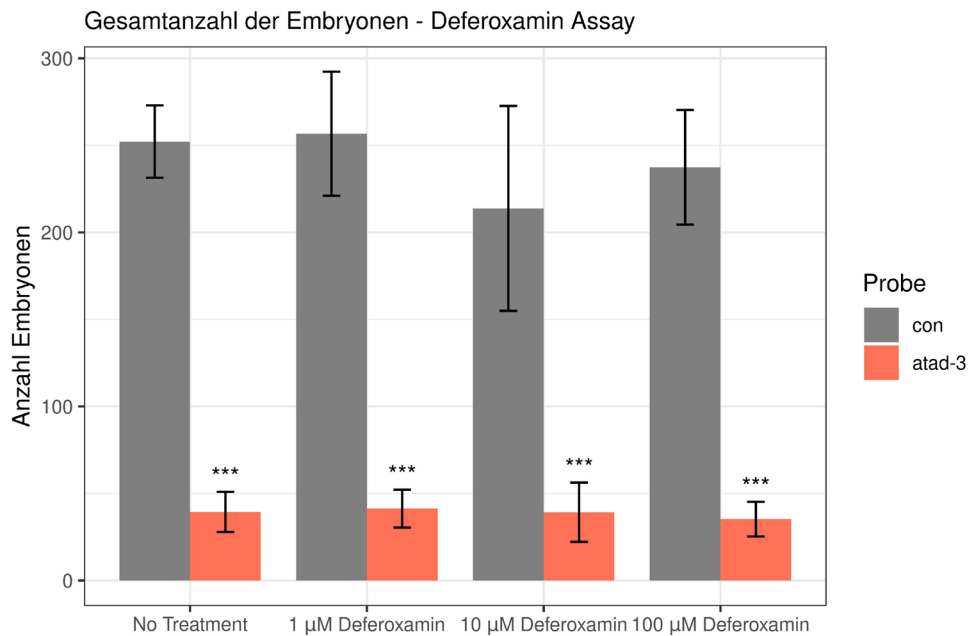


Abb.23: Gesamtzahl aller Embryonen der *atad-3*(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (*atad-3*) im Vergleich zu Kontrolltieren (*con*) nach 3 d ohne Behandlung (No Treatment) und unter der Gabe von Deferoxamin in den Konzentrationen 1 µM, 10 µM und 100 µM. Anzahl der durchgeführten Experimente: 2. Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,001^{***}$).

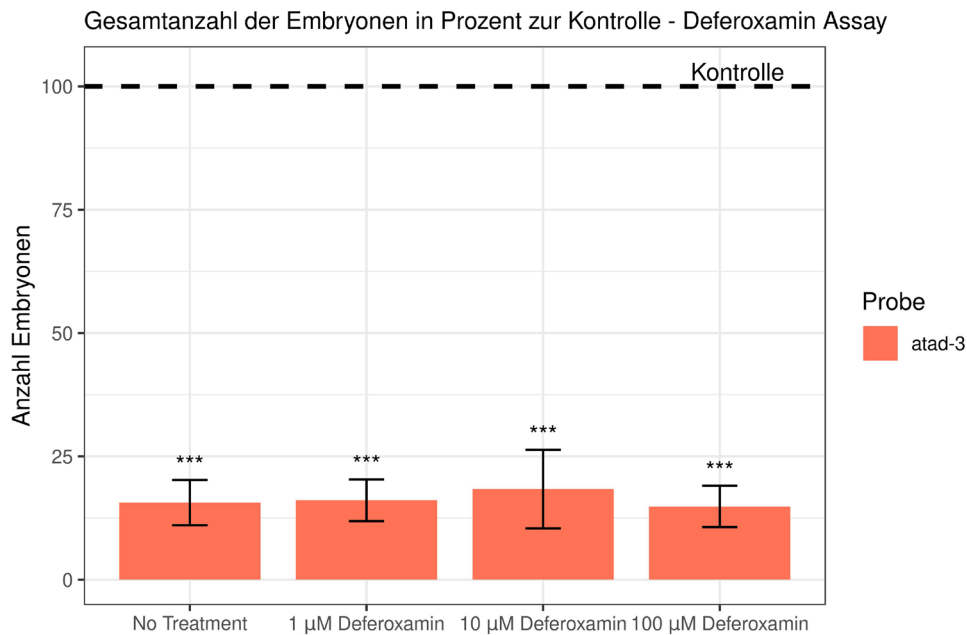


Abb.24: Vergleich der Anzahl der Embryonen der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) in Prozent 3 d ohne Behandlung (No Treatment) und unter der Gabe von Deferoxamin in den Konzentrationen 1 µM, 10 µM und 100 µM. Der Durchschnittswert der Kontrolltiere (Kontrolle) wurde auf 100% gesetzt. Anzahl der durchgeführten Experimente: 2. Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,001^{***}$).

4.6.2. Quercetin

In zwei unabhängigen Experimenten wurde ein möglicher Rescue-Effekt durch Gabe von Quercetin aus der Gruppe der Flavonoide in den Konzentrationen 100 µl und 200 µl versus kein Quercetin bei atad-3(RNAi) und frh(RNAi) untersucht. Ermittelt wurde jeweils die Gesamtembryonenzahl über einen Zeitraum von drei Tagen. Die Darstellung erfolgte in absoluten Zahlen, bzw. Prozent. Kontrollen wurden mitgeführt.

Die Gabe von Quercetin in den gewählten Dosierungen bewirkte keine Verbesserung der Fertilität und des Legeverhaltens von *C. elegans*. Die Fertilität der RNAi Würmer war sowohl für atad-3(RNAi) als auch frh(RNAi) unverändert eingeschränkt. Die Ausschaltung des Proteins ATAD-3 schien einen stärkeren Effekt auf die Fertilität des Wurmes zu haben als die Ausschaltung von Frataxin (Abb. 25 und 26). Aufgrund der Ergebnisse wurden nach zwei Ansätzen keine weiteren Versuche durchgeführt.

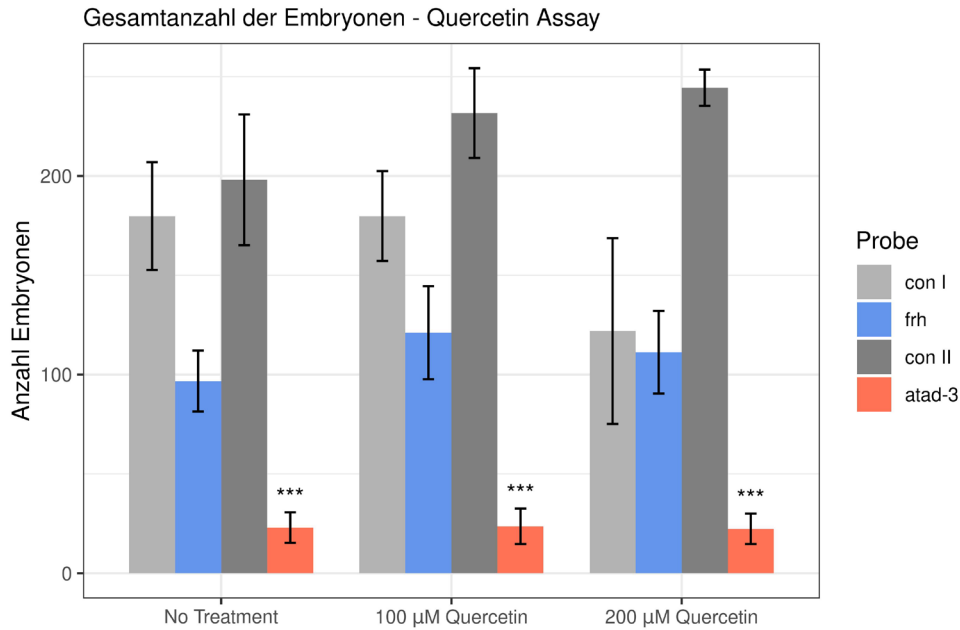


Abb.25: Gesamtzahl aller Embryonen der *atad-3*(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (*atad-3*) und Frataxin (RNAi) modifizierten Tiere (*frh*) jeweils im Vergleich zu Kontrolltieren (*con*) nach 3 d ohne Behandlung (No Treatment) und unter der Gabe von 100 µM und 200 µM Quercetin. Anzahl der durchgeführten Experimente: 2. Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,001^{***}$).

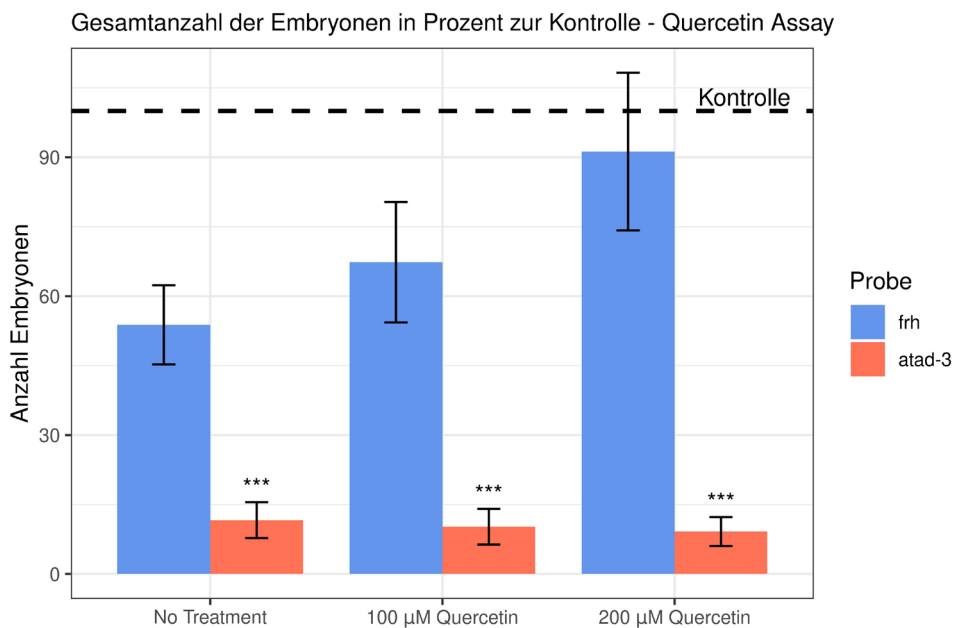


Abb.26: Vergleich der Anzahl der Embryonen der *atad-3*(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (*atad-3*) und Frataxin (RNAi) modifizierten Tiere (*frh*) in Prozent nach 3 d ohne Behandlung

(No Treatment) und unter der Gabe von 100 μ M und 200 μ M Quercetin. Der Durchschnittswert der Kontrolltiere (Kontrolle) wurde auf 100% gesetzt. Anzahl der durchgeführten Experimente: 2. Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,001^{***}$).

4.6.3. Myricetin

Es wurden insgesamt 3 Assays in der unter 2.4.1. beschriebenen Weise durchgeführt. Als Kriterium wurde die Fertilität der atad-3(RNAi)- und frh(RNAi)-Würmer unter Gabe von 100 μ M Myricetin versus n. T. verglichen und die Nachkommenschaft über einen Zeitraum von drei Tagen ermittelt. Abb. 27 zeigt die Gesamtembryonenzahl über eine Legeperiode von drei Tagen bei den beiden RNAi-Knockout Varianten (atad-3, frh) ohne Myricetingabe und unter 100 μ l Myricetin in absoluten Zahlen im Vergleich zu den Kontrollen. Die Prozentwerte im Vergleich zu den Kontrollen sind in Abb. 28 dargestellt.

Durch die Gabe von Myricetin konnte keine Verbesserung oder Normalisierung der Fertilität bei den atad-3(RNAi)- und den frh(RNAi)- Würmern erreicht werden. Das Legeverhalten unverändert reduziert im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren. Auch hier schienen die atad-3(RNAi) stärker beeinträchtigt als die frh(RNAi).

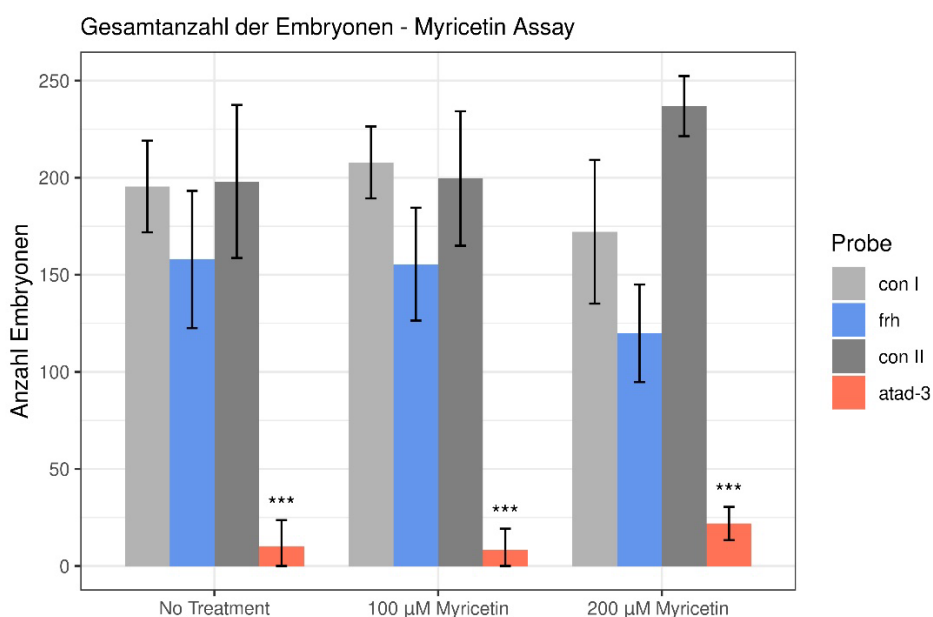


Abb.27: Gesamtzahl aller Embryonen der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) und Frataxin (RNAi) modifizierten Tiere (frh) jeweils im Vergleich zu Kontrolltieren (con) nach 3 d ohne Behandlung (No Treatment) und unter der Gabe von 100 μ M und 200 μ M Myricetin. Anzahl der durchgeführten Experimente: 3. Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,001^{***}$).

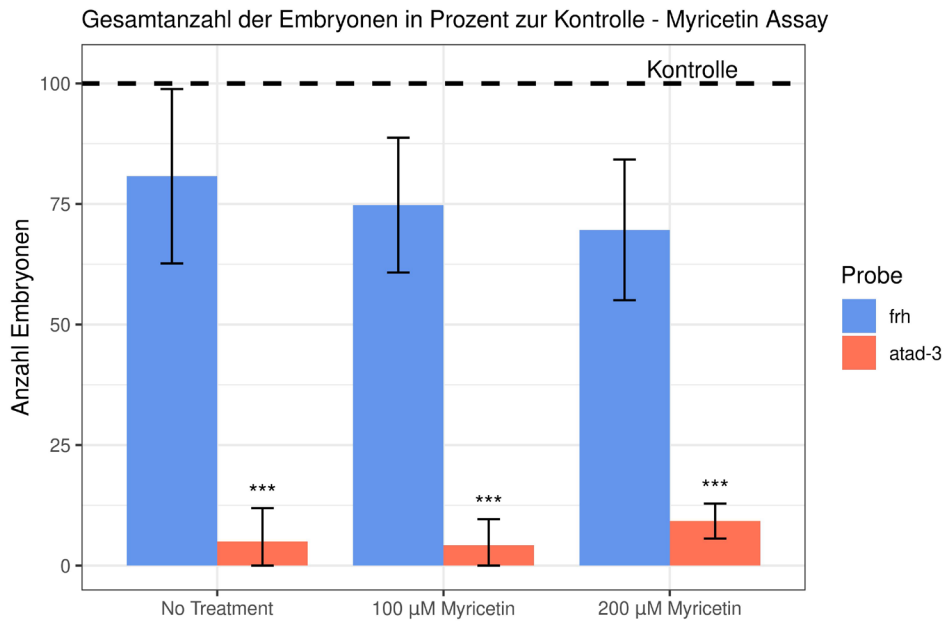


Abb.28: Vergleich der Anzahl der Embryonen der atad-3(RNAi) modifizierten *C. elegans* Würmer (atad-3) und Frataxin (RNAi) modifizierten Tiere (frh) in Prozent nach 3 d ohne Behandlung (No Treatment) und unter der Gabe von 100 μ M und 200 μ M Myricetin. Der Durchschnittswert der Kontrolltiere (Kontrolle) wurde auf 100% gesetzt. Anzahl der durchgeführten Experimente: 3. Statistische Analyse mittels t-Test (Signifikanz-Niveaus: $p < 0,001^{***}$).

5. Diskussion der Ergebnisse

5.1. Die Ausschaltung des *atad-3* Gens durch RNAi führt zu einem erhöhten Hämingehalt in *C. elegans*

Zwischen der zellulären Eisenhomöostase und dem Hämstoffwechsel in *C. elegans* besteht eine enge Verbindung. Wichtige Vorarbeiten hierzu wurden von A. Rao (Rao et al., 2005) durchgeführt. Sie konnte nachweisen, dass der Nematode *C. elegans* Häm auxotroph ist, es aus seiner Umgebung aufnehmen und über Signalwege verstoffwechseln muss. Häm dient dem Wurm als exogene Eisenquelle. *C. elegans* verfügt über ein Transportsystem, das die Aufnahme von Eisen aus dem Darm ermöglicht. Durch die Analyse von Wurmgenomen konnte Rao et al. zeigen, dass den Würmern Orthologe zu Genen fehlen, die Enzyme für die Häm-Biosynthese codieren (Rao et al., 2005). Häme sind kritische Cofaktoren für viele biologische Prozesse und wichtig u. a. für den oxidativen Metabolismus in Zellen, die zelluläre Differenzierung, Genregulation und die Aufrechterhaltung der Proteinstabilität (Wenger, 2000, Nakajima et al., 1999, Sun et al., 2002, Qi et al., 1999). Sie sind auch ein wichtiger Wachstumsfaktor für die Entwicklung von *C. elegans* (Rao et al., 2005).

In unseren Experimenten haben wir den Einfluss von *atad-3* auf die Häm-Homöostase in *C. elegans* untersucht. Die Häm-Homöostase ist bei *atad-3*(RNAi) verändert, die Ausschaltung des Gens führt zu einer signifikanten Erhöhung des Hämingehaltes im Wurmlysat im Vergleich zur Kontrolle. Hierfür wurde das eisenhaltige Protein Hämin mit Hilfe eines spezifischen Assays im Wurmlysat von *atad-3*(RNAi) gemessen. Hämin ist eine eisenhaltige Komplexverbindung, die sich aus Häm und einem Chlorid-Ion zusammensetzt. Als Positivkontrolle wurden unbehandelte Würmer mitgeführt und in gleicher Weise untersucht. Beide Gruppen wurden wegen der Notwendigkeit der Hämaufnahme aus der Umgebung auf mit Hämin angereicherten NGM-Platten gehalten. Als Ergebnis dieser Experimente zeigt sich eine signifikant erhöhte Häminkonzentration in den *atad-3*(RNAi). Im Vergleich zur Kontrolle war die Häminkonzentration in den RNAi-Würmern um rund 70% höher (s. Abb. 19 und 20). Dies erlaubt den Rückschluss, dass das Protein ATAD-3 eine wichtige Rolle im Häm-Stoffwechselweg spielt und die artifizielle Ausschaltung zu einer Unterbrechung desselben führt.

Interessant ist das Ergebnis nachgehender Untersuchungen, in denen die Hämingspiegel in *atad-3*(RNAi) in verschiedenen Zellkompartimenten von *C. elegans* untersucht wurden. Van den Ecker et al. isolierte die Mitochondrien von *atad-3*(RNAi) und fand in dieser mitochondrialen Fraktion deutlich erhöhte Häminkonzentrationen, während die Häminkonzentration im Zytoplasma im Vergleich zu Kontrollen nur leicht erhöht waren (Van den Ecker et al., 2015). Diese Ergebnisse deuten auf einen Einfluss von ATAD-3 auf den Mitochondrialen Stoffwechsel in *C. elegans* hin. Diese Vermutung passt sehr gut zu anderen wissenschaftlichen Arbeiten, die eine Lokalisation von ATAD-3 an der inneren Mitochondrienmembran beschrieben haben. Einschränkend muss allerdings bemerkt werden, dass diese Studien nicht in *C. elegans* sondern in Kultur von humanen HeLa-Zellen, bzw. Leberzellen von Mäusen durchgeführt wurden (Bogehagen et al., 2008, Da Cruz et al., 2003). Eine Störung der Eisen- und Häm-Homöostase hat schwerwiegende Konsequenzen für den Zellstoffwechsel. Es wurde bereits in unterschiedlichen Modellsystemen beschrieben, dass eine Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien multiple schädliche Einflüsse ausübt (zur Übersicht siehe z.B. Ricci et al., 2022).

5.2. Die Ausschaltung des *frh*-Gens durch RNAi führt in *C. elegans* zu einer erhöhten Fluoreszenz im ZnMp-Assay

Die Ausschaltung des *frh*-Gens durch RNAi in *C. elegans* führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenz im ZnMp-Assay. Dieser Effekt zeigte sich deutlich und signifikant in den durchgeführten Langzeit-Assays mit ZnMp (s. Abb. 14 und 15). Die Erhöhung der Fluoreszenz im Darmlumen spricht für einen Rückstau und eine Anhäufung des ZnMps, das als Häm-Analogon um die gleichen Stoffwechselwege mit dem Häm konkurriert und ein Maß für das im Häm enthaltene Eisen ist. Die Aufnahme aus dem Darmlumen ist bei den *frh*(RNAi) durch Ausschaltung des Proteins reduziert bzw. gänzlich unterbrochen. Dieser Effekt zeigt sich besonders deutlich in den Langzeit-Assays und bei Häminkonzentrationen in den NGM-Platten von 10 µM.

In der Literatur wird eine Eisenanhäufung bei Frataxin-Mangel 1997 durch Babcock et al. wie auch durch Koutnikova et al. und Priller et al. beschrieben (Babcock et al., 1997, Koutnikova et al., 1997, Priller et al., 1997). Babcock et al. haben Untersuchungen zur Eisenhomöostase und deren Regulierung durch das frataxin homolog-Gen (YFH1) in Hefen vor dem Hintergrund durchgeführt, um die Pathologie, die zu den Symptomen

der Friedreich Ataxie führen, zu studieren. Diese Störungen der Eisenhomöostase wurden auch in anderen Modellorganismen beschrieben (Maus (Cossée et al., 2000), *Drosophila* (Calap-Quintana et al., 2018), beide als Krankheitsmodelle für FRDA). Es ist jedoch bis heute nicht vollständig geklärt, welche funktionellen Mechanismen bei einem Frataxin-Mangel zur Dysregulation der Eisenhomöostase mit Eisenanhäufung in den Zellen führen. Tamarit et al. diskutieren in ihrem Review von 2021 die unterschiedlichen Forschungsansätze zur Rolle von Frataxin in der Eisen- und Hämhomöostase. Es werden dort verschiedene Hypothesen vorgestellt: Sie stützen sich auf die Beobachtungen, dass Frataxin Eisen binden kann, aber nicht als Eisenspeicher in den Mitochondrien fungiert. Es ist bekannt, dass Frataxin mit vielen Proteinen interagiert, die an der Häm- und Eisen-Schwefel-Cluster-Synthese beteiligt sind. Ein Frataxin-Mangel führt zu einem verminderten Einbau von Eisen in die Eisen-Schwefel-haltigen Proteine und/oder zu einer unkontrollierten Oxidation von Fe^{2+} durch O_2 . Dadurch kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und zu mitochondrialer Dysfunktion. Andere zelluläre Signalwege werden aktiviert und regulieren die Expression von Genen, die an der Eisenaufnahme und/oder dem eisenvermittelten Stoffwechselumbau beteiligt sind. Dies führt zu einer Eisenakkumulation und zur Unterdrückung von eisenregulierten Enzymen und Stoffwechselwegen (Tamarit et al., 2021).

Diese wissenschaftlichen Erkenntnisse sind kongruent mit unseren experimentellen Beobachtungen im ZnMp-Assay mit *C. elegans* frh(RNAi) und stützen sie.

5.3. Die Ausschaltung des Gens *atad-3* führt zu einer starken Reduktion des Legeverhaltens

Die RNAi vermittelte Ausschaltung von *atad-3* in *C. elegans* führt zu einer gravierenden Einschränkung des Legeverhaltens der Nematoden. Es zeigte sich im Vergleich zu Kontrollwürmern eine signifikante Reduktion. Während die Kontrollen nach 48 h ein Maximum an Eiern legten, war das Legeverhalten der *atad-3*(RNAi) nach 24 h bereits deutlich vermindert und nach 72 h nahezu erschöpft.

Diese Beobachtungen sind in der Literatur zuvor beschrieben worden und konnten durch unsere Experimente bestätigt werden (Hoffmann 2009). Sie wurden in Vorbereitung der Assays mit dem therapeutischen Einsatz von Deferoxamin,

Quercetin und Myricetin durchgeführt. Ziel dieser Experimente war es vor allem, durch Beobachtung von Verhalten und Entwicklung der *atad-3(RNAi)* im Vergleich zur Kontrolle Sicherheit in der Beurteilung zu gewinnen, um ggf. Abweichungen in den nachfolgenden Assays besser erfassen zu können.

5.4. Die Gabe von Eisenchelatoren oder Radikalfängern (Flavonoide) führt zu keiner Erholung des Legeverhaltens in *atad-3(RNAi)* und *frh(RNAi)*

Eisen ist ein Spurenelement und muss sowohl beim Menschen als auch bei *C. elegans* mit der Nahrung zugeführt werden. Die Aufnahme in den Körper erfolgt in beiden Fällen über die Darmschleimhaut. Mit Hilfe des Eisenchelators Deferoxamin sollte die intestinale Eisenaufnahme reduziert werden, die Erholung des Legeverhaltens der *atad-3(RNAi)* sollte als Messgröße dienen. Mit der Gabe der Flavonoide Quercetin und Myricetin sollte oxidativer Stress vermindert werden und auf diese Weise die toxischen Effekte des Eisenüberschusses in den Mitochondrien reduziert werden. Auch hier diente das Legeverhalten als Messgröße.

Wir haben zum ersten Mal versucht, in einem experimentellen Setting mögliche positive Wirkungen von Chelatbildnern und Radikalfängern auf *atad-3(RNAi)* und *frh(RNAi)* in *C. elegans* zu untersuchen. Beide Substanzgruppen haben in den verwendeten Dosierungen keinen Erholungseffekt auf das Legeverhalten von *atad-3(RNAi)* und *frh(RNAi)* gezeigt.

Ein möglicher Grund für diesen fehlenden Effekt kann in der chemischen Struktur von Deferoxamin liegen. Deferoxamin ist ein Chelatbildner mit einer starken Affinität zu Fe^{3+} -Ionen und wird wegen dieser Eigenschaften in der Medizin häufig bei Erkrankungen, die mit einer Eisenüberladung des Organismus einhergehen, z.B. der Hämatochromatose, eingesetzt. Da Deferoxamin aufgrund seiner Molekülgröße biologische Membranen nur schlecht überwinden kann, wird es beim Menschen in der Regel parenteral angewandt. Die beiden in *C. elegans* untersuchten Proteine ATAD-3 und Frataxin sind in Mitochondrien und damit in einer Zellorganelle lokalisiert, die sich durch eine eigene Doppelmembran vom übrigen Zytoplasma abgrenzt, wie es in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden

konnte (Bogehagen 2008, Da Cruz 2003, Koutnikova 1997, Priller 1997). Möglicherweise konnte Deferoxamin aufgrund seiner Molekülgröße nicht in relevanten Mengen in die Mitochondrien eindringen und dort wirken, wo es vermutlich den größten Effekt gehabt hätte.

Es gibt klinische Studien zum Einsatz von Eisenchelatoren in der Therapie der Friedreich-Ataxie (Elincx-Benizri et al., 2016, Pandolfo et al., 2013). Untersucht wurde der Chelatbildner Deferipron, der aufgrund seiner chemischen Eigenschaften in der Lage ist, Membranen leicht zu überwinden und intrazelluläre Kompartimente und Mitochondrien zu erreichen. Er kann Eisen zwischen zellulären Organellen transportieren (Sohn et al., 2008) und auf diese Weise zur Entlastung bei Eisenüberladung einer Zelle beitragen. Es konnte in den Studien gezeigt werden, dass niedrigdosiertes Deferipron einen positiven Effekt auf die Herzparameter bei Friedreich-Ataxie Patienten hat. Höhere Dosen des Eisenchelators haben zu einer Zustandsverschlechterung geführt und bergen das Risiko einer schweren Agranulozytose (Pandolfo et al., 2013). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Eisenchelation eine therapeutische Option für Patienten mit Friedreich-Ataxie sein kann.

Es ist denkbar, dass der Chelatbildner Deferipron in *C. elegans* ähnlich wie bei Menschen in die Mitochondrien eindringen kann und dort regulierend in die Eisenhomöostase eingreift. Dies wäre experimentell zu prüfen.

Das Legeverhalten der beiden modifizierten Wurmvarianten *atad-3*(RNAi) und *frh*(RNAi) zeigte sich reduziert im Vergleich zu den Kontrollwürmern. Auch die Gabe von Myricetin und Quercetin führte zu keiner Erholungstendenz. Vergleicht man das Legeverhalten der beiden Varianten untereinander, so fällt die sehr drastische Reduktion der Gesamtembryonenzahl über drei Tage in der *atad-3*(RNAi) Population auf, die sich deutlich von der milder beeinträchtigten Reproduktionsrate der *frh*(RNAi) Tiere unterscheidet. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Ausschaltung von ATAD-3 zu erheblichen Beeinträchtigungen bei *C. elegans* führt, die deutlich ausgeprägter sind, als es bei einem Knockout von Frataxin zu beobachten ist. Hoffmann et al. konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass es sich bei ATAD-3 um ein mitochondriales Protein handelt und dass eine durch RNA-vermittelte Interferenz (RNAi) hervorgerufene Verarmung zu schweren Defekten in *C. elegans* führt, die durch

frühen Larvenstillstand, gonadale Dysfunktion, reduzierte Fettspeicherung im Darm und embryonale Letalität gekennzeichnet sind (Hoffmann et al., 2009). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ATAD-3 nicht nur einen Einfluss auf die Eisenhomöostase in *C. elegans* hat, sondern in mögliche darüber hinaus gehende Prozesse involviert ist. Es hat sich bei der mikroskopischen Beobachtung der Nematoden, die diese Experimente begleiteten, immer wieder gezeigt, dass *atad-3(RNAi)* im Vergleich zu den Kontrollen und auch den *frh(RNAi)* tendenziell vulnerabler zu sein schien und sich auch nicht vergleichbar gut entwickelten.

Die Ausschaltung der Proteine ATAD-3 und Frataxin in *C. elegans* führt zu einer Unterbrechung in komplexen Stoffwechselwegen innerhalb des Mitochondriums mit weitreichenden Konsequenzen für das einzelne Wurm-Individuum. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das alleinige Abfangen der schädigenden Eisenmoleküle und der durch sie freigesetzten Radikale nicht ausreichend ist, um die weitreichenden Effekte des Genknockdowns aufzuheben.

Beim Menschen werden in der Therapie von Mitochondriopathien Vitamine (z.B. Vitamine B, C, L-Carnitin) und Cofaktoren (Coenzym Q10) häufig eingesetzt. Sie wirken – wie auch Myricetin und Quercetin – v. a. als Radikalfänger. Beschrieben sind für sie positive Effekte in kleinen Fallstudien und Einzelfallbeobachtungen (Rodriguez et al., 2007, Glover et al., 2010, Mermigkis et al., 2013). Eine signifikante Wirksamkeit konnte jedoch für keine der untersuchten Substanzen belegt werden. Es fehlen Daten aus kontrollierten Studien (Pfeffer et al., 2012, Murayama et al., 2019). Es scheinen einige Patienten einen gewissen Benefit vom Einsatz von Antioxidantien zu haben, so dass der therapeutische Einsatz solcher Substanzen weiterhin eine Rolle im Rahmen von individuellen Behandlungsversuchen spielt. Mit dem in den letzten Jahren dramatisch gewachsenen Wissen über die Pathogenese der Mitochondriopathien, insbesondere hinsichtlich des Verständnisses der zugrundeliegenden molekulargenetischen Ursachen, zeichnen sich für einige Defekte spezifischere Therapieansätze ab. Dies betrifft vor allem Störungen im sogenannten Cofaktormetabolismus. Durch neue Sequenzierungstechniken konnten inzwischen für etwa 400 Mitochondriopathien ursächliche genetische Defekte gefunden werden. Der für eine Erkrankung ursächliche Genotyp wird zunehmend an Bedeutung für Therapieentscheidungen gewinnen (Leitlinie Mitochondriale Erkrankungen 2021).

5.5. Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Rolle der mitochondrialen Proteine ATAD-3 und Frataxin in der zellulären Eisen- und Hämhomöostase im Modellorganismus *C. elegans* zeigen, dass beide Proteine eine wichtige regulierende Funktion innerhalb der Stoffwechselwege einnehmen. Ihr Ausfall führt zu Störung der Eisen- und Hämhomöostase sowie zur Akkumulation der zu verstoffwechselnden Produkte mit nachgehenden toxischen Effekten für die Mitochondrien und die Zellen. ATAD-3 hat einen Einfluss auf die Entwicklung und Fruchtbarkeit von *C. elegans* und ist für einen normalen Lebenszyklus unabdingbar. Wird das Protein über RNAi ausgeschaltet, zeigt *C. elegans* ein deutlich reduziertes Legeverhalten gegenüber gesunden Kontrollwürmern. Dieses Ergebnis ist durch die Gabe von Chelatoren (Deferoxamin) und Radikalfängern (Quercetin, Myricetin) weder zu bessern noch aufzuheben. Für beide Substanzgruppen konnten wir in unseren Versuchen keinen Rescue-Effekt beobachten.

Bei den Eisen-Assays ergaben sich methodische Limitationen, die Werte fanden sich in unseren Experimenten unterhalb des Detektionslimits des Assays, so dass keine auswertbaren Daten erhoben werden konnten. Die ZnMp-Assays sind bedingt zur Quantifizierung der Akkumulation von fluoreszenzmarkierten ZnMp nach Genknockdown geeignet. Sie haben eine gewisse Fehleranfälligkeit, die eine gute Datenerhebung erschwert.

5.6. Methodendiskussion und Limitationen

Grundsätzlich muss bei der Betrachtung der Experimente immer berücksichtigt werden, dass es sich bei den RNAi-modifizierten Würmern um Modelle handelte, die aufgrund der hohen Sequenzidentität der Proteine ATAD-3 und Frataxin zu ihren Homologa beim Menschen Rückschlüsse auf die Prozesse in humanen Zellen erlauben, die aber auch ihre Limitationen haben. Die isolierte Betrachtung einer einzelnen Funktion ist kritisch zu betrachten, da Signalwege häufig hochkomplexe Netzwerke sind und die an ihnen beteiligten Akteure im Organismus nicht selten mehr

als nur eine spezifische Funktion wahrnehmen. Die Übertragung von Erkenntnissen aus Wurmmodellen auf den humanen Organismus muss begleitet sein von dem Wissen um die ungleich höhere Komplexität des Systems „Mensch“

5.6.1. ZnMp-Assays

In den durchgeführten Experimenten mit Kurz- (6 h) und Langzeitexposition (1 d) ergaben sich bei der Untersuchung der *atad-3*(RNAi) Tiere Probleme und die initialen Ergebnisse entsprachen nicht der Arbeitshypothese und standen im Kontrast zu den Ergebnissen des Hämin-Assays (s. Abb. 21). Sowohl in den Assays über 6 h (Abb. 8 und 9) als auch in den Assays über 1 d (Abb. 10 und 11) konnte keine signifikante Erhöhung der ZnMp-Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollen gefunden werden.

Nach meinem Verlassen der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Distelmaier wurde die Etablierung des ZnMp-Assays von der biologischen Doktorandin Frau Daniela van den Ecker fortgeführt. Im Verlauf konnte unter geänderten Versuchsbedingungen eine Erhöhung der ZnMp Fluoreszenz in *atad-3*(RNAi) Würmern nachgewiesen werden (publizierte Daten siehe van den Ecker et al., 2015). Als Ursache für die diskrepanten Ergebnisse konnten wir folgende Aspekte ausmachen:

Die Präparation des ZnMps (1.) ist nicht trivial. ZnMp lässt sich nicht einfach in eine homogene Lösung bringen. PH-neutrales Wasser ist als Lösungsmittel nicht geeignet. ZnMp ist ähnlich wie Häm hydrophob und löst sich in ihm nicht, sondern bildet in Wasser große, grobe Flocken, die von den Würmern nicht aufgenommen werden können. Sie kleben an der äußeren Körperoberfläche des Wurmes und sind für eine Interpretation nicht zu gebrauchen. Mit der ZnMp-Präparation nach dem Protokoll von J. Walston (Walston 2010) gelingt es unter Verwendung von 0.3 M NH_4O , ZnMp in Lösung zu bringen. Aber auch hier ist die Lösung nicht vollständig homogen, das ZnMp hat die Tendenz, flockig zu bleiben. Dies stellt möglicherweise eine Schwierigkeit bei der oralen Aufnahme durch die Würmer dar und könnte auch die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung beeinflussen. Die oral aufgenommenen ZnMp-Partikel fluoreszieren je nach Größe und Dicke unterschiedlich stark und liegen nicht immer in der vorab definierten Messregion (ROI).

Es konnte (2.) unter dem Mikroskop beobachtet werden, dass *C. elegans* die auf der Agarplatte mit Bakterienrasen aufgebrachte ZnMp-Lösung mied und sich – wo immer

möglich – außerhalb des ZnMp-Feldes aufhielt. Ursache hierfür könnte das schwach basische Ammoniakwasser als Solvens des ZnMp nach dem Watson-Protokoll sein, das von den Würmern als toxisch erkannt und gemieden wird. Dies kann zu falsch negativen Ergebnissen führen, da die aufgenommene Menge Fluoreszenz aus dem vorgegebenen Angebot deutlich geringer ist.

ZnMp ist lichtempfindlich (3.), die Experimente mussten lichtgeschützt durchgeführt werden. Die Arbeiten beim Umsetzen der Würmer mit dem Wurmpicker auf die Test-Agarplatten erfordern ein hohes Maß an Geschicklichkeit und Routine, um weder die Würmer noch den Agarboden zu verletzen, und gleichzeitig die Lichtexposition von ZnMp möglichst gering zu halten. Verletzungen der äußeren Körperhülle führen zum Tod des Wurmes, Verletzungen des Agarboden führen zum „Eingraben“ eines Wurmes, er verschwindet und kann für das Experiment nicht ausgewertet werden. Eine zu lange Lichtexposition verändert das ZnMp und macht es unbrauchbar.

Es ist bekannt, dass ein Fehlen von ATAD-3 bei *C. elegans* zu einer Verzögerung der Entwicklung bis hin zum Entwicklungsstillstand der Tiere führt (Hoffmann et al., 2009). Aus diesem Grund wurde die RNAi zur Ausschaltung der *atad-3* Gensequenz erst an Würmern im Entwicklungsstadium L3 (s. auch Abb. 2) durchgeführt, nicht an juvenilen Formen. Auf diese Weise sollte eine grundlegende Entwicklung und Lebensfähigkeit der Versuchstiere sichergestellt und eine Vergleichbarkeit mit den Kontrolltieren gewährleistet werden. In Abb. 8 ist zu erkennen, dass sich die Zahl der eingesetzten Würmer unter 6 h ZnMp-Exposition in der *atad-3*(RNAi)-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr als halbiert. Möglicherweise (4.) waren die eingesetzten Würmer durch die *atad-3*(RNAi) dennoch so beeinträchtigt, dass das von uns postulierte Ergebnis nicht zufriedenstellend dargestellt werden konnte.

Die ROI als Messfeld der emittierten Fluoreszenz (5.) wurde immer unmittelbar hinter der pharyngeal-intestinal Klappe zu Beginn des Darmlumens des Wurmes (s. auch Abb. 1a) platziert. Diese ist nach 1 d Expositionszeit gut zu erkennen, nach 6 h ist dies nicht immer sicher möglich, da es sehr von der aufgenommenen Menge an fluoreszierendem ZnMp und der Position des Wurmes abhängt. Eine nicht korrekt platzierte ROI kann zu einem Messfehler führen, der das hypothetisch angenommene Ergebnis maskiert.

Abschließend wurde zudem das experimentelle Setting dahingehend verändert, dass neben der Inkubation mit ZnMp eine Zugabe von Ferric ammonium citrate (FAC) erfolgte. Hierdurch konnte die Interdependenz von Häm-Aufnahme und Eisenmetabolismus besser untersucht werden.

5.6.2. Eisen-Assay

Die direkte Messung des Eisens im Wurmlysat erwies sich als schwierig und mit den von uns gewählten Methoden als nicht durchführbar. In allen Fällen lagen die Messergebnisse unterhalb des Detektionslimits. Hauptproblem war hierbei die Gewinnung von ausreichendem Material. Insbesondere bei der Kultur von *C. elegans* auf Agar-Platten sind die Möglichkeiten hierbei begrenzt. Zudem ist der Nachweis von Eisen komplex und durch die chemischen Eigenschaften des Moleküls störungsempfindlich, so dass sich eine Art „methodisches Rauschen“ einstellt ohne valide Messergebnisse zu liefern. Ein Referenzlabor (Metabolomic Discoveries GmbH, Am Mühlenberg 11, 14476 Potsdam) kam zu den gleichen Ergebnissen. Ggf. wäre die Gewinnung von größeren Materialmengen über die sogenannte Flüssigkultur von *C. elegans* möglich. Allerdings bietet diese Form der Kultur insbesondere bei Studien zu mitochondrialen Stoffwechselwegen Nachteile, da die Würmer unter anaeroben Bedingungen gehalten werden.

5.6.3. Zusammenfassung der Limitationen

Die Messung der Fluoreszenz von ZnMP als Maß für eine Eisenakkumulation nach oraler Aufnahme durch *C. elegans* bzw. *atad-3*(RNAi) muss kritisch betrachtet werden, da eine Vielzahl möglicher Fehlerquellen die Aussage des Experimentes beeinträchtigen kann.

Die direkte Messung von Eisen im Wurmlysat ist aufgrund der hohen Reaktivität von Eisen und der schwierigen Materialgewinnung problematisch und scheint keine geeignete Methode zu sein, um eine Akkumulation nachzuweisen.

Die Behandlung von *C. elegans* RNAi Stämmen mit Eisenchelatoren oder Flavonoiden zeigte keine klaren Effekte auf die Fertilität. Die Interpretation dieser Ergebnisse ist schwierig, da die Aufnahme der Substanzen in *C. elegans* bisher nicht gut untersucht wurde.

6. Schlussfolgerung und Ausblick

Wir konnten in dieser Arbeit erstmals zeigen, dass die Ausschaltung des mitochondrialen Proteins ATAD-3 in *C. elegans* zu einer sehr deutlichen Häminüberladung im Wurm führt. Ob diese Effekte primär durch einen direkten Einfluss von ATAD-3 auf den Eisen- und Hämstoffwechselweg oder sekundär durch indirekten Einfluss anderer Stoffwechselprodukte ausgelöst werden, ist noch unklar und sollte Inhalt weiterer Forschung sein.

Wir konnten weiter zeigen, dass durch Ausschaltung von *atad-3* die Fertilität von *C. elegans*, gemessen am Legeverhalten der Würmer, deutlich reduziert ist. Wir haben zum ersten Mal untersucht, ob die Gabe von Deferoxamin, Quercetin oder Myricetin als eisenbindende, bzw. antioxidative Substanzen bei *atad-3*(RNAi) und *frh*(RNAi) zu einem Rescueeffekt mit Erholung des Legeverhalten führt. Einen solchen Effekt konnten wir mit den untersuchten Substanzen nicht feststellen.

C. elegans ist ein in vielerlei Hinsicht gut geeigneter und in der Forschung bewährter Modellorganismus. Beim Studium des Eisenstoffwechsels ist die Komplexität der Stoffwechselwege zu berücksichtigen. Die hohe Sequenzidentität beteiligter Proteine zu ihren Homologa beim Menschen erlaubt potentielle Rückschlüsse oder Hinweise auf die Prozesse in humanen Zellen. Sie können als ein Schlüssel zu einem besseren Verständnis von Erkrankungen dienen, denen ursächlich ein gestörter Eisenstoffwechsel zugrunde liegt.

Zu Beginn meiner Arbeiten war das humane ATAD3 noch nicht mit klinisch-relevanten Krankheitsbildern assoziiert. Dies hat sich durch die zunehmende Anwendung von neuen molekulargenetischen Analysetechniken geändert (siehe "neonatal lethal pontocerebellar hypoplasia, hypotonia, and respiratory insufficiency syndrome"; PHRINL; OMIM # 618810 und "autosomal dominant chromosome 1p36.33 duplication syndrome"; OMIM # 618815). Hierdurch gewinnen die hier dargestellten Ergebnisse an Relevanz. Es bleibt zu hoffen, dass ein besseres Verständnis der Pathophysiologie langfristig zu therapeutischen Ansätzen führen kann.

7. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Anderson CP, Leibold EA (2014):** Mechanisms of iron metabolism in *Caenorhabditis elegans*, *Front. Pharmacol.* 5: 113. DOI: [10.3389/fphar.2014.00113](https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00113)
- Armstrong JS, Khmour O, Hecht SM (2010):** Does oxidative stress contribute to the pathology of Friedreich's ataxia? A radical question. *The FASEB Journal* 24(7):2152–2163. DOI: [10.1096/fj.09-143222](https://doi.org/10.1096/fj.09-143222)
- Babcock M, De Silva D, Oaks R et al. (1997):** Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of Frataxin, *Science* Jun 13:276(5319): 1709-12. DOI: [10.1126/science.276.5319.1709](https://doi.org/10.1126/science.276.5319.1709)
- Baudier J (2018):** ATAD3 proteins: brokers of a mitochondria-endoplasmic reticulum connection in mammalian cells. *Biol Rev Camb Philos Soc* 93(2): 827-844. DOI: [10.1111/brv.12373](https://doi.org/10.1111/brv.12373)
- Boddaert N, Hanh Le Quan Sang K, Rötig A et al. (2007):** Selective iron chelation in Friedreich ataxia: biologic and clinical implications. *Blood* 110(1): 401-408. DOI: [10.1182/blood-2006-12-065433](https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-065433)
- Bogenghagen DF, Rousseau D, Burke S (2008):** The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids, *J. Biol. Chem.* 283(6): 3665-3675. DOI: [10.1074/jbc.M708444200](https://doi.org/10.1074/jbc.M708444200)
- Brenner S, (1974):** The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1): 71 – 94. DOI: [10.1093/genetics/77.1.71](https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71)
- Calap-Quintana P, Navarro JA, González-Fernández J (2018):** *Drosophila melanogaster* Models of Friedreich's Ataxia. *Biomed Res Int*, Apr 5; 2018: 5065190. DOI: [10.1155/2018/5065190](https://doi.org/10.1155/2018/5065190)
- Campuzano V, Montermini L, Molto MD et al. (1996):** Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271(5254): 1423-1427. DOI: [10.1126/science.271.5254.1423](https://doi.org/10.1126/science.271.5254.1423)
- Campuzano V, Montermini L, Lutz Y et al. (1997):** Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum. Mol. Genet.* 6(11): 1771-1780. DOI: [10.1093/hmg/6.11.1771](https://doi.org/10.1093/hmg/6.11.1771)
- Chen TC, Hung YC, Lin TY et al. (2011):** Human papillomavirus infection and expression of ATPase family AAA domain containing 3A, a novel antiautophagy factor, in uterine cervical cancer. *Int. J. Mol. Med.* 28(5): 689-96. DOI: [10.3892/ijmm.2011.743](https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.743)
- Cooper HM, Yang Y, Ylikallio E et al. (2017):** ATPase-deficient mitochondrial inner membrane protein ATAD3A disturbs mitochondrial dynamics in dominant hereditary spastic paraplegia. *Hum Mol Genet* 26(8): 1432-1443. DOI: [10.1093/hmg/ddx042](https://doi.org/10.1093/hmg/ddx042)
- Cross J, Pollock JR, Bingham SA (2003):** Haem not protein or inorganic iron is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Res.* 63(10): 2358-2360. PMID: [12750250](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12750250/)
- Cossée M, Puccio H, Gansmuller A et al. (2000):** Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet* 9(8): 1219-26. DOI: [10.1093/hmg/9.8.1219](https://doi.org/10.1093/hmg/9.8.1219)
- Da Cruz S, Xenarios I, Langridge J et al. (2003):** Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* 278(42): 41566-41571. DOI: [10.1074/jbc.M304940200](https://doi.org/10.1074/jbc.M304940200)

- Desai R**, Frazier A, Durigon R et al. (2017): ATAD3 gene cluster deletions cause cerebellar dysfunction associated with altered mitochondrial DNA and cholesterol metabolism. *Brain* 140(6): 1595-1610. DOI: [10.1093/brain/awx094](https://doi.org/10.1093/brain/awx094)
- Dutt S**, Hamza I, Bartnikas TB (2022): Molecular Mechanisms of Iron and Heme Metabolism. *Annu Rev Nutr.* Aug 22; 42:311-335. DOI: [10.1146/annurev-nutr-062320-112625](https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-062320-112625)
- Elincx-Benizri S**, Glik A, Merkel D et al. (2016): Clinical Experience with Deferiprone Treatment for Friedreich Ataxia. *J Child Neurol.* 31(8): 1036-40. DOI: [10.1177/0883073816636087](https://doi.org/10.1177/0883073816636087)
- Fang HY**, Chang CL, Hsu SH et al. (2010): ATPase family AAA domain-containing 3A is a novel anti-apoptotic factor in lung adenocarcinoma cells. *J. Cell Sci.* 123: 1171-1180. DOI: [10.1242/jcs.062034](https://doi.org/10.1242/jcs.062034)
- Foury F**, Cazzalini O. (1997): Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett.* 411:373-377 DOI: [10.1016/s0014-5793\(97\)00734-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00734-5)
- Frazier AE**, Compton AG, Kishita Y et al. (2021): Fatal perinatal mitochondrial cardiac failure caused by recurrent *de novo* duplications in the *ATAD3* locus. *Med* 2(1): 49-73. DOI: [10.1016/j.medj.2020.06.004](https://doi.org/10.1016/j.medj.2020.06.004)
- Friedreich N**, (1863): Ueber degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Virchows Archiv der Pathologischen Anatomie* 1863; 26: 433-459
- Gao G**, Li J, Zhang Y et al. (2019). Cellular Iron Metabolism and Regulation. In: Chang, YZ. (eds) *Brain Iron Metabolism and CNS Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1173. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9589-5_2
- Gilquin B**, Taillebourg E, Cherradi Net al. (2010): The AAA+ ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes. *Mol Cell Biol* 30(8):1984-96. DOI: [10.1128/MCB.00007-10](https://doi.org/10.1128/MCB.00007-10)
- Glover EI**, Martin J, Maher A et al. (2010): A randomized trial of coenzyme Q10 in mitochondrial disorders. *Muscle Nerve* 42(5): 739-48. DOI: [10.1002/mus.21758](https://doi.org/10.1002/mus.21758)
- Goller T**, Seibold UK, Kremmer E et al. (2013): Atad3 function is essential for early postimplantation development in the mouse. *PLoS One* 8(1):e54799. DOI: [10.1371/journal.pone.0054799](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054799)
- Gomes CM**, Santos R (2013): Neurodegeneration in Friedreich's ataxia: from defective frataxin to oxidative stress. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013:487534. DOI: [10.1155/2013/487534](https://doi.org/10.1155/2013/487534)
- Gunning AC**, Strucinska K, Muñoz Oreja M et al. (2020): Recurrent De Novo NAHR Reciprocal Duplications in the ATAD3 Gene Cluster Cause a Neurogenetic Trait with Perturbed Cholesterol and Mitochondrial Metabolism. *Am J Hum Genet* 106(2):272-279. DOI: [10.1016/j.ajhg.2020.01.007](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.01.007)
- Harel T**, Yoon WH, Garone C et al. (2016): Recurrent De Novo and Biallelic Variation of ATAD3A, Encoding a Mitochondrial Membrane Protein, Results in Distinct Neurological Syndromes. *Am J Hum Genet* 99(4): 831-845. DOI: [10.1016/j.ajhg.2016.08.007](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.08.007)
- Hart P**, Lodi R, Rajagopalan B et al. (2005): Antioxidant treatment of patients with Friedreich ataxia: four-year follow-up. *Arch Neurol* 62(4): 621-6. DOI: [10.1001/archneur.62.4.621](https://doi.org/10.1001/archneur.62.4.621)
- He J**, Mao CC, Reyes A et al. (2007): The AAA+ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization. *J Cell Biol.*176(2):141-146. DOI: [10.1083/jcb.200609158](https://doi.org/10.1083/jcb.200609158)

- He J**, Cooper HM, Reyes A et al. (2012): Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis. *Nucleic Acids Res.* 40(13): 6109–6121. DOI: [10.1093/nar/gks266](https://doi.org/10.1093/nar/gks266)
- Hodgkin JA**, Brenner S (1977): Mutations causing transformation of sexual phenotype in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 86: 275–287. PMID: [PMC1213677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1213677/)
- Hoffmann M**, Bellance N, Rossignol R et al. (2009): *C. elegans* ATAD-3 is essential for mitochondrial activity and development, *PLoS One* 4(10): e7644. DOI: [10.1371/journal.pone.0007644](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007644)
- Huang KH**, Chow KC, Chang HW et al. (2011): The ATPase family, AAA domain containing 3A is an anti-apoptotic factor and a secretion regulator of PSA in the prostate cancer. *Int. J. Mol. Med.* 28(1): 9-15. DOI: [10.3892/ijmm.2011.670](https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.670)
- Hubstenberger A**, Labourdette G, Baudier J et al. (2008): ATAD3A and ATAD3B are distal 1p-located genes differentially expressed in human glioma cell lines and present in vitro anti-oncogenic and chemoresistant properties, *Exp. Cell Res.* 314(15): 2870-2883. DOI: [10.1016/j.yexcr.2008.06.017](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.06.017)
- Hubstenberger A**, Merle N, Charton R et al. (2010): Topological analysis of ATAD3A insertion in purified human mitochondria. *J. Bioener. Biomembr.* 42(2): 143-150. DOI: [10.1007/s10863-010-9269-8](https://doi.org/10.1007/s10863-010-9269-8)
- Issop L**, Fan J, Lee S et al. (2015): Mitochondria-associated membrane formation in hormone-stimulated Leydig cell steroidogenesis: role of ATAD3. *Endocrinology* 151(1): 334-345. DOI: [10.1210/en.2014-1503](https://doi.org/10.1210/en.2014-1503)
- Jomova K**, Valko M, (2011): Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283(2-3): 65-87. DOI: [10.1016/j.tox.2011.03.001](https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001)
- Kaluza J**, Larsson SC, Håkansson N et al. (2014): Heme iron intake and acute myocardial infarction: a prospective study of men. *Int. J. Cardiol.* 172(1): 155-160 DOI: [10.1016/j.ijcard.2013.12.176](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.12.176)
- Klopstock T**, Priglinger C, Yilmaz A et al. (2021): Mitochondrial disorders. *Dtsch Arztebl Int.*; 118(44): 741-748, DOI: [10.3238/arztebl.m2021.0251](https://doi.org/10.3238/arztebl.m2021.0251)
- Knöbel Y**, Weise A, Gleis M, Sendt et al. (2007): Ferric iron is genotoxic in non-transformed and preneoplastic human colon cells. *Food Chem. Toxicol.* 45(5): 804-811. DOI: [10.1016/j.fct.2006.10.028](https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.10.028)
- Koleini N**, Shapiro JS, Geier J et al. (2021): Ironing out mechanisms of iron homeostasis and disorders of iron deficiency. *J Clin Invest.* 131(11): e148671. DOI: [10.1172/JCI148671](https://doi.org/10.1172/JCI148671)
- Kopustinskiene D**, Jakstas V, Savickas A et al. (2020): Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients* 12(2): 457. DOI: [10.3390/nu12020457](https://doi.org/10.3390/nu12020457)
- Kornblum C** et al. (2021): Mitochondriale Erkrankungen, S1-Leitlinie, 2021, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie
- Koutnikova H**, Campuzano V, Foury F et al. (1997): Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet* 16(4): 345–351. DOI: [10.1038/ng0897-345](https://doi.org/10.1038/ng0897-345)
- Kuwabara, PE**, The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998): Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282 (5396): 2012-2018. DOI: [10.1126/science.282.5396.2012](https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012)
- Labouesse M**, Mango SE (1999): Patterning the *C. elegans* embryo: moving beyond the cell lineage. *Trends Genet.* 15(8): 307-13. DOI: [10.1016/s0168-9525\(99\)01750-3](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(99)01750-3)

- Leitlinie Mitochondriale Erkrankungen** (Stand 02.02.2021). Online verfügbar unter https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-049l_S1_Mitochondriale-Erkrankungen_2021-02_01.pdf (zuletzt geprüft 5.11.2022)
- Lewis JA**, Fleming JT (1995): Basic Culture Methods. *Caenorhabditis elegans*: Modern Biological Analysis of an Organism. Methods in Cell Biology 48: 3-29. PMID: 8531730
- Li S**, Rousseau D (2012): ATAD3, a vital membrane bound mitochondrial ATPase involved in tumor progression. J Bioenerg Biomembr 44(1): 189-197. DOI: [10.1007/s10863-012-9424-5](https://doi.org/10.1007/s10863-012-9424-5)
- Lodi R**, Rajagopalan B, Bradley J et al. (2002): Mitochondrial dysfunction in Friedreich's ataxia: from pathogenesis to treatment perspectives. Free Radic Res 36(4):461-6. DOI: [10.1080/10715760290021324](https://doi.org/10.1080/10715760290021324)
- Maupas É** (1900): Modes et formes de reproduction des nematodes. Archives de Zoologie Expérimentale et Générale 8: 463–624.
- Mermigkis C**, Bouloukaki I, Mastorodemos V et al. (2013): Medical treatment with thiamine, coenzyme Q, vitamins E and C, and carnitine improved obstructive sleep apnea in an adult case of Leigh disease. Sleep Breath 17: 1129–35. DOI: [10.1007/s11325-013-0816-5](https://doi.org/10.1007/s11325-013-0816-5)
- Mootha VK**, Bunkenborg J, Olsen JV et al. (2003): Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. Cell 115(5): 629–640. DOI: [10.1016/s0092-8674\(03\)00926-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00926-7)
- Murayama K**, Shimura M, Liu Z et al. (2019): Recent topics: the diagnosis, molecular genesis, and treatment of mitochondrial diseases. J Hum Genet 64(2): 113–125. DOI: [10.1038/s10038-018-0528-6](https://doi.org/10.1038/s10038-018-0528-6)
- Nakajima O**, Takahashi S, Harigae H et al. (1999): EMBO J 18(22): 6282–6289. DOI: [10.1093/emboj/18.22.6282](https://doi.org/10.1093/emboj/18.22.6282)
- Napier I**, Ponka P, Richardson DR (2005): Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. Blood 105(5): 1867–1874. DOI: [10.1182/blood-2004-10-3856](https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-3856)
- Nicolas G**, Viatte L, Bennoun M et al. (2002): Heparin, a new iron regulatory peptide. Blood Cells Mol Dis 29(3):327-35. DOI: [10.1006/bcmd.2002.0573](https://doi.org/10.1006/bcmd.2002.0573)
- Orphanet** Online verfügbar unter <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php> (zuletzt geprüft am 29.04.2023)
- Pandolfo M** (1998): Molecular genetics and pathogenesis of Friedreich ataxia. Neuromusc Disord 8(6): 409-15. DOI: [10.1016/s0960-8966\(98\)00039-x](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(98)00039-x)
- Pandolfo M**, Hausmann L (2013): Deferiprone for the treatment of Friedreich's ataxia. JNC Vol 126: 142-146. DOI: [10.111/jnc.12300](https://doi.org/10.111/jnc.12300)
- Pandolfo M**, Arpa J, Delatycki M (2014): Deferiprone in Friedreich ataxia: A 6-Month randomized controlled trial. Ann Neurol 76(4): 509-21. DOI: [10.1002/ana.24248](https://doi.org/10.1002/ana.24248)
- Payne RM**, Wagner GR (2012): Cardiomyopathy in Friedreich ataxia: clinical findings and research. J Child Neurol 27(9): 1179–1186. DOI: [10.1177/0883073812448535](https://doi.org/10.1177/0883073812448535)
- Pfeffer G**, Majamaa K, Turnbull DM et al. (2012): Treatment for mitochondrial disorders. Cochrane Database Syst Rev: Cd004426. DOI: [10.1002/14651858.CD004426.pub3](https://doi.org/10.1002/14651858.CD004426.pub3)
- Poburski D**, Boerner JB, Koenig M et al. (2016): Time-resolved functional analysis of acute impairment of frataxin expression in an inducible cell model of Friedreich ataxia. Biol. Open 5 654–661. DOI: [10.1242/bio.017004](https://doi.org/10.1242/bio.017004)

- Priller J**, Scherzer CR, Faber PW et al. (1997): Frataxin gene of Friedreich's ataxia is targeted to mitochondria. *Ann Neurol* 42(2): 265–269. DOI: [10.1002/ana.410420222](https://doi.org/10.1002/ana.410420222)
- Qi Z**, Hamza I, O'Brian MR (1999): Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *Proc Natl Acad Sci* 96(23): 13056–13061. DOI: [10.1073/pnas.96.23.13056](https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13056)
- Rao AU**, Carta LK, Lesuisse E et al. (2005): Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. *PNAS* 102(12): 4270–4275. DOI: [10.1073/pnas.0500877102](https://doi.org/10.1073/pnas.0500877102)
- Riddle DL**, Blumenthal T, Meyer BJ et al. (1997): Introduction to *C. elegans* 1997. *C. elegans* II, 2nd edition Cold Spring Harbor Monograph Series, Vol. 33 Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN-10: 0-87969-532-3
- Ricci A**, Di Betto G, Bergamini E et al. (2022): Iron Metabolism in the Disorders of Heme Biosynthesis. *Metabolites* 12(9):819. DOI: [10.3390/metabo12090819](https://doi.org/10.3390/metabo12090819)
- Rodriguez MC**, MacDonald JR, Mahoney DJ et al. (2007): Beneficial effects of creatine, CoQ10, and lipoic acid in mitochondrial disorders. *Muscle Nerve* 35(2):235–42. DOI: [10.1002/mus.20688](https://doi.org/10.1002/mus.20688)
- Rotig A**, De Lonlay P, Chretien D et al. (1997): Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* 17: 215–217. DOI: [10.1038/ng1097-215](https://doi.org/10.1038/ng1097-215)
- Ruder EH**, Berndt SI, Gilsing AM et al. (2014): Dietary iron, iron homeostatic gene polymorphisms and the risk of advanced colo-rectal adenoma and cancer. *Carcinogenesis* 35(6): 1276–1283. DOI: [10.1093/carcin/bgu028](https://doi.org/10.1093/carcin/bgu028)
- Schaffrik M**, Mack B, Matthias C et al. (2006): Molecular characterization of the tumor-associated antigen AAA-TOB3. *Cell Mol Life Sci* 63(18): 2162–2174. DOI: [10.1007/s00018-006-6200-x](https://doi.org/10.1007/s00018-006-6200-x)
- Schierenberg E**, Cassada R (1986): Der Nematode *Caenorhabditis elegans* — ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus. *Biologie unserer Zeit*. 16(1): 1–7. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1002/biuz.19860160104> (zuletzt geprüft am 05.11.2022)
- Sies H** (1993): Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215(2): 213–219. DOI: [10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x)
- Sohn Y-S**, Breuer W, Munnich A et al. (2008): Redistribution of accumulated cell iron: a modality of chelation with therapeutic implication. *Blood* 111(3): 1690–9. DOI: [10.1182/blood-2007-07-102335](https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-102335)
- Sulston JE**, Schierenberg E, White JG et al. (1983): The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100(1): 64–119. DOI: [10.1016/0012-1606\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90201-4)
- Sun J**, Hoshino H, Takaku K et al. (2002): Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* 21(19): 5216–5224. DOI: [10.1093/emboj/cdf516](https://doi.org/10.1093/emboj/cdf516)
- Swenson S**, Moore C, Marcero J et al. (2020): From Synthesis to Utilization: The Ins and Outs of Mitochondrial Heme. *Cells* 9(3): 579. DOI: [10.3390/cells9030579](https://doi.org/10.3390/cells9030579)
- Tamarit J**, Britti E, Delaspre F et al. (2021): Mitochondrial iron and calcium homeostasis in Friedreich ataxia. *IUBMB Life* <https://doi.org/10.1002/iub.2457> (zuletzt geprüft am 05.11.2022)
- Timmons L**, Fire A (1998): Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395(6705): 854. DOI: [10.1038/27579](https://doi.org/10.1038/27579)
- van den Ecker D**, Hoffmann M, Müting G et al. (2015): *Caenorhabditis elegans* ATAD-3 modulates mitochondrial iron and heme homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 467(2):389–94 DOI: [10.1016/j.bbrc.2015.09.143](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.143)

- Wallace DC**, Singh G, Lott MT et al. (1988): Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242(4884): 1427-1430. DOI: [10.1126/science.3201231](https://doi.org/10.1126/science.3201231)
- Walston, J (2010)**: Genetic characterization of toxic heme resistant mutants in *C. elegans* (Doctoral dissertation, University of Maryland, College Park)
- Was H**, Dulak J, Jozkowicz A (2010): Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy. *Curr Drug Targets* 11(12): 1551-1570. DOI: [10.2174/1389450111009011551](https://doi.org/10.2174/1389450111009011551)
- Wang SJ**, Gao C, Chen BA (2010): Advancement of the study on iron metabolism and regulation in tumor cells. *Chin J Cancer*, 29: 45-455. DOI: [10.5732/cjc.009.10716](https://doi.org/10.5732/cjc.009.10716)
- Wenger RH (2000)**: Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 203: 1253–1263. DOI: [10.1242/jeb.203.8.1253](https://doi.org/10.1242/jeb.203.8.1253)
- White J (1988)**: The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbour Monograph Series Vol 17, Kap. 4: The Anatomy. ISBN 978-087969433-3
- Wood WB, (1988)**: The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbour Monograph Series ISBN 978-087969433-3
- WormAtlas** Online verfügbar unter <http://www.wormatlas.org/> (zuletzt geprüft am 05.11.2022)
- WormBase** Online verfügbar unter <http://www.wormbase.org/> (zuletzt geprüft am 05.11.2022)
- WormBook**, maintenance of *C. elegans*. Online verfügbar unter <http://www.wormbook.org/> (zuletzt geprüft am 05.11.2022)
- Zhang C**, Zhang F (2015): Iron homeostasis and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Protein Cell* 6(2): 88-100. DOI: [10.1007/s13238-014-0119-z](https://doi.org/10.1007/s13238-014-0119-z)

Anhang

1. Chemikalien, Materialien, Geräte und Software

1.1. Verbrauchskemikalien

Die Verbrauchskemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Sigma-Aldrich, Steinheim
- Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD 21152, USA
- Frontier Scientific, Logan, UT 84323-0031, USA
- Extrasynthese, ZI Lyon Nord, Impasse Jaquard – CS 30062, 69727 Genay Cedex, France

Die eingesetzten **Lösungen** wurden mit MQ-Wasser angesetzt und ggf. autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

1.2. Allgemeine Geräte

- UV- Vis- Spektrophotometer, UV Mini 1240, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
- Zentrifugen: Biofuge fresco, Heraeus instruments, Osterode
Pico Fuge Tomy capsule, Tomy Tech, Palo Alto, CA, USA
- Reax Top Vortexer, Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
- Brutschränke, Memmert, Schwabach
- Tecan – Mikrotiterplatten Photometer (ELISA-Reader mit PC-Schnittstelle und Software-gestützter Auswertung) Software Magellan
- Polytron PT 1200 C Kinematica

1.3. Kit-Systeme

- Bicinchoninsäure (BCA)- Protein-Assay-Kit von Thermo Scientific Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA
- Hemin Assay Kit, Kat. Nr. MAK036, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Iron Colorimetric Assay Kit K 390 (BioVision, Inc.)

1.4. Mikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden durchgeführt mit:

Laborstereomikroskop SMZ 140, Motic, Wetzlar, Germany

- Zeiss Axiovert 200M Mikroskop, ausgestattet mit einer Zeiss AxioCam Kamera

1.5. Sonstige Materialien

- Petrischalen (Ø 35 x 10 mm) Falcon
- Petrischalen (Ø 60 x 15 mm) Falcon
- Petrischalen (Ø 100 x 15 mm) Falcon

- Falcon Tubes (50 ml) Falcon
- Eppendorf Safe-lock microcentrifuge tubes (1,5 ml) Sigma-Aldrich

- Objektträger (76 x 26 mm) Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH
- Deckgläschen (18 x 18 mm) Menzelgläser
- Immersionsöl Zeiss; Immersol 518N

1.6. Bakterienstämme

Verwendet wurden die folgenden Bakterienstämme der Spezies *Escherichia coli*:

OP50 (CGC, Minnesota) Uracil auxotropher Stamm Haltung der Würmer

HT115(DE3) (CGC, Minnesota) RNAi

RNAcell-defizienter Stamm mit zwei, die MCS flankierenden T7-Promotoren für die Synthese von dsRNA.

Genotyp: F⁻, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, lambda⁻, rnc14::Tn10(DE3 lysogen:lacUV5 promotor-T7 polymerase)

freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Professor Dr. Olaf Bossinger, RWTH Aachen

1.7. Vektor

pPD129.36 (L4440 "feeding vektor", 2.79kB, (Timmons L. et Fire A., 1998))

Dieser ampicillinresistente Vektor wird für das „Feeding“ benutzt. Die Fremdsequenz ist hier von zwei T7-Promotoren flankiert und führt über die Transkription zu dsRNA. In RNase-defizienten Bakterien wird diese nicht abgebaut. Werden diese Bakterien vom Wurm aufgenommen, kann RNAi erfolgen.

2. Standardverfahren in der Haltung von *C. elegans*

2.1. Herstellung der angereicherten NGM-Platten (OP50-Platten)

Für die Herstellung der angereicherten NGM-Agarplatten zur Haltung von *C. elegans* wurden verwendet (pro Liter):

BD Bacto Agar	20 g
NaCl	3 g
BD Bacto Peptone No.3	2,5 g
BD Bacto Yeast Extract	5 g

Diese Ansätze wurden mit MQ-H₂O aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen (< 60 °C) wurden die Lösungen A, B, C und D hinzugegeben.

Lösungen (pro Liter):

Lösung A: 5 g Cholesterin ad 1 l 50 % (V/V) EtOH

Lösung B: 110,8 g CaCl₂ ad 1 l MQ-H₂O

Lösung C: 246,5 g MgSO₄ *7H₂O ad 1 l MQ-H₂O

Lösung D: 108,3 g KH₂PO₄ + 36 g K₂HPO₄

Ø 100 mm große Petrischalen wurden mit etwa 18 ml der Lösung gefüllt und über Nacht bei RT ausgehärtet. Gleichzeitig wurde eine oN-Kultur OP50 Bakterien (OP50 immer frisch aus dem Glycerol-Stock in 30 ml LB-Medium bei 37 °C) angesetzt. Am folgenden Tag wurden die festen Platten mit je 360 µl der Bakterien-Kultur beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden anschließend bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

C. elegans wurde auf diesen Platten bei 18 °C im Brutschrank gehalten und regelmäßig auf frische Platten umgesetzt.

2.2. Herstellung der Feeding-Platten

Die durch Fütterung vermittelte RNAi erfolgte auf speziellen Feeding-Platten. Für die Herstellung der Feeding-Platten wurden verwendet (pro Liter):

BD Bacto Agar	20 g
NaCl	3 g
BD Bacto Peptone No.3	2,5 g

Diese Ansätze wurden mit MQ-H₂O aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen (< 60 °C) wurden die Lösungen A, B, C und D (s. 2.2.1.1) hinzugegeben sowie (pro Liter)

IPTG:	0,119 g IPTG in 1 ml MQ-H ₂ O gelöst
Ampicillin (100 mg/ml):	100 mg in 1 ml MQ-H ₂ O gelöst
Tetracyclin (12,5 mg/ml):	20 mg Tetracyclin in 1,6 ml 50 % (V/V) EtOH gelöst, 1 ml eingesetzt

Die verwendete Plattengröße variierte mit dem Experiment, Ø 100 mm große Petrischalen wurden mit etwa 12 ml der Lösung gefüllt, Ø 50 mm große mit 7 ml und Ø 35 mm große mit 2 ml. Alle Platten trockneten über Nacht bei RT. Sie wurden anschließend bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die Beimpfung mit H115 und den jeweiligen RNAi Konstrukten erfolgte jeweils kurz vor den Experimenten, um eine möglichst effektive RNAi zu erhalten. Hierfür wurden von HT115 mit der gewünschten Sequenz *atad-3* bzw. *frh* sowie einer Kontrolle mit Leervektor in 30 ml LB-Medium versetzt mit je 30 µl Ampicillin und Tetracyclin oN-Kulturen hochgezogen. Das Wachstum der Bakterien wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm vor der Ausplattierung kontrolliert. Lag die OD zwischen 0,9 und 1,0 – ein Wert, der sich für die Durchführung der RNAi als gut geeignet erwiesen hat – wurden die Platten je nach Größe mit 600 µl (Ø 100 mm), 120 µl (Ø 50 mm) und 60 µl (Ø 35 mm) Bakterienkultur beimpft. Für die kombinierte RNAi zweier

Gensequenzen (atad-3/frh) wurden beide Bakterienkulturen separat hochgezogen und erst unmittelbar vor Gabe auf die Platte im Verhältnis 1:1 gemischt. Die angeimpften Platten wurden über Nacht bei RT getrocknet und anschließend bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

Lösung:

LB-Medium: 8 g LB-Broth in 400 ml MQ-H₂O

2.3. Herstellung der Glycerol-Stocks

Sowohl von OP50 als auch von HT115 wurden Glycerol-Stocks angelegt. OP50 wurde mit 10 ml LB-Medium oN bei 37 °C inkubiert, bei HT115 wurden jeweils 10 µl Ampicillin und Tetracyclin hinzugegeben. Am folgenden Tag wurden je 750 µl der oN-Kulturen mit 250 µl 80% Glycerol versetzt, gevortext, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4. Herstellung von LB-Amp/Tet Agarplatten mit Einzelkolonien der HT115 Feeding-Klone

Die HT115 Feeding-Klone wurden auf LB-Platten versetzt mit Ampicillin und Tetracyclin gehalten. Für die Platten wurde 14 g LB-Agar in 400 ml MQ-H₂O gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden Ampicillin und Tetracyclin je im Verhältnis 1:1000 hinzugegeben. Der Agar wurde in große Petrischalen gegossen und härtete über Nacht bei RT aus. 10 µl einer oN Kultur der HT115 Feeding-Klone wurde nach Kontrolle der OD auf den LB-Amp/Tet-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag sollten einzelne Bakterienkolonien auf den Platten sichtbar sein. Die Platten wurden mit Parafilm abgedichtet und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Nach etwa 4-6 Wochen wurden sie erneuert.

Das Hochziehen der Bakterienkulturen für Feeding-Platten erfolgte im Falle der Feeding-Klone durch Bakterienkolonien von LB-Amp/Tet-Platten, hingegen wurden die OP50 Bakterienkulturen immer vom Glycerol-Stock aus angeimpft.

Danksagung

Mein sehr herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Felix Distelmaier für die Unterstützung, die Anleitung zur wissenschaftlichen Arbeit und die vielfältige Hilfe bei der Entstehung dieser Dissertation. Ganz besonders bedanke ich mich auch für die mir entgegen gebrachte Geduld auf diesem langen Weg.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Professor Dr. Ertan Mayatepek für die gewährte Möglichkeit, diese Forschungsarbeiten im Stoffwechsellabor der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie der Heinrich-Heine-Universität durchführen zu können.

Ganz besonders herzlich möchte ich Herrn Professor Dr. Peter Angerer danken, der mir mit guten Gedanken und klugem Rat geholfen hat, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Sehr herzlich danke ich Frau Daniela van den Ecker für ihre sehr kompetente und geduldige Anleitung meiner wissenschaftlichen Arbeiten im Labor. Sie hat mir alle in dieser Arbeit beschriebenen Methoden und Techniken im Umgang mit *Caenorhabditis elegans* beigebracht und mir immer mit Rat und Tat hilfreich zur Seite gestanden.

Herrn Dr. Michael Hoffmann danke ich herzlich für den wissenschaftlichen Austausch und die Bereitschaft, meine vielen Fragen zu beantworten.

Frau Dr. Renate Schmook, Herrn Dr. Thomas Muth und Frau Lisa Guthardt danke ich sehr herzlich für die kritische Durchsicht der Arbeit, für fruchtbare Gespräche und vielfältige Anregungen.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Heinrich-Heine-Universität für die vielen guten und motivierenden Worte, die mich auf diesem Weg begleitet haben.

Mein abschließender sehr herzlicher Dank geht an meine Töchter Friederike, Cara, Malin und Helena für ihre allumfassende, wundervolle Unterstützung während dieser langen Phase, die diese Dissertation unser Familienleben begleitet hat. Ihr liebevolles Verständnis und ihr unerschütterlicher Glaube daran, dass dieses Projekt ein gutes Ende finden würde, waren meine größte Motivation.